

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 426**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/US2010/061058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11075656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10838298 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2512449**

54 Título: **Métodos y composiciones para administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

18.12.2009 US 287995 P

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

20.03.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)
103 - 6190 Agronomy Road
Vancouver, BC V6T 1Z3, CA y
ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOPE, MICHAEL, J.;
MADDEN, THOMAS, D.;
CULLIS, PIETER;
MAIER, MARTIN, A.;
JAYARAMAN, MUTHUSAMY;
RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL, G.;
AKINC, AKIN;
MANOHARAN, MUTHIAH y
HAFEZ, ISMAIL MAHMOUD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 426 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

Métodos y composiciones para administración de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a partículas de lípidos que comprenden un primer lípido catiónico, un segundo lípido catiónico, un lípido neutro, y un lípido de PEG capaz de reducir la agregación; donde el primer lípido catiónico y el segundo lípido catiónico cada uno tienen un pKa que difiere del pKa combinado en al menos 0,1 unidades pKa, al menos 0,2 unidades pKa, o al menos 0,3 unidades pKa. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas partículas de lípidos, y usos de estos.

Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip), micro ARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, plásmidos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes, antisentido, antagomir, antimir, imitación de microARN, supermir, adaptador U1 y aptámero. Estos ácidos nucleicos actúan mediante una variedad de mecanismos. En el caso de ARNip o miARN, estos ácidos nucleicos pueden regular por disminución los niveles intracelulares de proteínas específicas a través de un proceso denominado interferencia de ARN (ARNi). Después de la introducción de ARNip o miARN en el citoplasma celular, estas construcciones de ARN de cadena doble se pueden unir a una proteína denominada RISC. La cadena de sentido de ARNip o miARN se desplaza del complejo RISC proporcionando un modelo dentro de RISC que puede reconocer y unir ARNm con una secuencia complementaria a aquella del ARNip o miARN unido. Habiendo unido el ARNm complementario, el complejo RISC escinde el ARNm y libera las cadenas escindidas. iARN puede proporcionar una regulación por disminución de proteínas específicas fijando como objetivo la destrucción específica del ARNm correspondiente que codifica la síntesis de proteínas.

Estas aplicaciones terapéuticas de iARN son extremadamente amplias, dado que las construcciones de ARNip y miARN pueden sintetizarse con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína objetivo. A la fecha, las construcciones de ARNip han demostrado la capacidad de regular por disminución específicamente las proteínas objetivo tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Además, las construcciones de ARNip están actualmente siendo evaluadas en estudios clínicos.

Sin embargo, dos problemas que afrontan las construcciones de ARNip y miARN hoy en día son, en primer lugar, su susceptibilidad a la digestión de nucleasa en plasma, y en segundo lugar, su capacidad limitada para obtener acceso al compartimiento intracelular donde se pueden unir a RISC al ser administradas sistemáticamente como los ARNip y miARN libres. Estas construcciones de doble cadena pueden estabilizarse mediante la incorporación de enlaces de nucleótidos modificados químicamente dentro de la molécula, por ejemplo, grupos fosfotioato. Sin embargo, estas modificaciones químicas proporcionan solo una protección limitada de la digestión de nucleasa y pueden disminuir la actividad de la construcción. La administración intracelular de ARNip y miARN puede verse facilitada mediante el uso de sistemas portadores tales como polímeros, liposomas catiónicos o mediante la modificación química de la construcción, por ejemplo mediante la unión covalente de moléculas de colesterol. Sin embargo, se necesitan sistemas de administración mejorados para aumentar la potencia de moléculas ARNip y miARN y reducir o eliminar que se requiera la modificación química.

Los oligonucleótidos antisentido y los ribosomas también pueden inhibir la traducción del ARNm en la proteína. En el caso de las construcciones antisentido, estos ácidos desoxirribonucleicos de cadena simple tienen una secuencia complementaria al ARNm de la proteína objetivo y pueden unirse al ARNm mediante el apareamiento de bases Watson-Crick. Esta unión o previene la traducción del ARNm objetivo y/o provoca la degradación de RNasa H de las transcripciones de ARNm. Como consecuencia, los oligonucleótidos antisentido tienen un potencial formidable para la especificidad de la acción (es decir, una regulación por disminución de una proteína específica relacionada con una enfermedad). A la fecha, estos compuestos han mostrado prometer en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, que incluyen los modelos de enfermedad inflamatoria, cáncer y VIH (examinado en Agrawal, Trends in Biotech. 14:376-387 (1996)). Los antisentidos también pueden afectar la actividad celular mediante la hibridación en especial con ADN cromosomal. Evaluaciones clínicas avanzadas en humanos sobre distintos fármacos antisentido están hoy en día en camino. Los objetivos para estos fármacos incluyen genes de bcl2 y apolipoproteína B y productos de ARNm.

Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores incluyen ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. En el caso de los ácidos desoxirribonucleicos, ciertas secuencias o motivos han demostrado que producen una estimulación inmunitaria en los mamíferos. Estas secuencias o motivos incluyen el motivo CpG, secuencias ricas en pirimidina y secuencias palindrómicas. Se cree que el motivo CpG en ácidos desoxirribonucleicos está específicamente reconocido por el receptor endosomal, receptor de tipo Toll 9 (TLR-9) que luego provoca tanto la vía de estimulación inmune innata como adquirida. Ciertas secuencias de ácido ribonucleico inmunoestimuladoras también fueron reportadas. Se cree que estas secuencias de ARN provocan la activación inmune mediante la unión de receptores de tipo Toll 6 y 7 (TLR-6 and TLR-7). Además, el ARN de doble cadena también se reporta como inmunoestimulador y se cree que activa mediante la unión a TLR-3.

Un problema bien conocido con el uso de ácidos nucleicos terapéuticos se refiere a la estabilidad del enlace internucleótido fosfodiéster y la susceptibilidad de este enlace a las nucleasas. La presencia de exonucleasas y endonucleasas en suero resulta en la rápida digestión de ácidos nucleicos que poseen enlaces fosfodiéster y, por tanto, los ácidos nucleicos terapéuticos pueden tener semividas muy cortas en presencia de suero o dentro de las

células. (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); y Thierry, A.R., et al., pp147-161 en *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). El ácido nucleico terapéutico que está siendo actualmente desarrollado no emplea la química de fosfodiéster básico que se encuentra en ácidos nucleicos naturales debido a estos y otros problemas conocidos.

- 5 Este problema ha sido superado parcialmente por modificaciones químicas que reducen el suero o la degradación intracelular. Las modificaciones han sido probadas en el puente de fosfodiéster internucleótido (por ejemplo, usando enlaces de fosforotioato, metilfosfonato o fosforamidato), en la base nucleótida (por ejemplo, 5-propinil-pirimidinas), o en el azúcar (por ejemplo, azúcares modificados en 2') (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., pp 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Otros han intentado mejorar la estabilidad usando enlaces de azúcar 2'-5' (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.532.130). Se han intentado otros cambios. Sin embargo, ninguna de esas soluciones han probado ser enteramente satisfactorias y los ácidos nucleicos terapéuticos libres *in vivo* todavía solo tienen eficacia limitada.

15 Además, como se mencionó anteriormente con respecto al ARNip y miARN, aún hay problemas con la capacidad limitada de los ácidos nucleicos terapéuticos para cruzar las membranas celulares (ver, Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) y en los problemas asociados con la toxicidad sistémica, tal como la anafilaxia mediada por el complemento, propiedades coaguladoras alteradas y citopenia (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

20 Para intentar mejorar la eficacia, los investigadores también han empleado sistemas portadores basados en lípidos para administrar ácidos nucleicos terapéuticos modificados o no modificados químicamente. En Zelphati, O and Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), los autores se refieren al uso de liposomas (convencionales) aniónicos, liposomas sensibles al pH, inmunoliposomas, liposomas fusogénicas y agregados lipídicos catiónicos/antisentido. De manera similar, se administró sistémicamente ARNip en liposomas catiónicos, y se demostró que estas partículas de ácido nucleico-lípido proporcionan una regulación por disminución mejorada de proteínas objetivo en mamíferos que incluyen primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111-114 (2006)).

25 En este contexto, US 2006/0002991 A1 describe un lípido catiónico sensible al pH así como liposomas respectivos.

A pesar de este progreso, todavía existe una necesidad en la técnica de composiciones de ácido nucleico terapéutico-lípido mejoradas que son adecuadas para el uso terapéutico general. Preferentemente, estas composiciones encapsularían los ácidos nucleicos con alta eficacia, tienen altas relaciones fármaco:lípido, protegen el ácido nucleico encapsulado de la degradación y depuración en suero, son adecuados para la administración sistémica y proporcionan una administración intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas de lípido-ácido nucleico deberían ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado de forma tal que el tratamiento del paciente con una dosis efectiva del ácido nucleico no se asocie con la considerable toxicidad y/o riesgo para el paciente. En la presente se describen tales composiciones, métodos para la elaboración de las composiciones y métodos para usar las composiciones para introducir ácidos nucleicos en las células, que incluye el tratamiento de enfermedades.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una partícula de lípido que comprende un primer lípido catiónico, un segundo lípido catiónico, un lípido neutro, y un lípido de PEG capaz de reducir la agregación; donde el primer lípido catiónico y el segundo lípido catiónico son cada uno, independientemente, seleccionados de los lípidos de la Tabla 9, y las versiones cuaternizadas de estas, y donde el primer lípido catiónico y el segundo lípido catiónico cada uno tienen un pKa que difiere del pKa combinado en al menos 0,1 unidades pKa, al menos 0,2 unidades pKa, o al menos 0,3 unidades pKa.
2. La partícula de lípido del punto 1, donde el lípido neutro se selecciona de DSPC, DPPC, POPC, DOPE, o esfingomielina (SM); y la partícula de lípido comprende además un esteroles.
3. La partícula de lípido del punto 2, donde el primer lípido catiónico está presente en una relación molar de 0 % a 60 % y el segundo lípido catiónico está presente en una relación molar de 0 % a 60 %, siempre y cuando la relación molar de todos los lípidos catiónicos en la partícula sea entre 20 % y 60 %; el lípido neutro está presente en una relación molar de 5 % a 25 %; el esteroles está presente en una relación molar de 25 % a 55 %; y el lípido PEG es PEG-DMA, PEG-DMG, o una combinación de estos, y está presente en una relación molar de 0,5 % a 15 %.
4. La partícula de lípido del punto 1, que comprende además un agente terapéutico, donde el agente terapéutico es un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulador, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.
5. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de lípido del punto 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. La composición farmacéutica del punto 5 para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, donde el agente terapéutico es un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en un ARNip, un microARN, y un oligonucleótido antisentido, y donde el ARNip,

microARN, u oligonucleótido antisentido incluye un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido o un complemento de este.

5 7. La composición farmacéutica del punto 5 para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se caracteriza por la subexpresión de un polipéptido en un sujeto, donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento de este.

8. La composición farmacéutica del punto 5 para usar para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador.

9. La partícula de lípido del punto 4 para usar en la modulación de la expresión de un gen objetivo en una célula.

10 10. La partícula de lípido para usar del punto 9, donde el gen objetivo se selecciona del grupo que consiste en el Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen Ciclina A, gen Ciclina E, gen WNT-1, gen beta-catenina, gen c-MET, gen PKCe, gen NFkB, gen STAT3, gen survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen topoisomerasa I, gen topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27(KIP1), gen PPM1D, gen RAS, gen caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores de tumores, y gen supresor de tumor p53.

Las figuras muestran:

La Fig. 1 es una gráfica que describe la relación entre pK_a y ED_{50} para un grupo de lípidos catiónicos.

La Fig. 2 es una gráfica que describe las relaciones entre pK_a , ED_{50} y el % de carga para un grupo de lípidos catiónicos.

20 Las Fig. 3A-3B son una gráfica que describe los datos de pK_a para un grupo de lípidos catiónicos, medidos individualmente o en una mezcla.

La Fig. 4 es una gráfica que describe la eficacia de diferentes composiciones de partículas de lípidos en un ensayo de inactivación de expresión génica.

25 La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de lípidos catiónicos que proporcionan ventajas cuando se usan en partículas de lípidos para la administración *in vivo* de un agente terapéutico. En particular, tal como se ilustra por los Ejemplos que acompañan, en la presente se describen composiciones de partículas de lípido- ácido nucleico que comprenden un lípido catiónico. En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente proporciona actividad aumentada del ácido nucleico y/o tolerabilidad mejorada de las composiciones *in vivo*, que pueden resultar en un aumento considerable en el índice terapéutico en comparación con las composiciones de partícula de lípido-ácido nucleico previamente descritas. De manera adicional, las composiciones y métodos de uso se describen que pueden posibilitar la mejora de la toxicidad observada con determinadas partículas de ácido nucleico-lípido terapéuticas.

35 En determinadas realizaciones, se describen en la presente composiciones mejoradas para la administración de moléculas de ARNip. En la presente se muestra que estas composiciones son efectivas en la regulación por disminución de los niveles de proteína y/o niveles de ARNm de proteínas objetivo. Además, se muestra que la actividad de estas composiciones mejoradas depende de la presencia de determinados lípidos catiónicos y que la relación molar de lípidos catiónicos en la formulación puede influenciar la actividad.

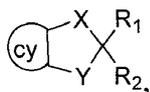
40 Las partículas de lípidos y composiciones descritas en la presente se pueden usar para una variedad de propósitos, que incluyen la administración de agentes terapéuticos encapsulados o asociados a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, en la presente se describen métodos para tratar enfermedades o trastornos en un sujeto que lo necesita, al poner en contacto el sujeto con una partícula de lípido de la presente invención asociada con un agente terapéutico adecuado.

45 Tal como se describe en la presente memoria, las partículas de lípidos son particularmente útiles para la administración de ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, moléculas de ARNip y plásmidos. Por lo tanto, las partículas de lípidos y composiciones descritas en la presente se pueden usar para modular la expresión de genes objetivo y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* al poner en contacto células con una partícula de lípido asociada con un ácido nucleico que reduce la expresión génica objetivo (por ejemplo, un ARNip) o un ácido nucleico que se puede usar para aumentar la expresión de una proteína deseada (por ejemplo, un plásmido que codifica la proteína deseada).

50 Varias realizaciones de ejemplo de los lípidos catiónicos, así como partículas de lípidos y composiciones que la comprenden, y su uso para administrar agentes terapéuticos y para modular la expresión de proteínas y genes, se describen con más detalle a continuación.

Lípidos

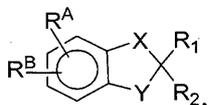
- Los lípidos catiónicos pueden tener determinadas características de diseño que incluye un grupo principal, o una o más colas hidrofóbicas, y un enlazador entre el grupo principal y la una o más colas. El grupo principal puede incluir una amina. En determinadas condiciones, el nitrógeno de amina puede ser un sitio de carga positiva. Por ejemplo, cuando la amina es una amina primaria, secundaria o terciaria, la amina tendrá un pK_a característico; en otras palabras, será sometida a protonación reversible en medio acuoso. El alcance de carga positiva es una función del pK_a y el pH del medio acuoso. La amina puede también ser una amina cuaternaria, en cuyo caso portará una carga positiva sin importar si se encuentra en su forma pura, en medio acuoso, o el pH del medio acuoso.
- El pK_a puede ser influenciada por la estructura del lípido, particularmente la naturaleza del grupo principal; por ejemplo, la presencia, ausencia y ubicación de los grupos funcionales tales como los grupos funcionales aniónicos, grupos funcionales donadores de enlace de hidrógeno, grupos aceptores de enlace de hidrógeno, grupos hidrofóbicos (por ejemplo, grupos alifáticos), grupos hidrofílicos (por ejemplo, hidroxilo o metoxi), o grupos arilo. La amina del grupo principal puede ser una amina catiónica; una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria; el grupo principal puede incluir un grupo amina (monoamina), dos grupos amina (diamina), tres grupos amina (triamina), o una cantidad más grande de grupos amina, como en una oligoamina o poliamina. El grupo principal puede incluir un grupo funcional que es menos fuertemente básico que una amina, tal como, por ejemplo, un imidazol, una piridina, o un grupo de guanidinio. El grupo principal puede ser zwitteriónico. Otros grupos principales son adecuados también.
- La una o más colas hidrofóbicas pueden incluir dos cadenas hidrofóbicas, que pueden ser iguales o diferentes. Las colas pueden ser alifáticas; por ejemplo, pueden estar compuestas de carbono e hidrógeno, ya sea saturado o insaturado pero sin anillos aromáticos. Las colas pueden ser colas de ácidos grasos; algunos de tales grupos incluyen octanilo, nonanilo, decilo, laurilo, miristilo, palmitilo, estearilo, α -linoleilo, estearidonilo, linoleilo, γ -linolenilo, araquidonilo, oleilo, y otros. Otras colas hidrofóbicas son adecuadas también.
- El enlazador puede incluir, por ejemplo, un enlazador de glicérido, un enlazador análogo de glicérido acíclico, o un enlazador cíclico (que incluye un enlazador espiro, un enlazador bicíclico, y un enlazador policíclico). El enlazador puede incluir grupos funcionales tales como un éter, un éster, un fosfato, un fosfonato, un fosforotioato, un sulfonato, un disulfuro, un acetal, un quetal, una imina, una hidrazona o una oxima. Otros enlazadores y grupos principales son adecuados también.
- En las discusiones de varias estructuras de lípidos que siguen a continuación, se contempla que los lípidos incluyen formas cuaternizadas de estos. En otras palabras, los compuestos que incluyen una amina se contemplan para incluir aquellos compuestos relacionados donde la amina se modifica adicionalmente (por ejemplo, alquilada adicionalmente) para proporcionar una amina cuaternaria. Por ejemplo, una amina terciaria puede ser alquilada (por ejemplo, al agregar un metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, u otro grupo cicloalquilo o alquilo sustituido o no sustituido) mediante reacción con un reactivo adecuado. En la técnica se conocen bien tales reactivos.
- Los lípidos pueden ser usados de forma ventajosa en partículas de lípidos ya que la administración *in vivo* de agentes terapéuticos a células incluye lípidos que tienen la siguiente estructura



y sales o isómeros de esta, donde:

- cy es cíclico opcionalmente sustituido, heterociclo o heterocíclico opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido;
- R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alqueno C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquino C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, acilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido o enlace-ligando;
- X e Y son cada uno de manera independiente O o S, alquilo o N(Q); y
- Q es H, alquilo, acilo, ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo o ω -tiofosfoalquilo.

En una realización, el lípido tiene la estructura



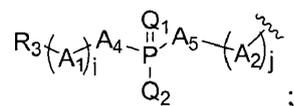
y sales o isómeros de esta, donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquino C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o enlace-ligando;

X e Y son cada uno de manera independiente O o S, alquilo o N(Q);

5 Q es H, alquilo, acilo, alquilamino o alquilfosfato; y

R^A y R^B son cada uno independientemente H, R₃, -Z'-R₃, -(A₂)-Z'-R₃, acilo, sulfonato o



Q₁ es independientemente para cada aparición, O o S;

Q₂ es independientemente para cada aparición, O, S, N(Q), alquilo o alcoxi;

10 Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo o ω-tiofosfoalquilo;

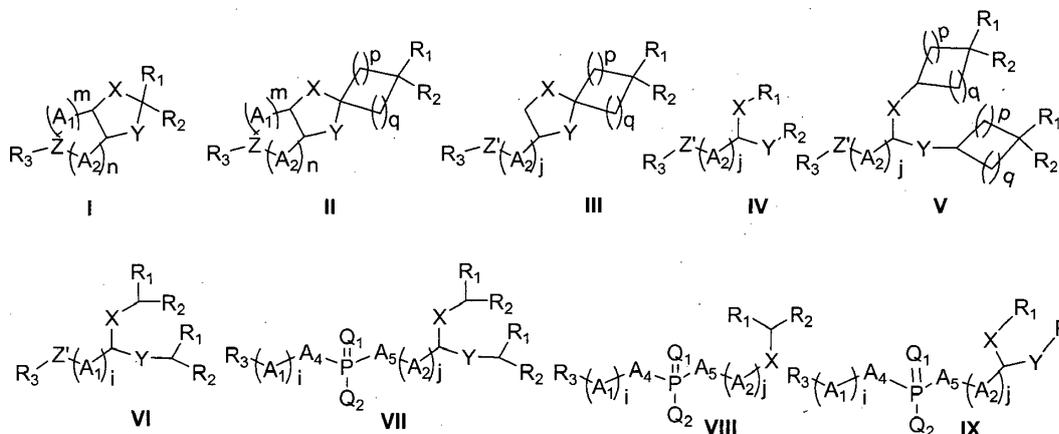
A₁, A₄, y A₅ son cada uno independientemente O, S, CH₂, CHF o CF₂;

Z' es O, S, N(Q) o alquilo;

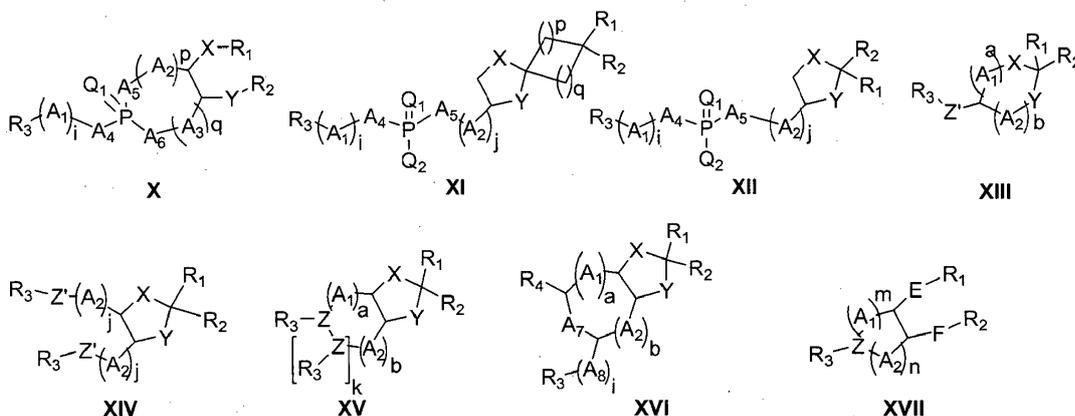
i y j son independientemente 0 a 10; y

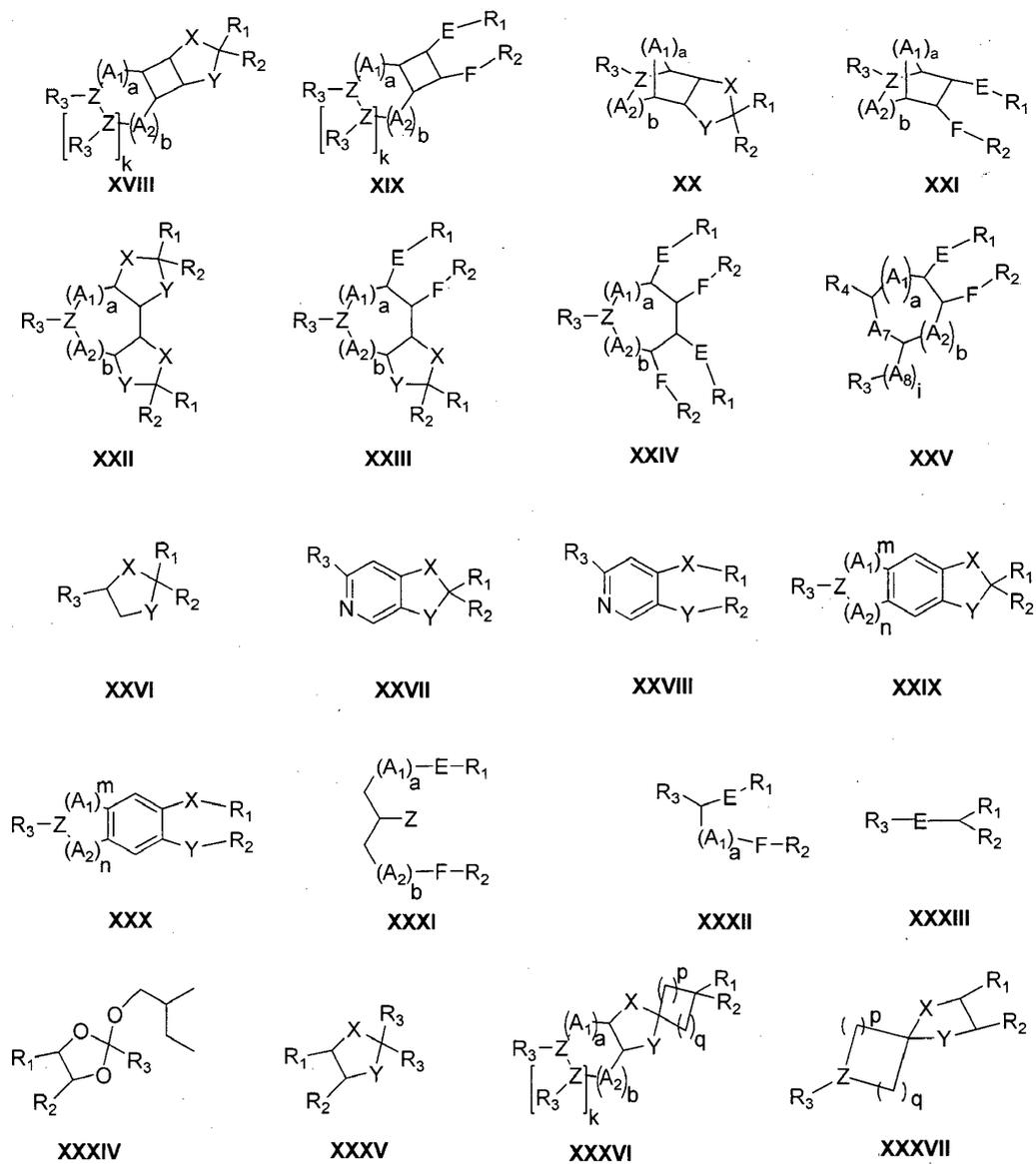
15 R₃ es H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquino C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol (PEG, PM 100-40K), mPEG (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando.

En otro aspecto, el lípido tiene una de las siguientes estructuras, sales o isómeros de estas:



20





5

en donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquino C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o enlazador-ligando;

10 R₃ es independientemente para aparición H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquino C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando;

15 R⁴ es independientemente para cada aparición, H, =O, OR₃ o R₃;

X e Y son cada uno de manera independiente O, S, alquilo o N(Q);

Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo o ω-tiofosfoalquilo;

Q₁ es independientemente para cada aparición, O o S;

Q₂ es independientemente para cada aparición, O, S, N(Q), alquilo o alcoxi;

20 A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ y A₆ son cada uno independientemente O, S, CH₂, CHF o CF₂;

ES 2 749 426 T3

- A₇ es O, S o N(Q);
- A₈ es independientemente para cada aparición CH₂, CHF o CF₂;
- A₉ es -C(O)- o -C(H)(R₃)-;
- 5 E y F son cada uno independientemente para cada aparición O, S, N(Q), C(O), C(O)O, C(O)N, S(O), S(O)₂, SS, O=N, arilo, heteroarilo, cíclico o heterociclo
- Z es N, C(R₃);
- Z' es O, S, N(Q) o alquilo;
- k es 0, 1 o 2;
- m y n son 0 a 5, donde m y n tomados juntos tienen como resultado un anillo de 3, 4, 5, 6, 7 o 8 miembros;
- 10 p es 1 -5;
- q es 0-5, donde p y q tomados juntos tienen como resultado un anillo de 3, 4, 5, 6, 7 o 8 miembros, i y j son 0-10; y a y b son 0-2.
- En una realización, X e Y pueden ser independientemente (CO), O(CO), O(CO)N, N(CO)O, (CO)O, O(CO)O, un sulfonato, o un fosfato.
- 15 En una realización, R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueniloxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquiniloxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o enlazador-ligando.
- 20 En una realización, R₃ es independientemente para cada aparición H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquiheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforotioato opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfonato
- 25 opcionalmente sustituido, fosfonoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquiloamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquiloaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquilo)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido, o enlazador-ligando.
- 30 En una realización, X e Y son cada uno independientemente -O-, -S-, alquileo, -N(Q)-, -C(O)-, -O(CO)-, -OC(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -C(O)O, -OC(O)O-, -OS(O)(Q₂)O-, o -OP(O)(Q₂)O-.
- En una realización, Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo, o ω-tiofosfoalquilo.
- En una realización, Q₂ es independientemente para cada aparición, O, S, N(Q)(Q), alquilo o alcoxi,
- 35 En una realización, A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ y A₆ son cada uno independientemente -O-, -S-, -CH₂-, -CHR⁵-, -CR⁵R⁵-, -CHF- o -CF₂-.
- En una realización, A_s es independientemente para cada aparición -O-, -S-, -CH₂-, -CHR⁵-, -CR⁵R⁵-, -CHF- o -CF₂-.
- En una realización, E y F son cada uno independientemente para cada aparición -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, arileno, heteroarileno, cicloalquileo, o heterociclíleno.
- 40 En una realización, Z es N, o C(R₃).
- En una realización, Z' es -O-, -S-, -N(Q)-, o alquileo.
- En una realización, R⁵ es H, halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, o cicloalquilo opcionalmente sustituido.
- En una realización, i y j son cada uno independientemente 0-10,
- 45 En una realización, a y b son cada uno independientemente 0-2.

En algunas circunstancias, R_3 es ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo, o ω -tiofosfoalquilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. Ejemplos de grupos ω -aminoalquilo(sustituido) incluyen 2-(dimetilamino)etilo, 3-(diisopropilamino)propilo, o 3-(N-etil-N-isopropilamino)-1-metilpropilo.

En una realización, X e Y pueden ser cada uno de manera independiente -O-, -S-, alquileo o -N(Q)-.

5 Se ha descubierto que los lípidos catiónicos que comprenden cadenas alquilo no saturadas son particularmente útiles para formar partículas de ácido nucleico lipídicas con fluidez de membrana aumentada. En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación, por ejemplo, enlace doble o enlace triple.

10 En una realización, solo uno de R_1 o R_2 comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación.

En una realización, ambos R_1 y R_2 comprenden al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación.

En una realización, R_1 y R_2 comprenden diferentes cantidades de insaturación, por ejemplo, uno de R_1 y R_2 tiene un sitio de insaturación y el otro tiene dos o tres sitios de insaturación.

En una realización, ambos R_1 y R_2 comprenden la misma cantidad de sitios de insaturación.

15 En una realización, R_1 y R_2 comprenden diferentes tipos de insaturación, por ejemplo, insaturación en uno de R_1 y R_2 es enlace doble y en la otra insaturación es enlace triple.

En una realización, ambos R_1 y R_2 comprenden el mismo tipo de insaturación, por ejemplo enlace doble o enlace triple.

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 comprende al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

20 En una realización, solo uno de R_1 o R_2 comprende al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

En una realización, ambos R_1 y R_2 comprenden al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

En una realización, R_1 y R_2 son ambos iguales, por ejemplo, R_1 y R_2 son ambos linoleilo (C18) o R_1 y R_2 son ambos heptadeca-9-enilo.

En una realización, R_1 y R_2 son diferentes entre sí.

25 En una realización, al menos uno de R_1 y R_2 es colesterol.

En una realización, uno de R_1 y R_2 es enlazador-ligando.

En una realización, uno de R_1 y R_2 es enlazador-ligando y el ligando es un lipófilo.

30 En una realización, al menos uno de R_1 y R_2 comprende al menos un grupo CH_2 con uno o ambos H reemplazados por F, por ejemplo, CHF o CF_2 . En una realización, ambos R_1 y R_2 comprenden al menos un grupo CH_2 con uno o dos H reemplazados por F, por ejemplo, CHF o CF_2 .

En una realización, solo uno de R_1 y R_2 comprende al menos un grupo CH_2 con uno o ambos H reemplazados por F.

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 termina en CH_2F , CHF_2 o CF_3 . En una realización, ambos R_1 y R_2 terminan en CH_2F , CHF_2 o CF_3 .

35 En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CF}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_y\text{-CH}_3$, donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, ambos R_1 y R_2 son $-(\text{CF}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_y\text{-CH}_3$, donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CH}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_3$, donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

40 En una realización, ambos R_1 y R_2 son $-(\text{CH}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_3$, donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_2\text{-CF}_3$, donde cada y es independientemente 1-10,

En una realización, ambos R_1 y R_2 son $-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_2\text{-CF}_3$, donde cada y es independientemente 1-10,

45 En algunas realizaciones, R_1 y R_2 son independientemente seleccionados del grupo que consiste en lineolilo, γ -linoenilo, n-octadecanilo, n-decanilo, n-dodecanilo, y 9-metiloctadecanilo. En algunas realizaciones, el lípido puede

tener (R_1 , R_2) que se selecciona del grupo que consiste en (lineolilo, lineolilo), (γ -linoenilo, γ -linoenilo), (lineolilo, n-octadecanilo), (lineolilo, n-decanilo), (lineolilo, n-dodecanilo), y (9-metiloctadecanilo, 9-metiloctadecanilo).

En una realización, R_3 se elige de un grupo que consiste en metilo, etilo, poliamina, $-(CH_2)_h$ -heteroarilo, $-(CH_2)_h$ -N(Q)₂, $-O-N(Q)_2$, $-(CH_2)_h$ -Z'-(CH₂)_h-heteroarilo, enlazador-ligando, $-(CH_2)_h$ -heterociclo, y $-(CH_2)_h$ -Z''-(CH₂)_h-heterociclo, donde cada h es independientemente 0-13 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, cuando Z es C(R_3), al menos un R_3 es ω -aminoalquilo o ω -aminoalquilo(sustituido).

En una realización, cuando Z' es O, S o alquilo, al menos un R_3 es ω -aminoalquilo o ω -aminoalquilo(sustituido).

En una realización, Q es un enlazador-ligando.

En una realización, el ligando es péptido fusogénico.

10 En una realización, el lípido es una mezcla racémica.

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

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

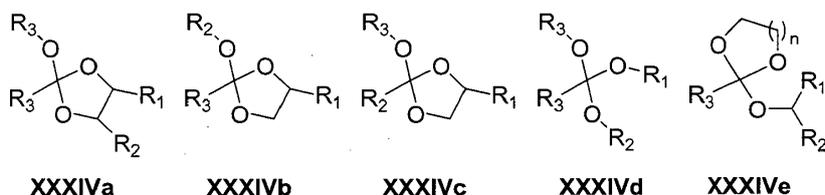
15 En una realización, el lípido es quiralmente puro, por ejemplo, es un solo isómero óptico.

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

Donde hay un enlace doble presente (por ejemplo, un enlace doble carbono-carbono o enlace doble carbono-nitrógeno), puede haber isomerismo en la configuración sobre el enlace doble (es decir, cis/trans o isomerismo E/Z).

20 Donde la configuración de un enlace doble es ilustrado en una estructura química, se entiende que el isómero correspondiente también puede estar presente. La cantidad de isómero presente puede variar, dependiendo de las estabildades relativas de los isómeros y la energía requerida para convertir entre los isómeros. Por consiguiente, algunos enlaces dobles están, para fines prácticos, presentes en una sola configuración, mientras que otros (por ejemplo, donde las estabildades relativas son similares y la energía de conversión baja) pueden estar presentes como mezcla de equilibrio inseparable de configuraciones.

25 En otro aspecto, se describe en la presente un compuesto de la fórmula XXXIVa, XXXIVb, XXXIVc, XXXIVd, o XXXIVe, sales o isómeros de estos:



en donde:

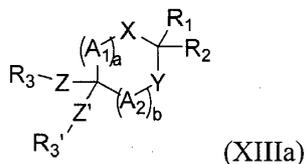
30 R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido;

35 R_3 es independientemente para cada aparición H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforotioato opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfonato opcionalmente sustituido, fosfonoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquiloamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquiloaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquilo)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido; y

n es 1, 2 o 3.

45 En algunas realizaciones, R_3 es heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquilaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquil)aminoalquilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido.

En un aspecto, el lípido es un compuesto de la fórmula XIIIa:



en donde:

5 R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido;

10 R₃ y R_{3'} son independientemente para cada aparición H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforotioato opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilofosfonato
15 opcionalmente sustituido, fosfonoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquiloamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquiloaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquilo)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido;

o R₃ y R_{3'} pueden ser tomados juntos con los átomos a los que están unidos para formar un carbociclilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituidos; cada uno de los cuales está sustituido con 0-4 apariciones de R₄;

20 cada R₄ se selecciona independientemente de alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquilaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquilo)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido;

25 X e Y son cada uno de manera independiente -O-, -S-, alquileo, o -N(Q)-;

Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo o ω-tiofosfoalquilo;

A₁ y A₂ son cada uno independientemente -O-, -S-, o -CR⁵R⁵-; y

R⁵ es H, halo, ciano, hidroxil, amino, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, o cicloalquilo
30 opcionalmente sustituido; y

Z y Z' son cada uno independientemente seleccionados de -O-, -S-, -N(Q)-, alquileo o ausente; y

a y b son cada uno independientemente 0-2.

En algunas realizaciones, X e Y son cada uno independientemente O.

En algunas realizaciones, la suma de a y b es 1, 2, o 3.

En algunas realizaciones, A₁ y A₂ son cada uno independientemente -CR⁵R⁵-.

35 En algunas realizaciones, Z y Z' son cada un enlace.

En algunas realizaciones, R₃ y R_{3'} pueden ser tomados juntos con los átomos a los que están unidos para formar un carbociclilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.

40 En algunas realizaciones, R₃ y R_{3'} pueden ser tomados juntos con los átomos a los que están unidos para formar un carbociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con amino, alquilamino o dialquilamino).

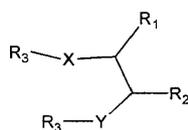
En algunas realizaciones, R₃ y R_{3'} pueden ser tomados juntos con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un nitrógeno que contiene heterociclilo).

En algunas realizaciones, R₃ y R_{3'} son tomados juntos para formar un anillo carbocíclico (por ejemplo, ciclohexilo) sustituido con 0-3 apariciones de R₄.

En algunas realizaciones, R_3 y R_3' son tomados juntos para formar un anillo heterocíclico (por ejemplo, piperidina) sustituido con 0-3 apariciones de R_4 .

- 5 En algunas realizaciones, cada R_4 se selecciona independientemente de opcionalmente amino opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquilaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquil)aminoalquilo opcionalmente sustituido, e hidroxialquilo opcionalmente sustituido.

En un aspecto, el lípido es un compuesto de la fórmula XXXIX, sales o isómeros de esta:



XXXIX

en donde:

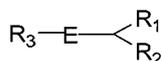
- 10 R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, acilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido o enlazador-ligando;

- 15 R_3 es independientemente para aparición H, alquilo C_1 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquenilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquinilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω -aminoalquilos, ω -aminoalquilos(sustituidos), ω -fosfoalquilos, ω -tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando;

X e Y son cada uno de manera independiente O, C(O)O, S, alquilo o N(Q);

Q es H, alquilo, ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo o ω -tiofosfoalquilo;

- 20 En un aspecto, el lípido es un compuesto de la fórmula XXXIII, sales o isómeros de esta



XXXIII

en donde:

- 25 R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, acilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido o enlazador-ligando;

- 30 R_3 es H, alquilo C_1 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquenilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquinilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω -aminoalquilos, ω -aminoalquilos(sustituidos), ω -fosfoalquilos, ω -tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando;

E es O, S, N(Q), C(O)O, C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)2N(Q), S(O)2, N(Q)S(O)2, SS, O=N, arilo, heteroarilo, cíclico o heterociclo; y,

Q es H, alquilo, ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo o ω -tiofosfoalquilo.

- 35 En una realización, R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alcoxi C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alqueniloxi C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquiniloxi C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, o acilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido.

- 40 En otra realización, R_3 es H, alquilo C_1 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquenilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquinilo C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquilheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforotioato opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfonato opcionalmente sustituido,

5 fosfoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquiloamino opcionalmente sustituido, di(alquilo)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquiloaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquilo)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido, o enlazador-ligando.

En aun otra realización, E es -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -N(Q)C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -OC(O)N(Q)-, S(O), -N(Q)S(O)₂N(Q)-, -S(O)₂-, -N(Q)S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, -C(O)-N(Q)-N=, -N(Q)-N=, -N(Q)-O-, -C(O)S-, arileno, heteroarileno, ciclalquileno o heterociclileno.

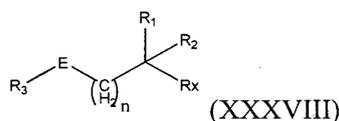
En otra realización, Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo o ω-tiofosfoalquilo.

10 En otra realización, el lípido es un compuesto de la fórmula XXXIII, donde E es O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, arilo, heteroarilo, cíclico o heterociclo.

15 En una realización, el lípido es un compuesto de la fórmula XXXIII, donde R₃ es H, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando.

20 En aun otra realización, el lípido es un compuesto de la fórmula XXXIII, donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o enlazador-ligando.

En una realización, se describe en la presente un lípido de la fórmula XXXVIII:



en donde

25 E es O, S, N(Q), C(O)O, C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, arilo, heteroarilo, cíclico o heterociclo;

Q es H, alquilo, ω-aminoalquilo, ω-aminoalquilo(sustituido), ω-fosfoalquilo o ω-tiofosfoalquilo;

30 R₁ y R₂ y R_x son cada uno independientemente para cada aparición H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o enlazador-ligando, siempre que al menos uno de R₁, R₂ y R_x no es H;

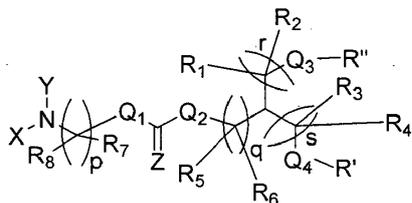
35 R₃ es H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, PM 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (PM 120-40K), heteroarilo, heterociclo o enlazador-ligando; n es 0, 1, 2, o 3.

En algunas realizaciones, cada uno de R₁ y R₂ son independientemente para cada aparición alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o enlazador-ligando.

En algunas realizaciones, R_x es H o alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido.

40 En algunas realizaciones, R_x es alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o enlazador-ligando.

En un aspecto, se describe en la presente un lípido de la siguiente fórmula XL,



XL

en donde:

Q₁ es O, S, CH₂, CHMe, CMe₂, N(R);

5 Q₂ es O, S, CH₂, CHMe, CMe₂, N(R), C(H)=N-N(R)-, N(R)-N=C(H), -C(H)=N-O-, -O-N=C(H), C(H)=N-N(R)-C(O)-, -C(O)-N(R)-N=C(H)

Q₃ y o Q₄ es O, S, N(R), Q₁-C(=Z)Q₂, C(H)=N-N(R)-, N(R)-N=C(H); -C(H)=N-O-, -O-N=C(H); C(H)=N-N(R)-C(O)-, -C(O)-N(R)-N=C(H);

Z = O, S, N(R) o está ausente y cuando Z está ausente C(=Z) es C(R_n)₂

10 p es 0 a 20; q es 0 a 10; r es 0 a 6; s es 0 a 6.

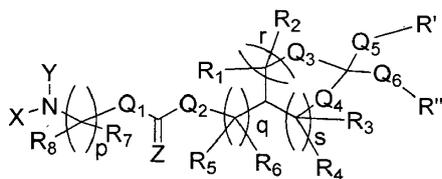
R' y/o R'' son: alquilo, alquilos sustituidos, alquénilos, alquénilos sustituidos, alquínilos, alquínilos sustituidos y combinaciones de estos con cantidad de átomos de carbono en la cadena que varían de 4 a 30, R' y/o R'' con cadena alquénilo tiene al menos un resto C=C o C=C sustituido y cuando hay más de un resto C=C presente, están separados por al menos un grupo metileno o metileno sustituido. R' y/o R'' con cadena alquínilo tiene al menos un resto C≡C y cuando hay más de un resto C≡C presente, están separados por al menos un grupo metileno o metileno sustituido. Uno o más de metileno o metileno sustituido es interrumpido por átomos hetero tales como O, S o N(R). El enlace o enlaces dobles en la cadena alquilo son todos con configuración *cis* o *trans* o combinación de ambas. La estereoquímica de centro quiral de la fórmula XL es R, S o *racémica*.

20 R es H, R', aminoalquilos ω-sustituidos, aminoalquénilos ω-sustituidos, aminoalquínilos ω-sustituidos con cantidad de átomos de carbono en la cadena que varía de 1 a 30,

R₁ a R_n cada aparición es R;

X es: R, C(O)-NH(R), C(O)NR₂, C(=NR) NH(R), C(=NR) NR₂, N(R)-C(O)Y e Y es independientemente X.

En un aspecto, se describe en la presente un lípido de la siguiente fórmula XLI,



XLI

25 en donde:

Q₁ es O, S, CH₂, CHMe, CMe₂, N(R);

Q₂ es O, S, CH₂, CHMe, CMe₂, N(R), C(H)=N-N(R)-, N(R)-N=C(H), -C(H)=N-O-, -O-N=C(H), C(H)=N-N(R)-C(O)-, -C(O)-N(R)-N=C(H)

Q₃ y o Q₄ es O, S, N(R), CH₂, metileno sustituido;

30 Q₅ y o Q₆ es O, S, N(R), CH₂, metileno sustituido

Z = O, S, N(R) o está ausente y cuando Z está ausente C(=Z) es C(R_n)₂

p es 0 a 20; q es 0 a 10; r es 0 a 6; s es 0 a 6.

R' y/o R'' son: alquilo, alquilos sustituidos, alquénilos, alquénilos sustituidos, alquínilos, alquínilos sustituidos y combinaciones de estos con cantidad de átomos de carbono en la cadena que varían de 4 a 30, R' y/o R'' con

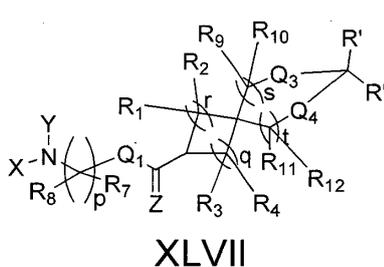
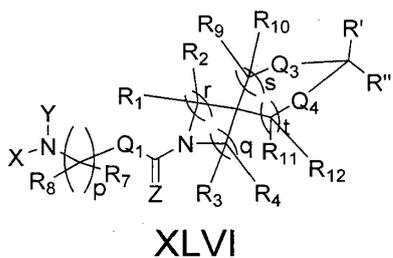
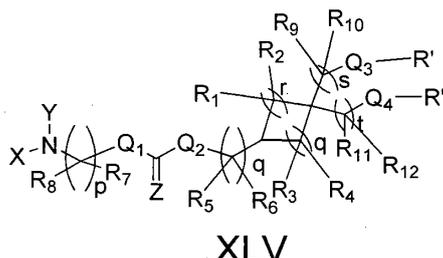
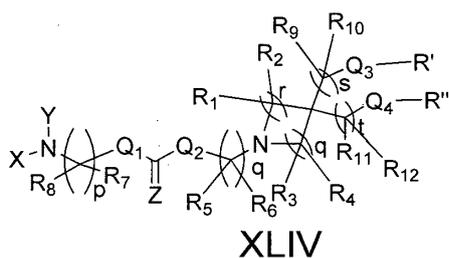
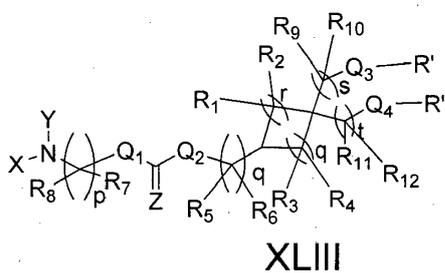
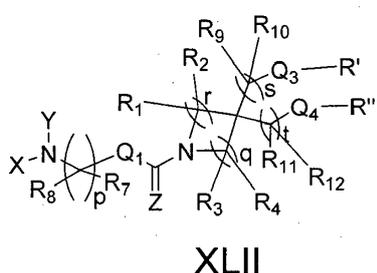
cadena alqueno tiene al menos un resto C=C o C=C sustituido y cuando hay más de un resto C=C presente, están separados por al menos un grupo metileno o metileno sustituido. R' y/o R'' con cadena alqueno tiene al menos un resto C≡C y cuando hay más de un resto C≡C presente, están separados por al menos un grupo metileno o metileno sustituido. Uno o más de metileno o metileno sustituido es interrumpido por átomos hetero tales como O, S o N(R). El enlace o enlaces dobles en la cadena alquilo son todos con configuración *cis* o *trans* o combinación de ambas. La estereoquímica de centro quiral de la fórmula XLI es *R*, *S* o *racémica*.

R es H, R', aminoalquilo ω-sustituido, aminoalqueno ω-sustituido, aminoalquilo ω-sustituido con cantidad de átomos de carbono en la cadena que varía de 1 a 30

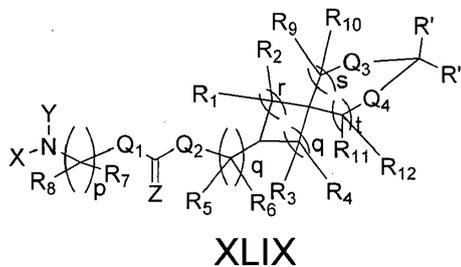
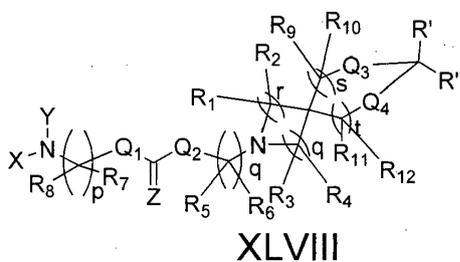
R₁ a R_n cada aparición es R;

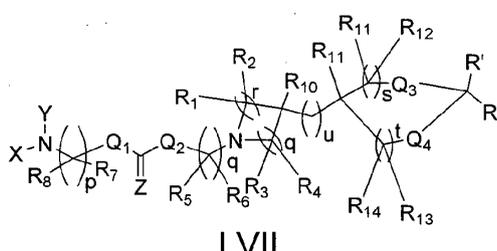
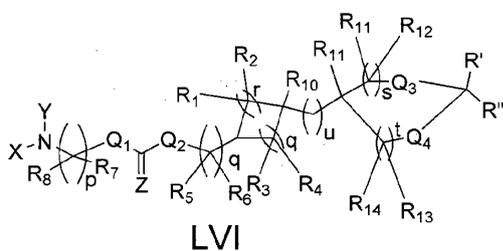
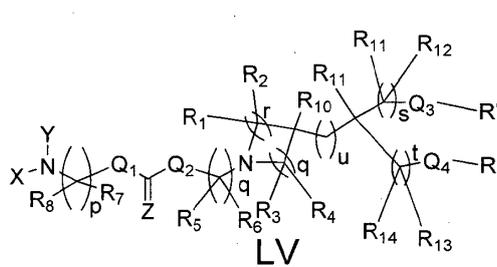
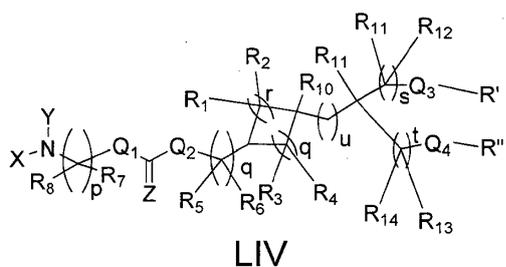
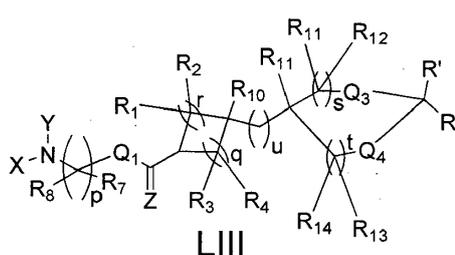
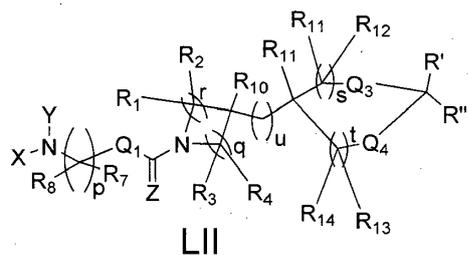
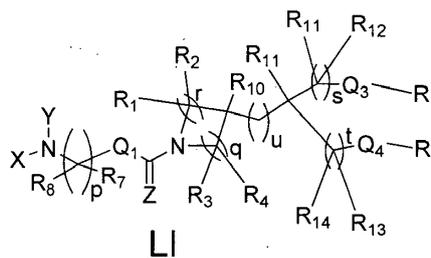
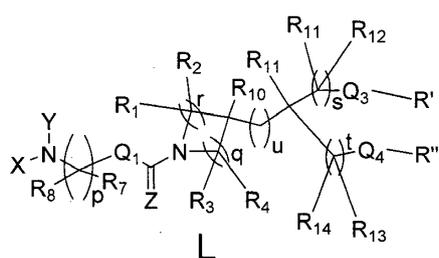
10 X es: R, C(O)-NH(R), C(O)NR₂, C(=NR) NH(R), C(=NR) NR₂, N(R)-C(O)Y e Y es independientemente X.

En otro aspecto, se describe en la presente un lípido de una de las fórmulas siguientes XLII, XLIII, XLIV, XLV, XLVI, XLVII, XLVIII, o XLIX



15

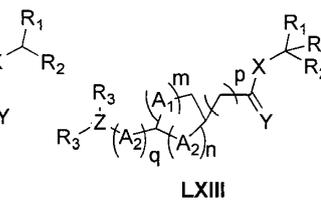
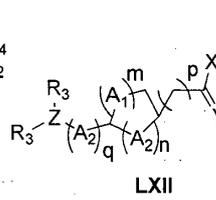
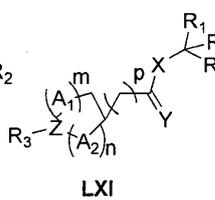
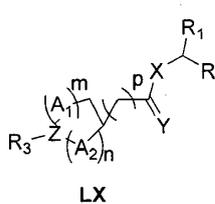


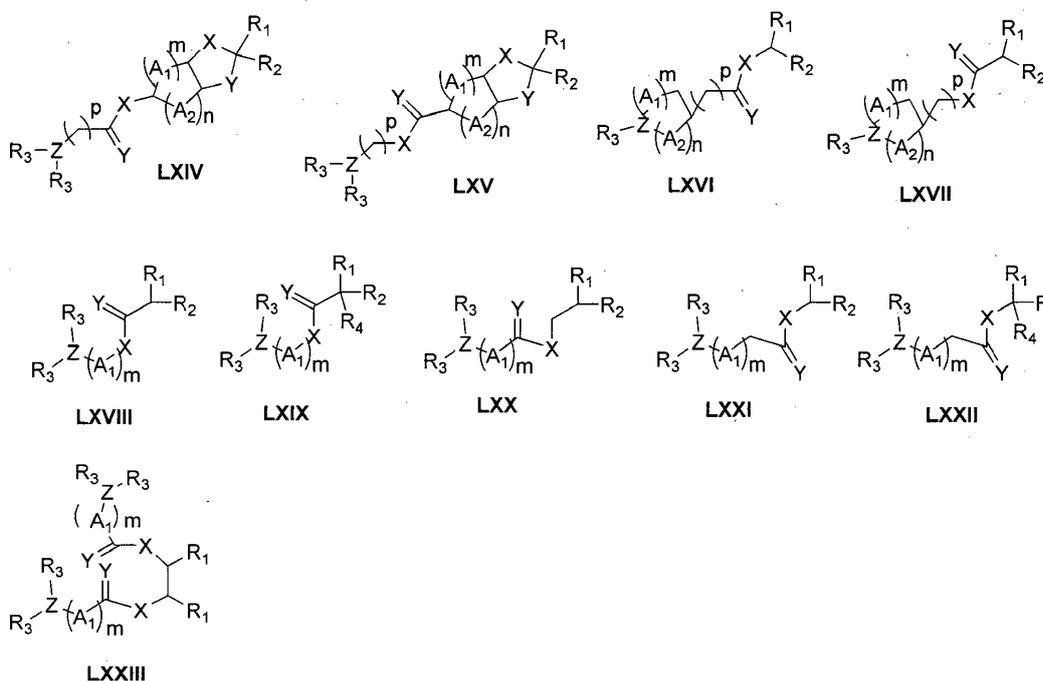


5 Donde las variables recitadas anteriormente son tal como se describe en la presente memoria y donde para los compuestos de las fórmulas anteriores: p es 0 a 20; q es 0 a 10; r es 0 a 6; s es 0 a 6, t es 0 a 6 y u es 0 a 10 y las otras variables son tal como se describe anteriormente.

En la presente se describe la síntesis de lípidos descritos en la presente en forma racémica así como ópticamente pura.

10 En un aspecto, se describe en la presente un lípido de la fórmula proporcionada a continuación:



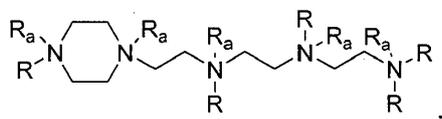


5 en donde X = O, S, CH₂, N(Q₃) donde Q es H, Me, Et, -(CH₂)_r-N(Q₃, Q₄); Y = O, S, CH₂, N(Q₃) donde Q es H, Me, Et, -(CH₂)_r-N(Q₃, Q₄); Z = N, CH, C(Me), C(Et); Q₁ = O o S; Q₂ = O o S; A₁, A₂, = CH₂, CHF, CF₂; m, n, p y/o q es independientemente 0 a 5.

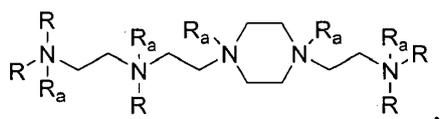
En la presente se describe la síntesis de lípidos catiónicos descritos anteriormente en forma racémica así como ópticamente pura.

10 R₁, R₂ y R₄ son cada uno independientemente seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen aproximadamente 10 a 30 átomos de carbono, donde R₁, R₂ y R₄ comprende independientemente: cadena alquilo completamente saturada, al menos un enlace doble, al menos un enlace triple, al menos un átomo hetero, al menos un CF₂, al menos un CHF o al menos una cadena perfluoroalquilada. CF₂/CHF podría estar en el ancla del lípido o en el núcleo. R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en: H y alquilos C₁-C₁₀, alquenos C₁-C₁₀, alquinos C₁-C₁₀, alquilheterociclos, alquilfosfatos, alquilfosforotioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituídos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, PEG con intervalo PM de 100 - 15 40000, mPEG con intervalo PM de 120 - 40000, heterociclos tales como imidazolos, triazolos, piridinas, pirimidinas, purinas, piridinas sustituidas, espaciador PEF/alquil que contiene ligandos que se dirigen al receptor tales como GalNAc, ácido fólico, manosa, Fucosa, naproxeno, ibuprofeno y los ligandos incluyen pequeñas moléculas que se unen a quimiocinas, integrinas, somatostatina, receptores de CNS y andrógeno. R₃ también cubre los ligandos 20 anteriores sin espaciador entre los lípidos núcleo/ancla.

En una realización, el lípido puede ser un compuesto que tiene la fórmula:



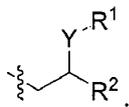
o que tiene la fórmula:



25 o una mezcla de estos.

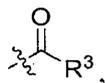
Cada R_a, independientemente, está ausente, es H, alquilo o cicloalquilo. En una realización, R_a es alquilo o cicloalquilo para no más de dos apariciones. En una realización, R_a es alquilo o cicloalquilo para no más de una aparición.

En una realización, R, para al menos 3 apariciones, es

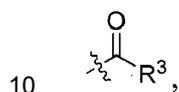


En una realización, Y es O o NR⁴. En una realización, Y es O. En una realización, Y es O para cada aparición. En una realización, R¹ es H. En una realización, R¹ es H para cada aparición.

5 En una realización, R¹ es

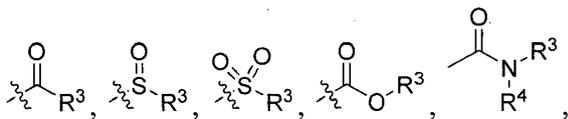


donde R³ alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, o heteroalquinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes (por ejemplo, un sustituyente hidrofílico). En una realización, R¹ es

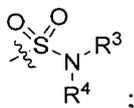


y R³ alquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes (por ejemplo, un sustituyente hidrofílico). En una realización, R³ es sustituido con -OH.

En una realización, R¹ es R³,

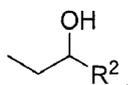


15 o



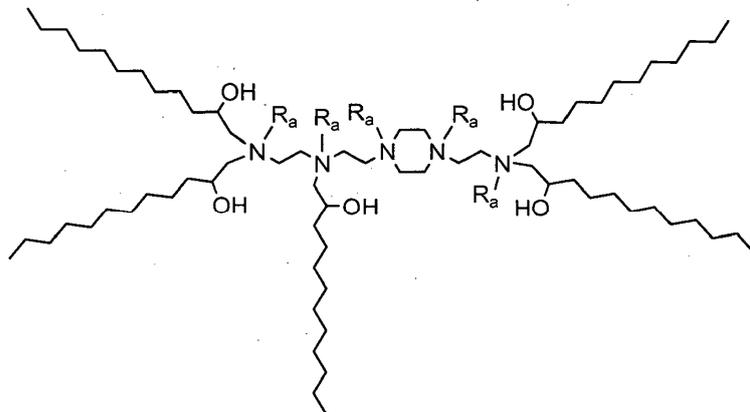
20 donde R³ alquilo es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. En una realización, R³ es sustituido con un sustituyente hidrofílico. R⁴, para cada aparición es independientemente H alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. En una realización, R³ es sustituido con -OH. En una realización, R² es alquilo, alquenilo o alquinilo. En una realización, R² es alquilo (por ejemplo, alquilo C₆-C₁₈, por ejemplo, alquilo C₈-C₁₂, por ejemplo, alquilo C₁₀).

En una realización, R, para al menos 3 (por ejemplo, al menos 4 o 5) apariciones, es

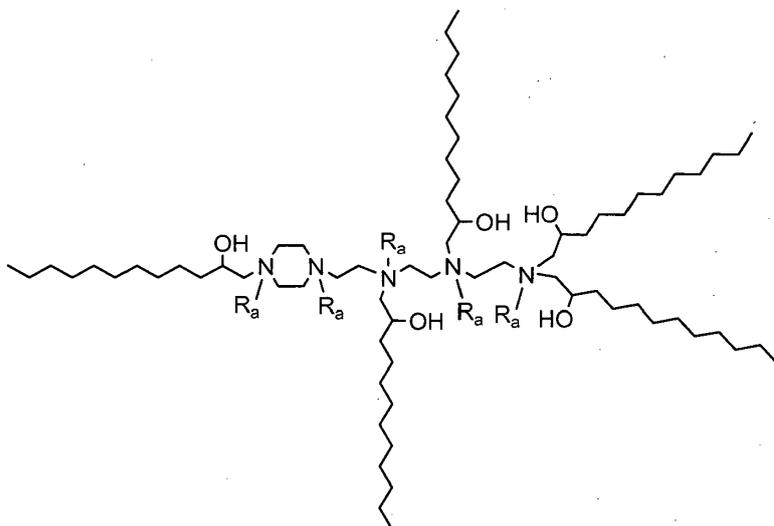


25 En una realización, R² es alquilo (por ejemplo, alquilo C₆-C₁₈, por ejemplo, alquilo C₈-C₁₂, por ejemplo, alquilo C₁₀). En una realización, R para al menos 1 aparición (por ejemplo, 1 o 2 apariciones) es H.

El lípido puede ser un compuesto que tiene la fórmula:



o un compuesto que tiene la fórmula:

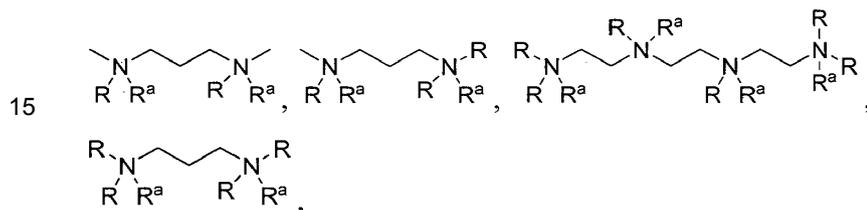


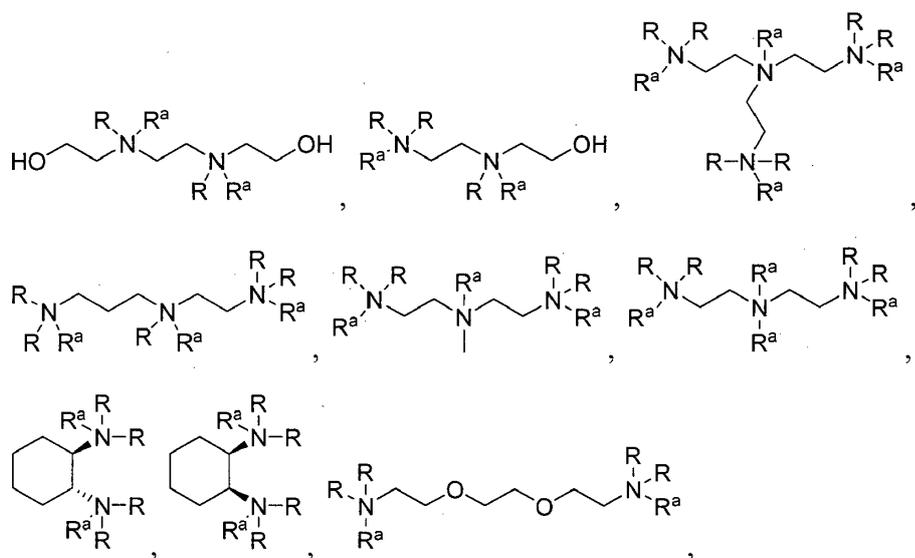
5 o una mezcla de estos.

En una realización, no más de dos instancias de R_a son alquilo o cicloalquilo. En una realización, no más de una instancia de R_a son alquilo o cicloalquilo. En una realización, una o dos instancias de R_a son metilo, y las instancias restantes de R_a están cada una ausentes o son H.

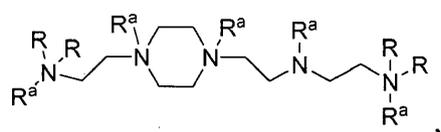
10 En algunas realizaciones, el lípido puede ser un lípido cuaternario derivado de los compuestos descritos en Akinc, A., et al., "Development of lipidoid-siRNA formulations for systemic delivery of RNAi therapeutics," Nat. Biotechnol. 26, (2008), 561-569; Love, K.T., et al., "Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing," PNAS 107, 5, (2010), 1864-1869; o Mahon, K.P., et al., "Combinatorial approach to determine functional group effects on lipidoid-mediated siRNA delivery," Bioconjug Chem. 18 de agosto de 2010; 21(8):1448-54.

Por ejemplo, el lípido puede tener una de las siguientes fórmulas:



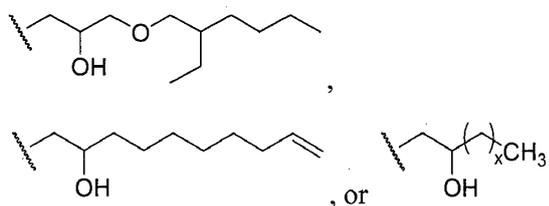


o



5

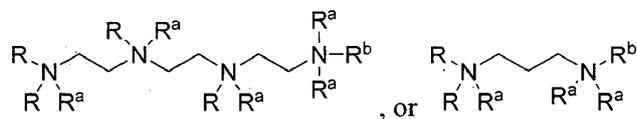
donde R es



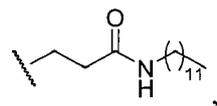
10

Donde x es 3-15, y cada R^a, independientemente, está ausente, es H, alquilo o cicloalquilo. En algunos casos, R^a es alquilo o cicloalquilo para no más de dos apariciones, o R^a puede ser alquilo o cicloalquilo para no más de una aparición. En algunos casos, R^a es metilo.

En otro ejemplo, el lípido puede tener una de las siguientes fórmulas:

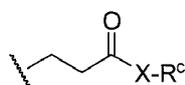


donde R es

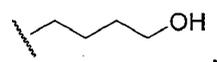


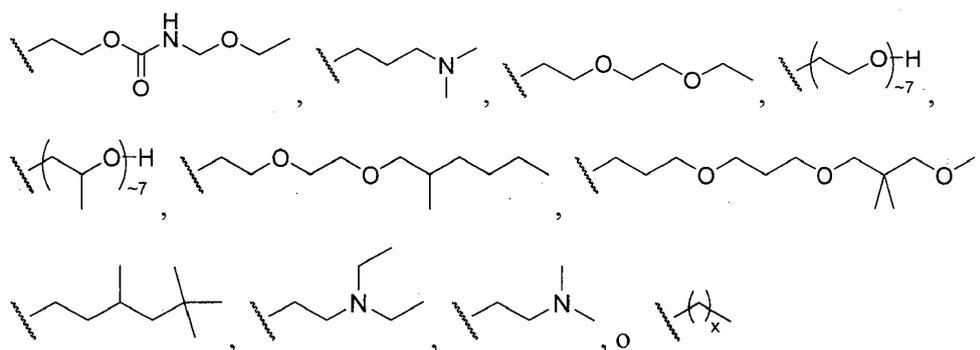
15

R^b es



donde X es O o NH y R^c es





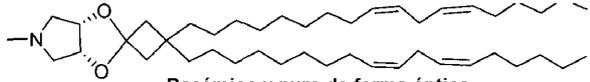
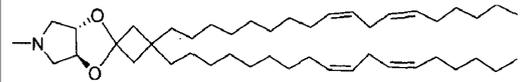
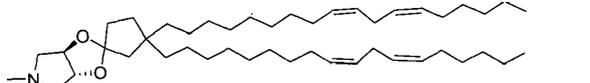
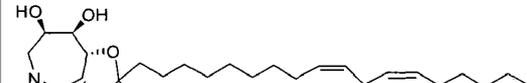
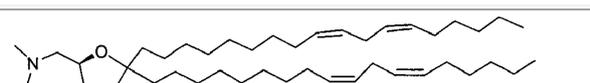
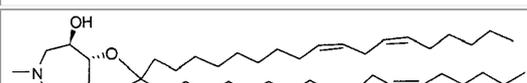
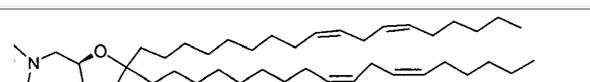
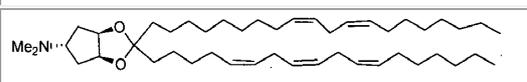
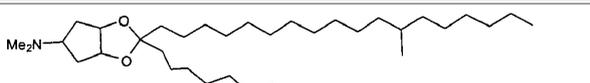
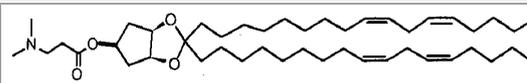
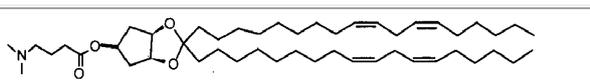
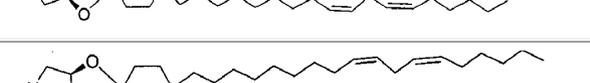
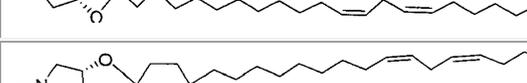
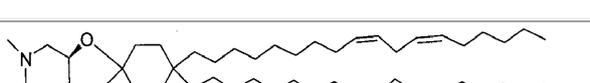
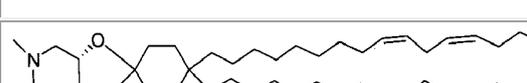
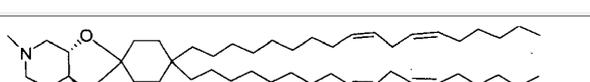
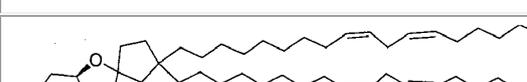
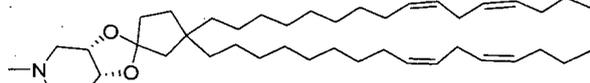
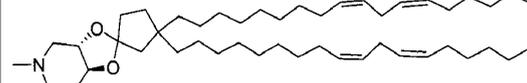
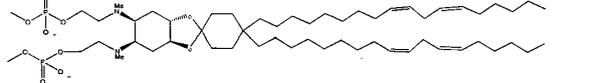
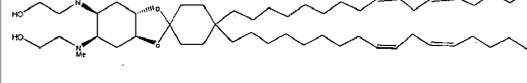
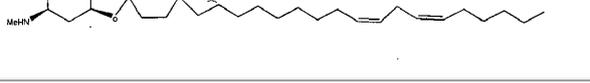
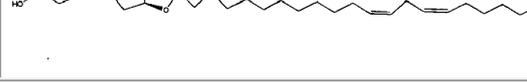
5 Donde x es 7-17, y cada R^a, independientemente, está ausente, es H, alquilo o cicloalquilo. En algunos casos, R^a es alquilo o cicloalquilo para no más de dos apariciones, o R^a puede ser alquilo o cicloalquilo para no más de una aparición. En algunos casos, R^a es metilo.

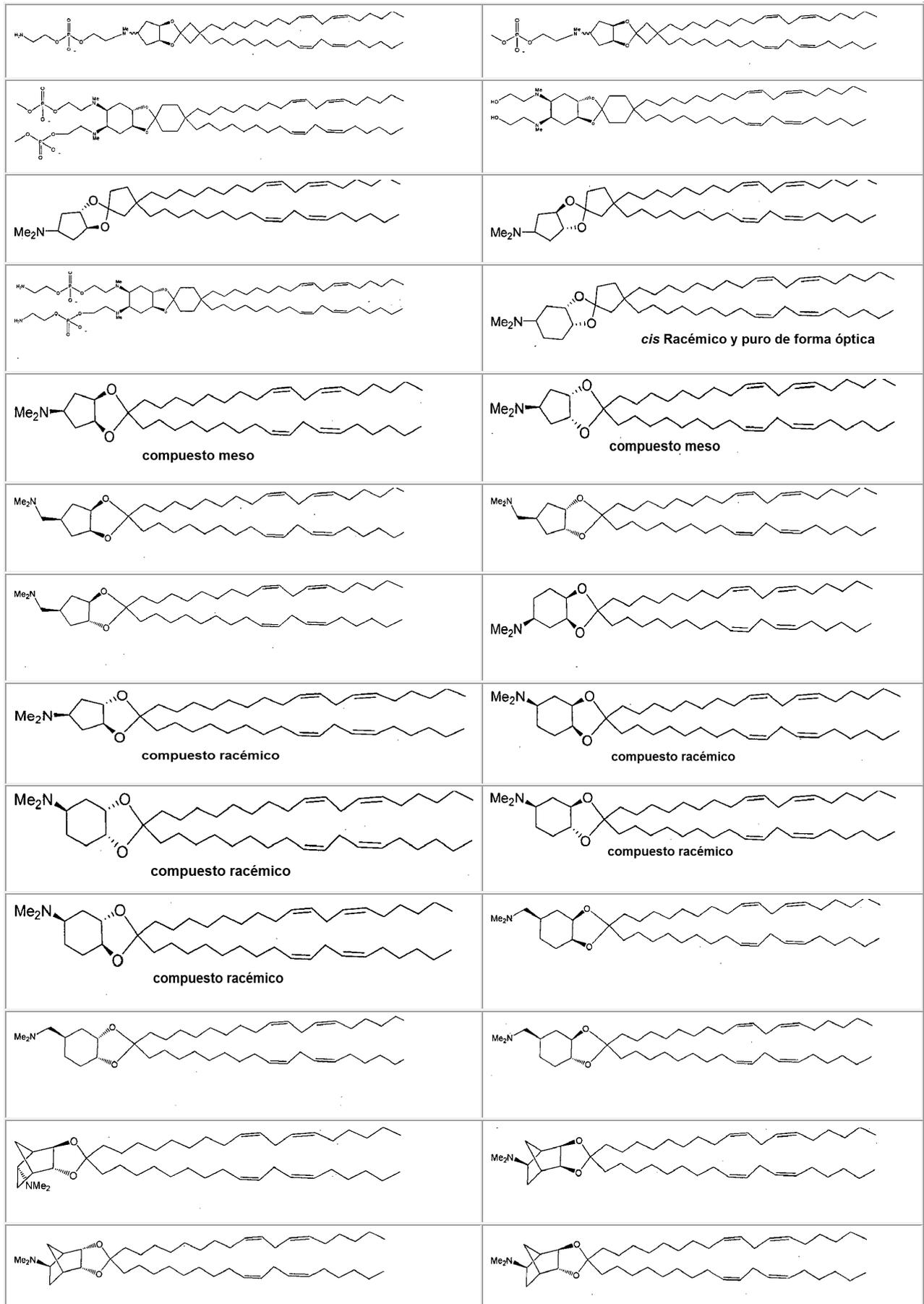
En las tablas que siguen, las formas cuaternizadas (por ejemplo, donde el nitrógeno de amina está adicionalmente modificado, tal como alquilado adicionalmente, para proporcionar una amina cuaternaria) de los lípidos descritos también se contemplan.

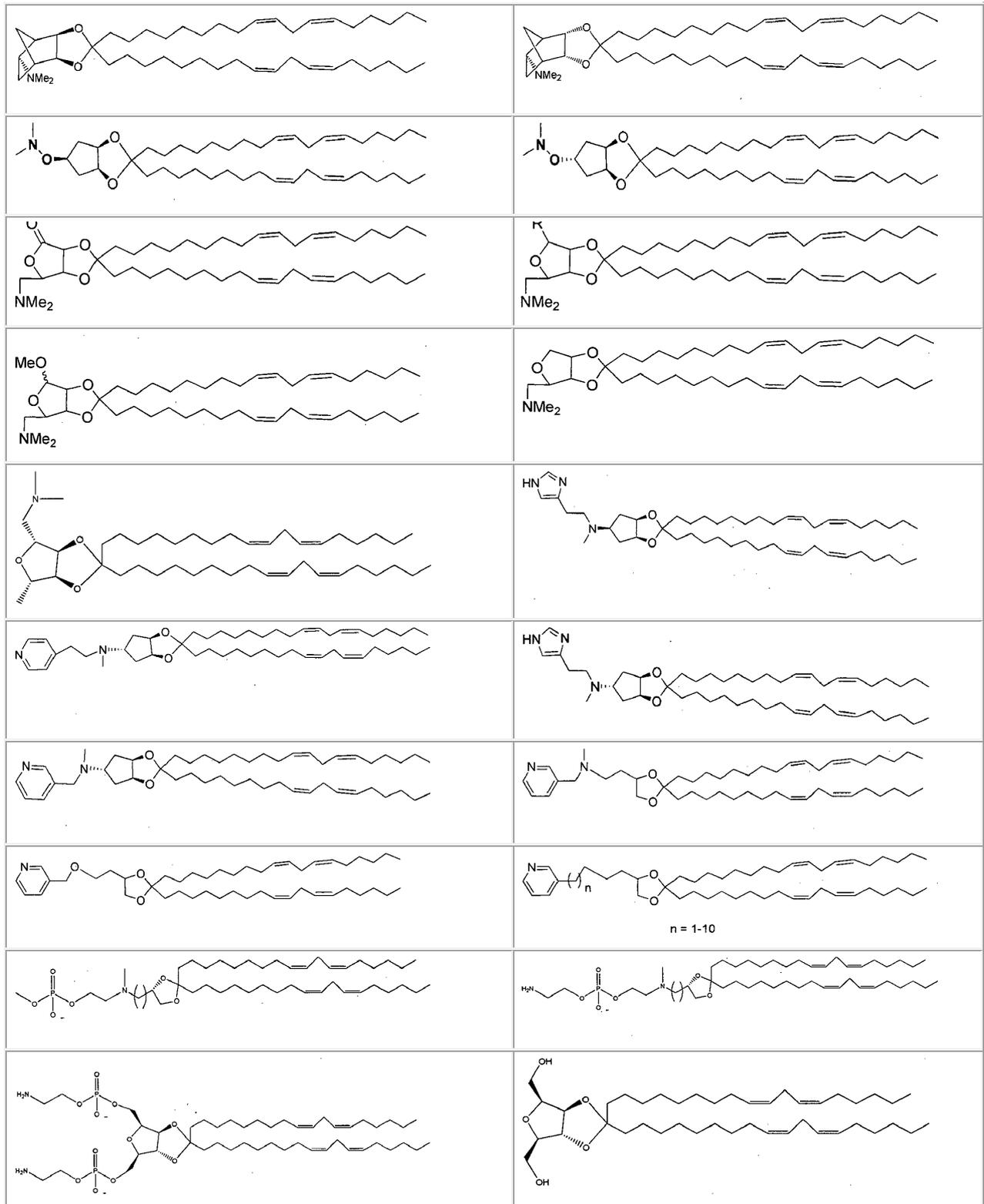
10 **Tabla 1: Algunos lípidos catiónicos de ejemplo**

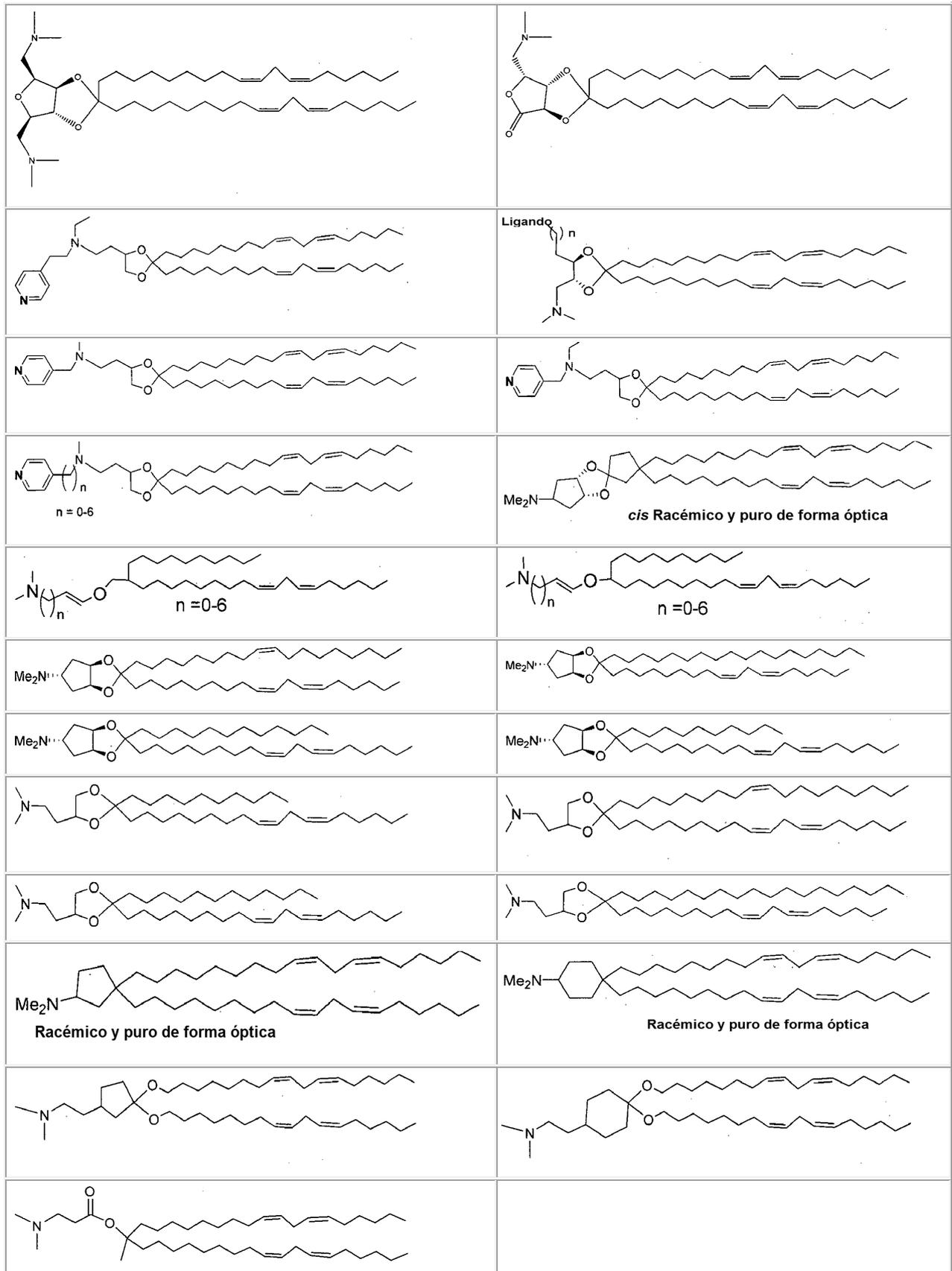
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 Racémico, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 Racémico, <i>trans</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>
 meso, <i>cis</i>	 Racémico, <i>trans</i>

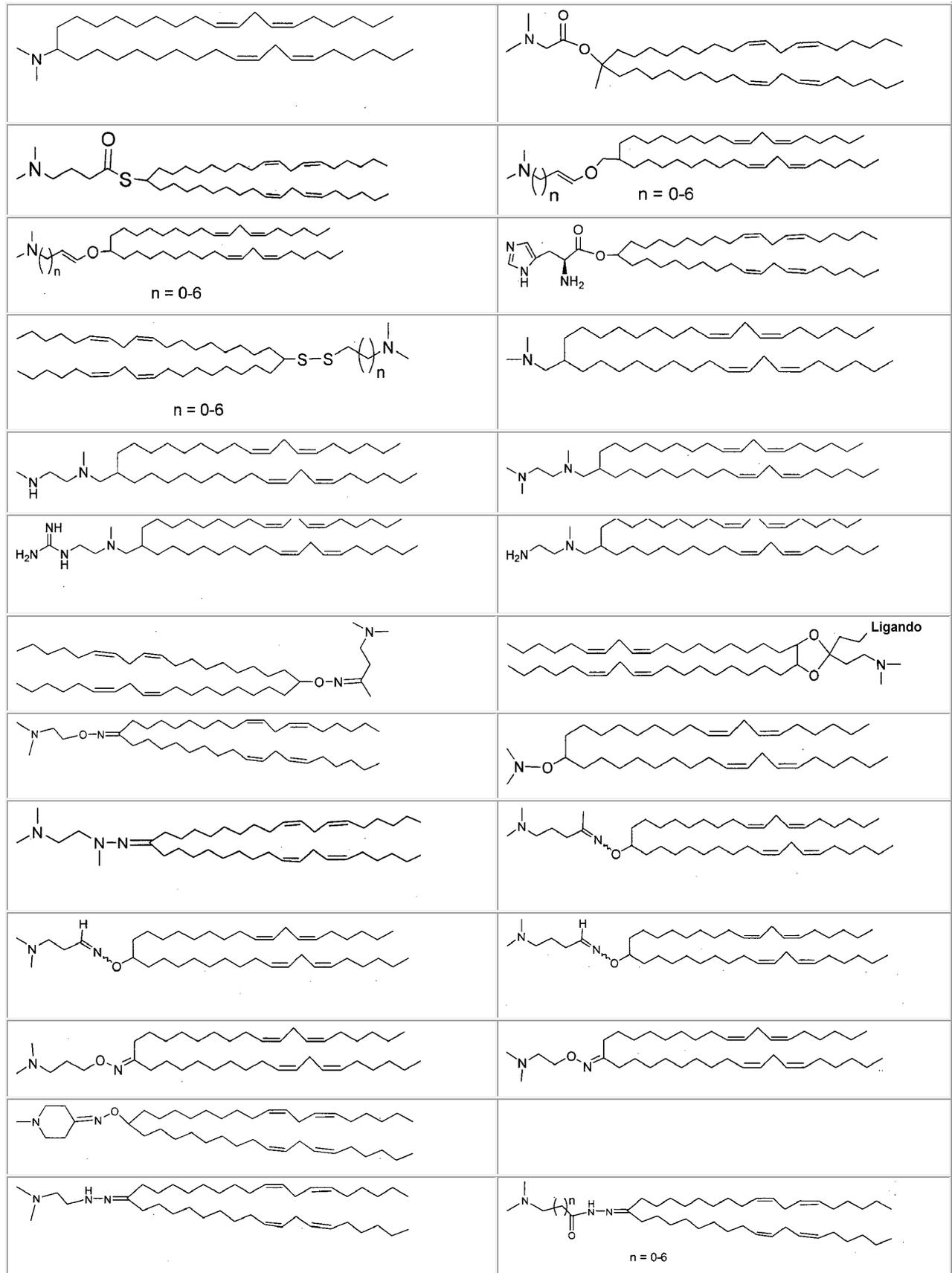
Racémico, cis	
cis Racémico y puro de forma óptica	

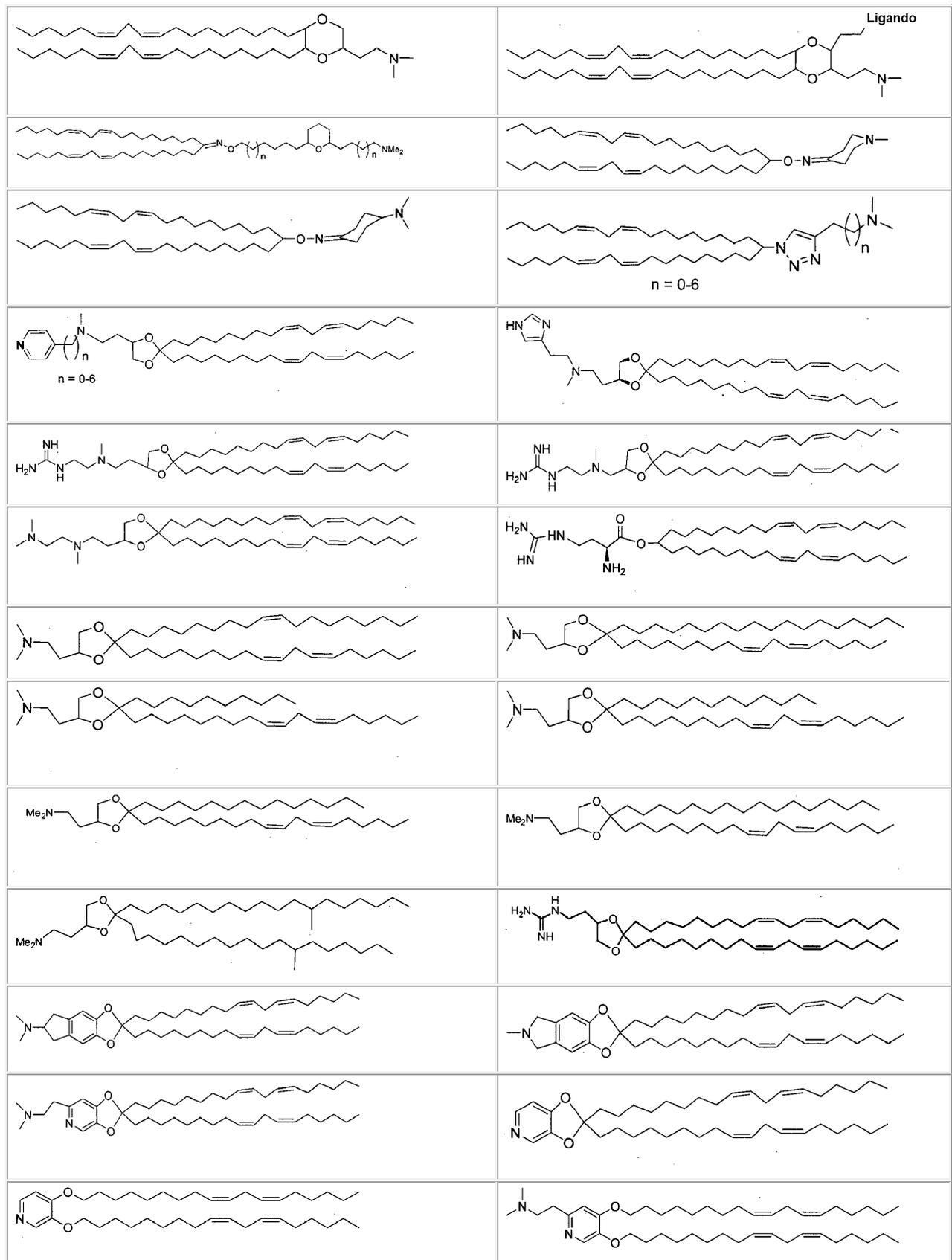
 <p>Racémico y puro de forma óptica</p>	
	
	
	
	
	
	
	
	
	
	
	



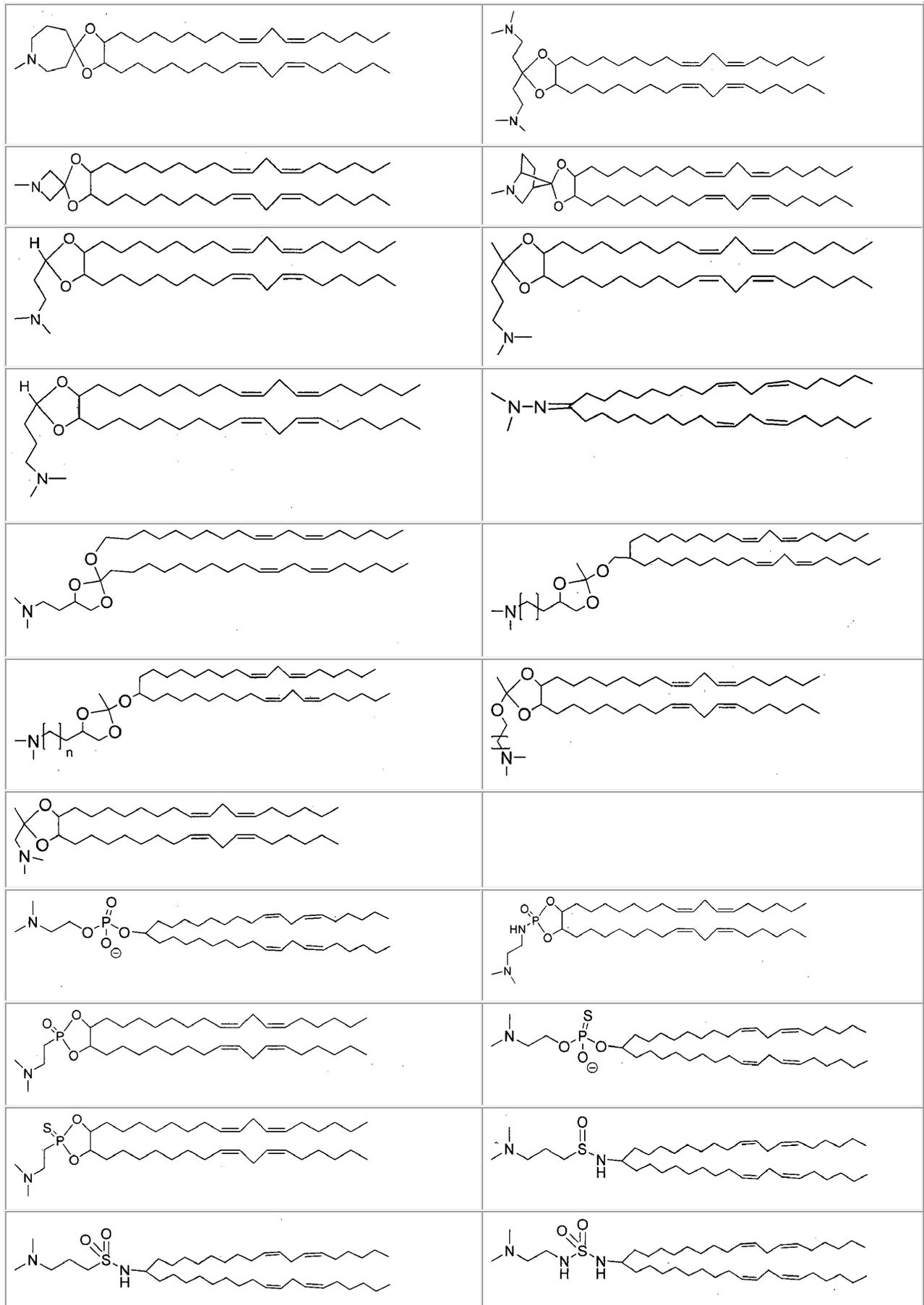




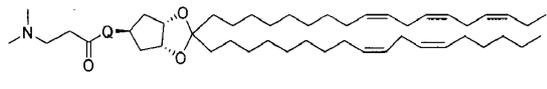
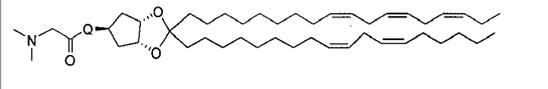
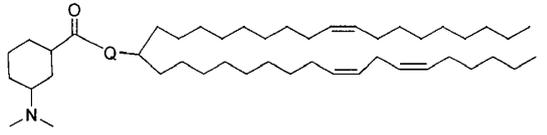
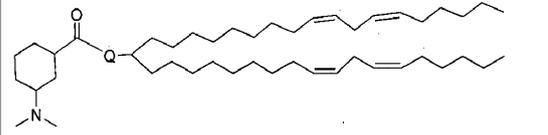
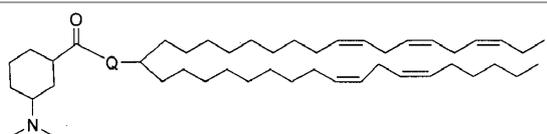
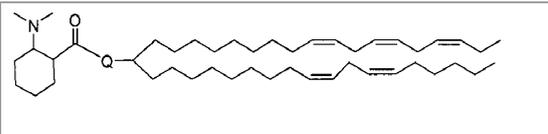
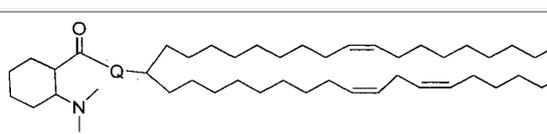
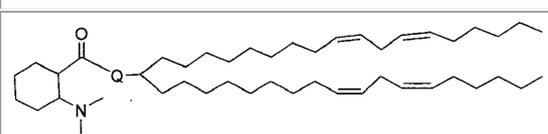
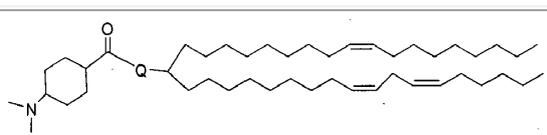
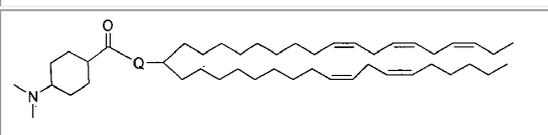
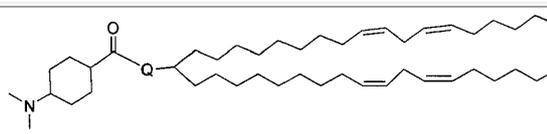
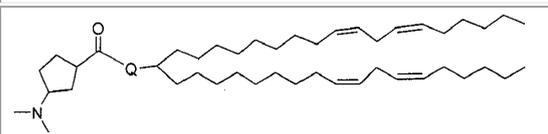
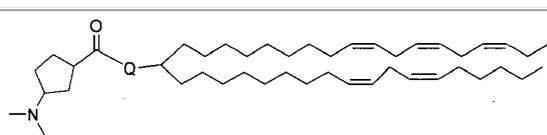
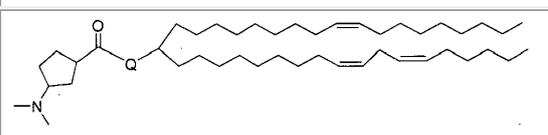
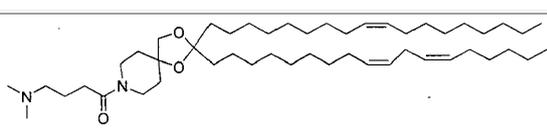
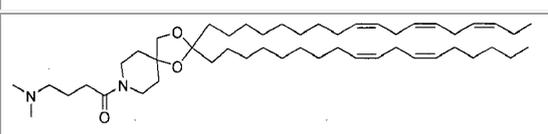
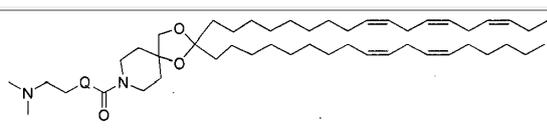
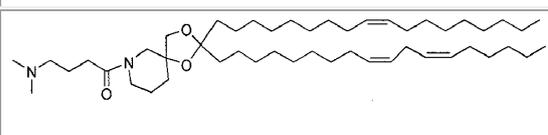
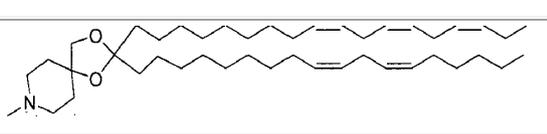
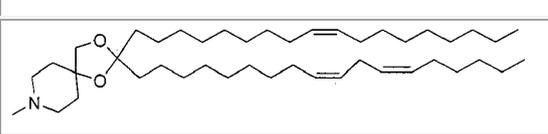


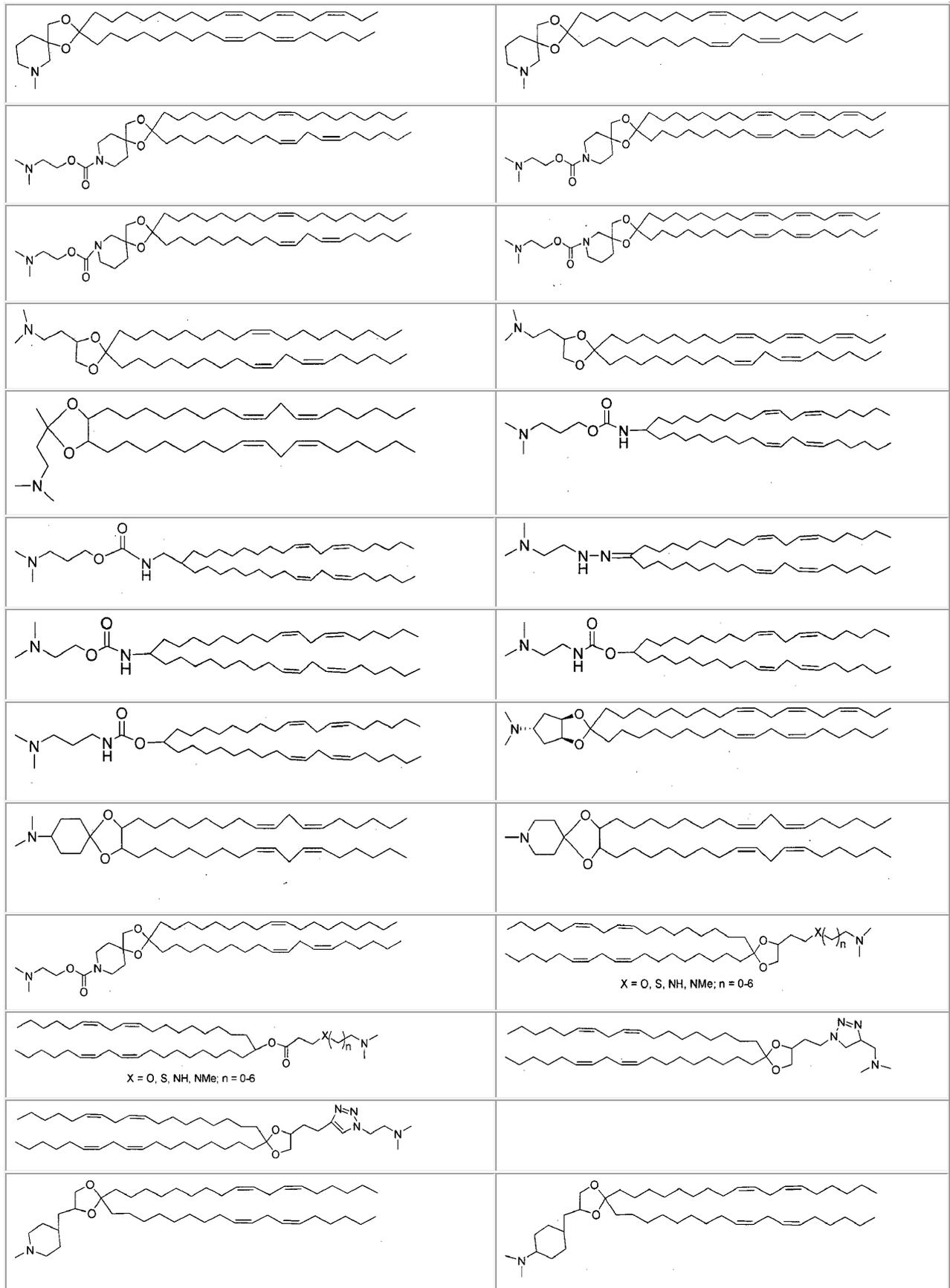


Péptido fusogénico	



Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe

	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	Q es O, NH, NMe
	
Q es O, NH, NMe	
	



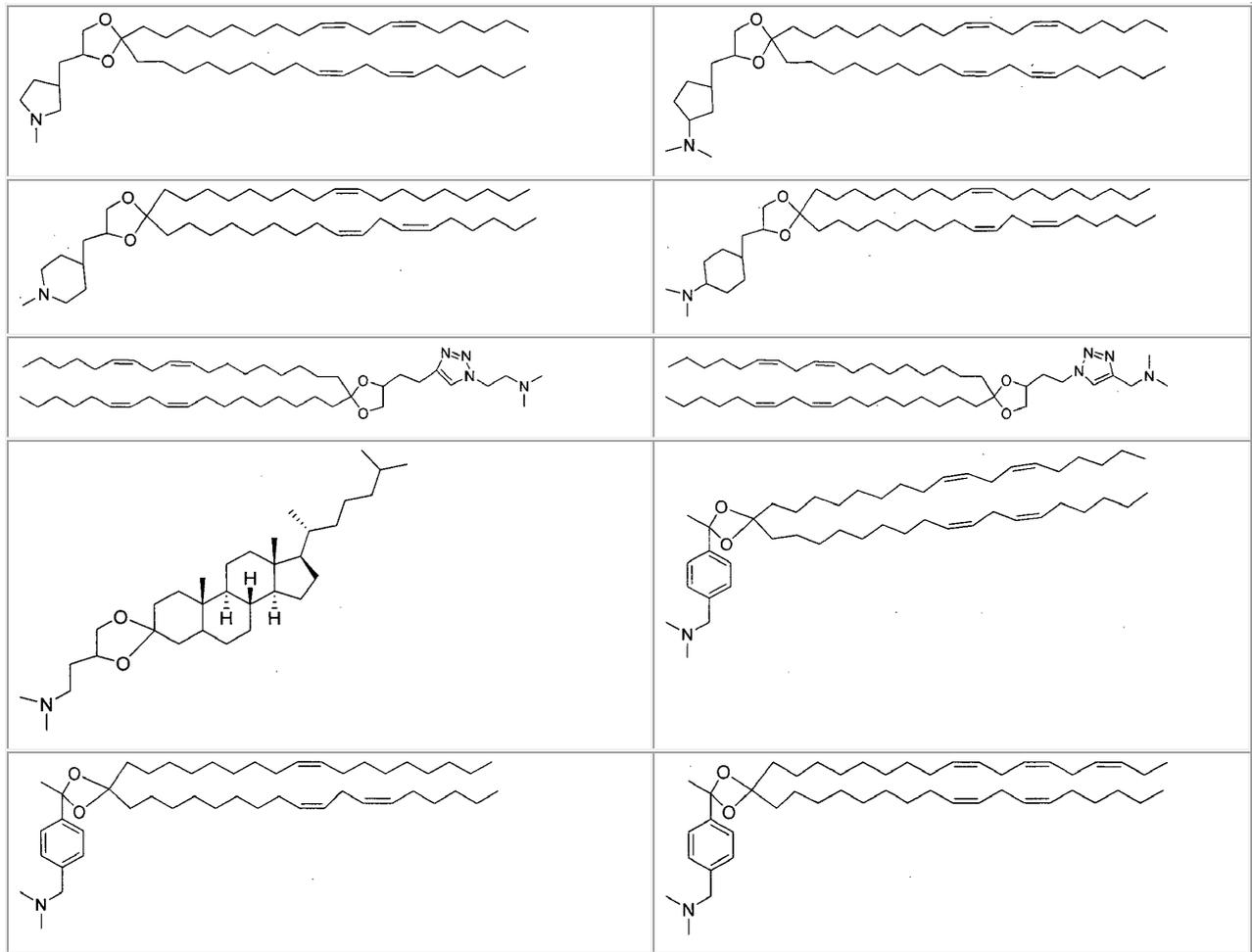
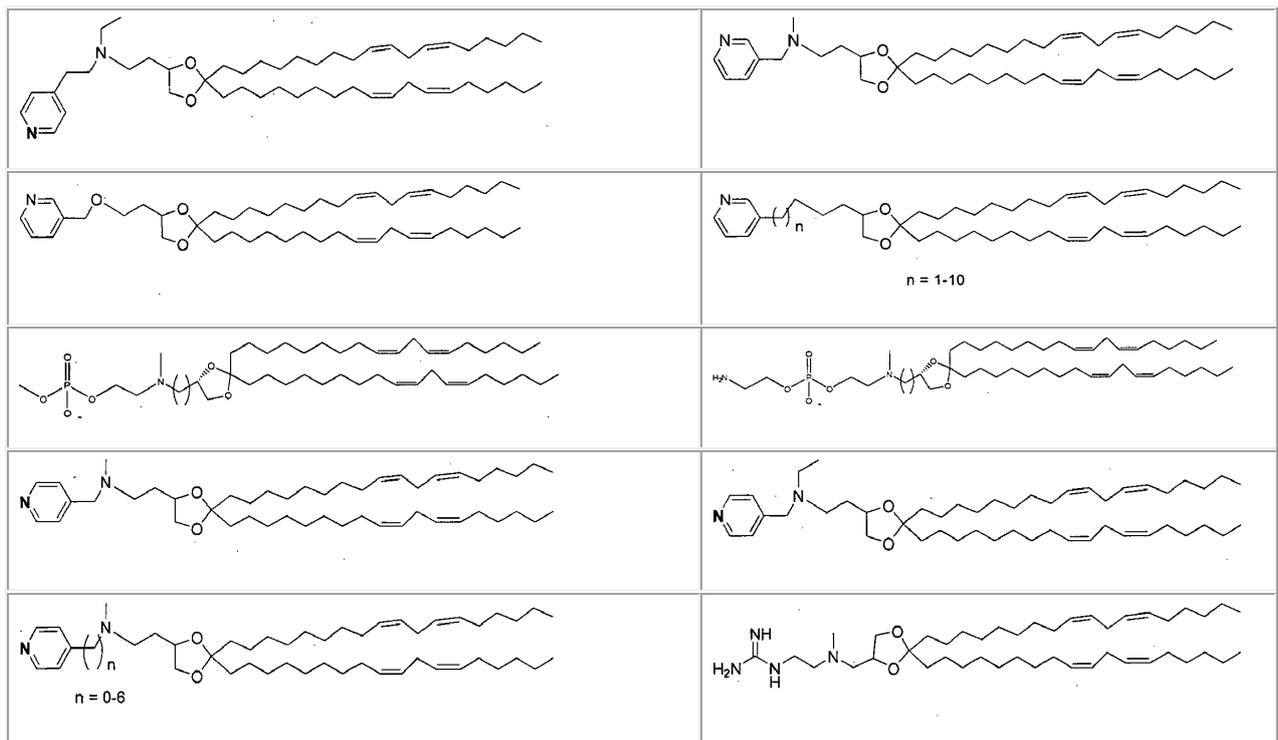
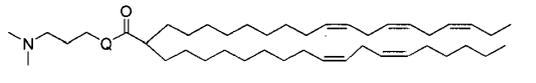
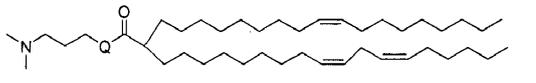
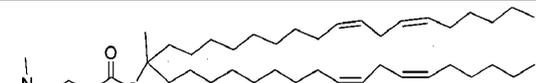
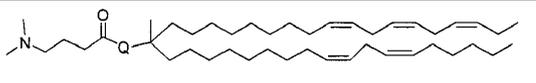
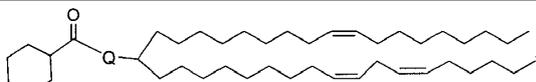
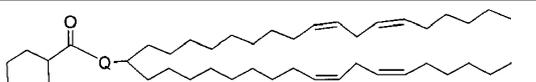
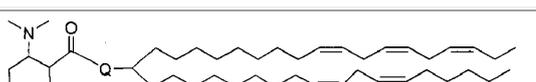
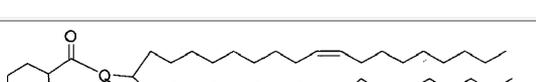
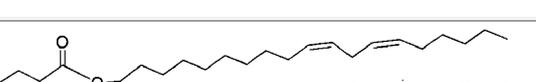
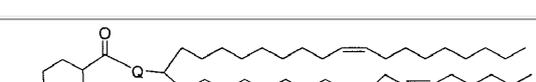
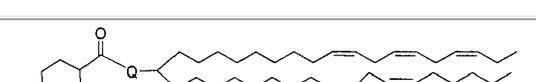
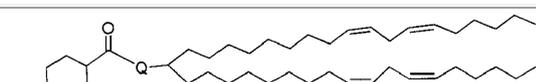
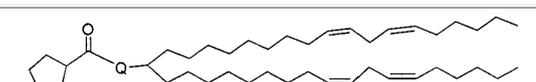
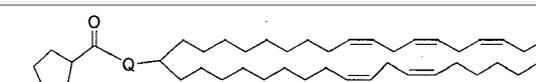
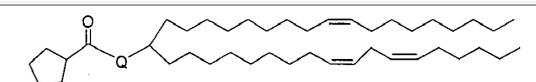
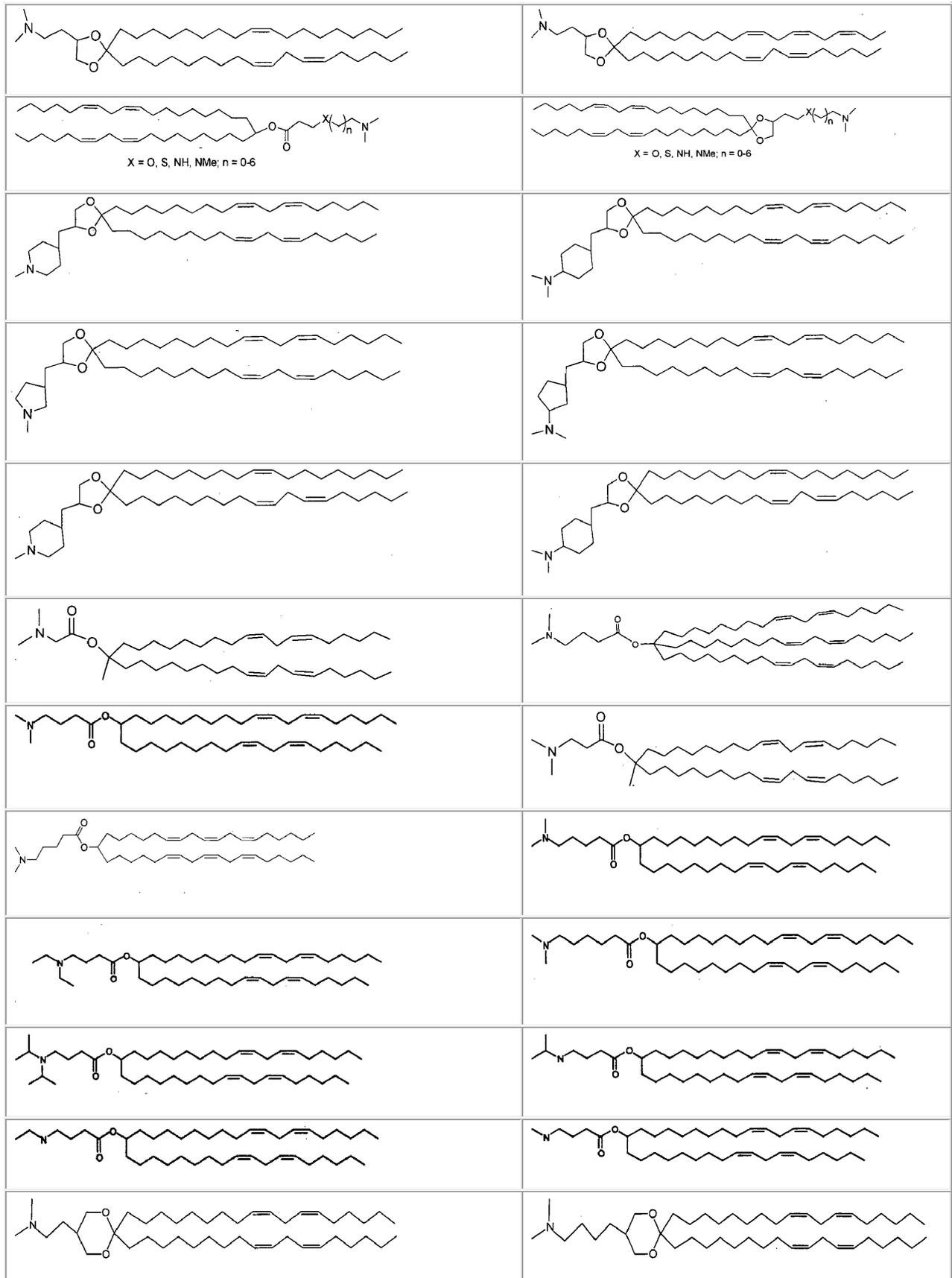


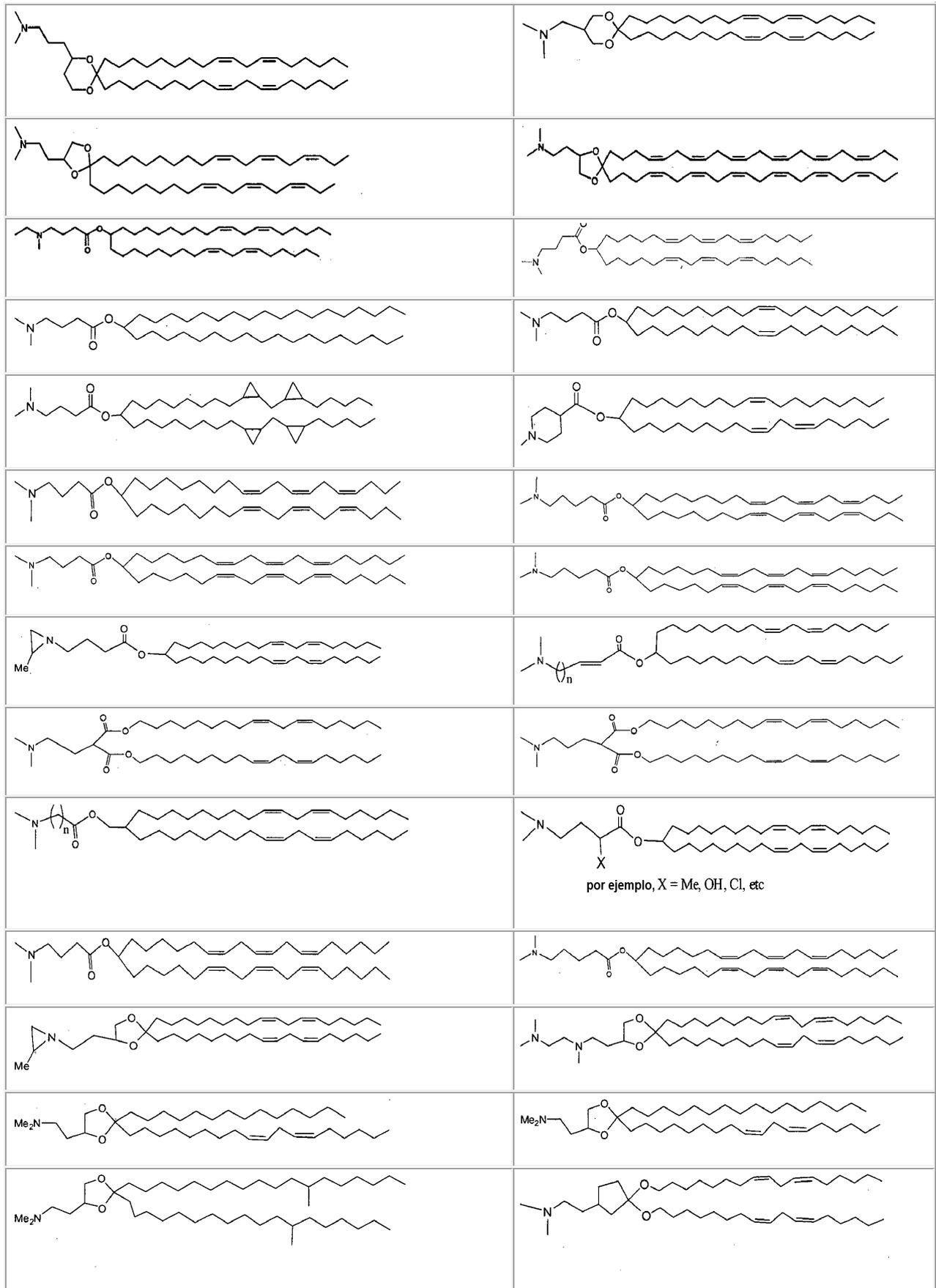
Tabla 2. Algunos lípidos catiónicos de ejemplo adicionales



 Racémico y puro de forma óptica	 Racémico y puro de forma óptica
 $\text{H}_2\text{N}-\text{HN}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{O}-$	 $\text{H}_2\text{N}-\text{HN}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{O}-$
 $\text{H}_2\text{N}-\text{HN}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{Me})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$	 $\text{H}_2\text{N}-\text{HN}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{Me})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$
 $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}-\text{N}(\text{Me})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ $n = 0-6$	 Q es O
 Q es O	 Q es O
 Q es O	 Q es O
 Q es O	 Q es O

Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	

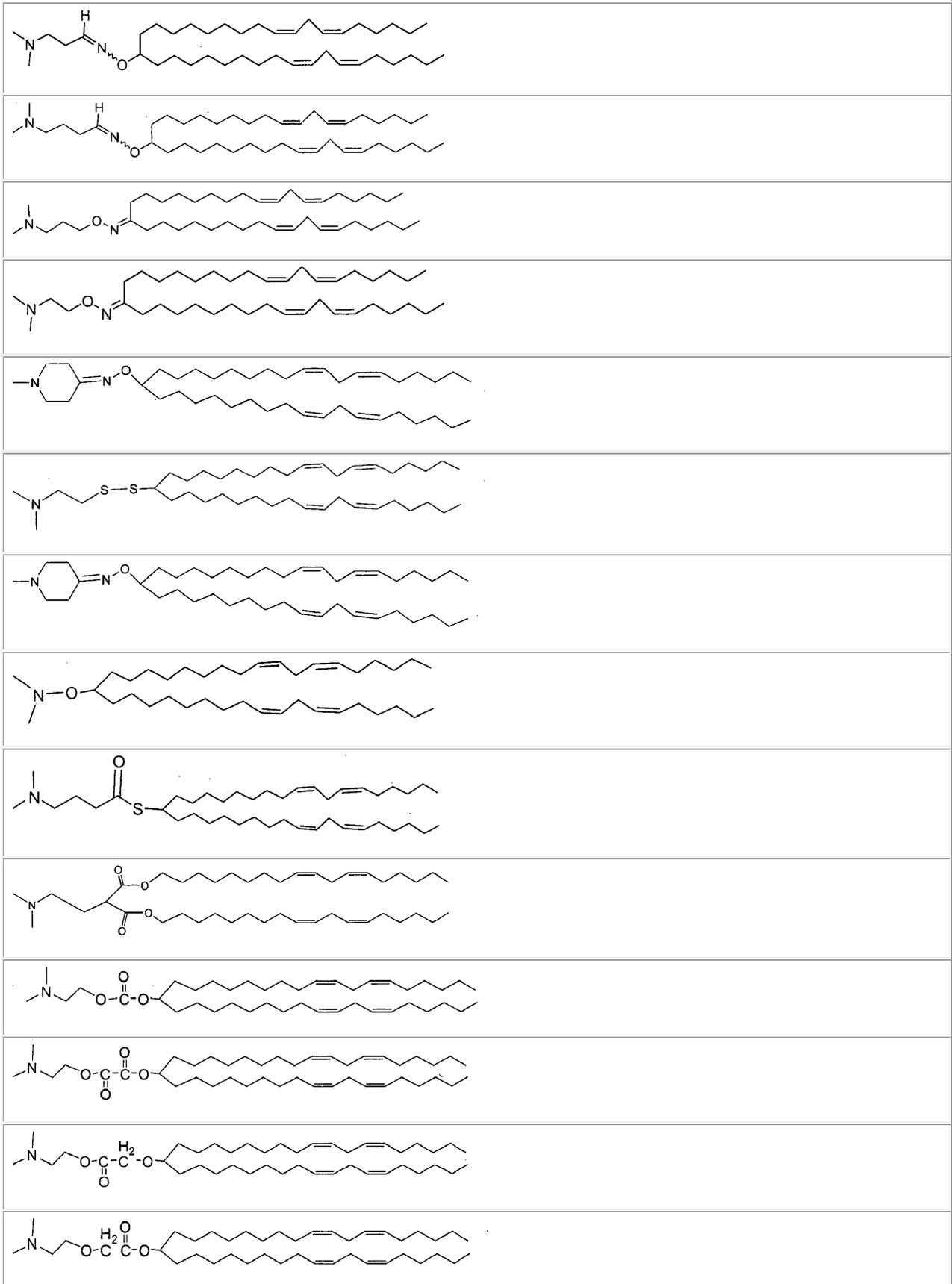


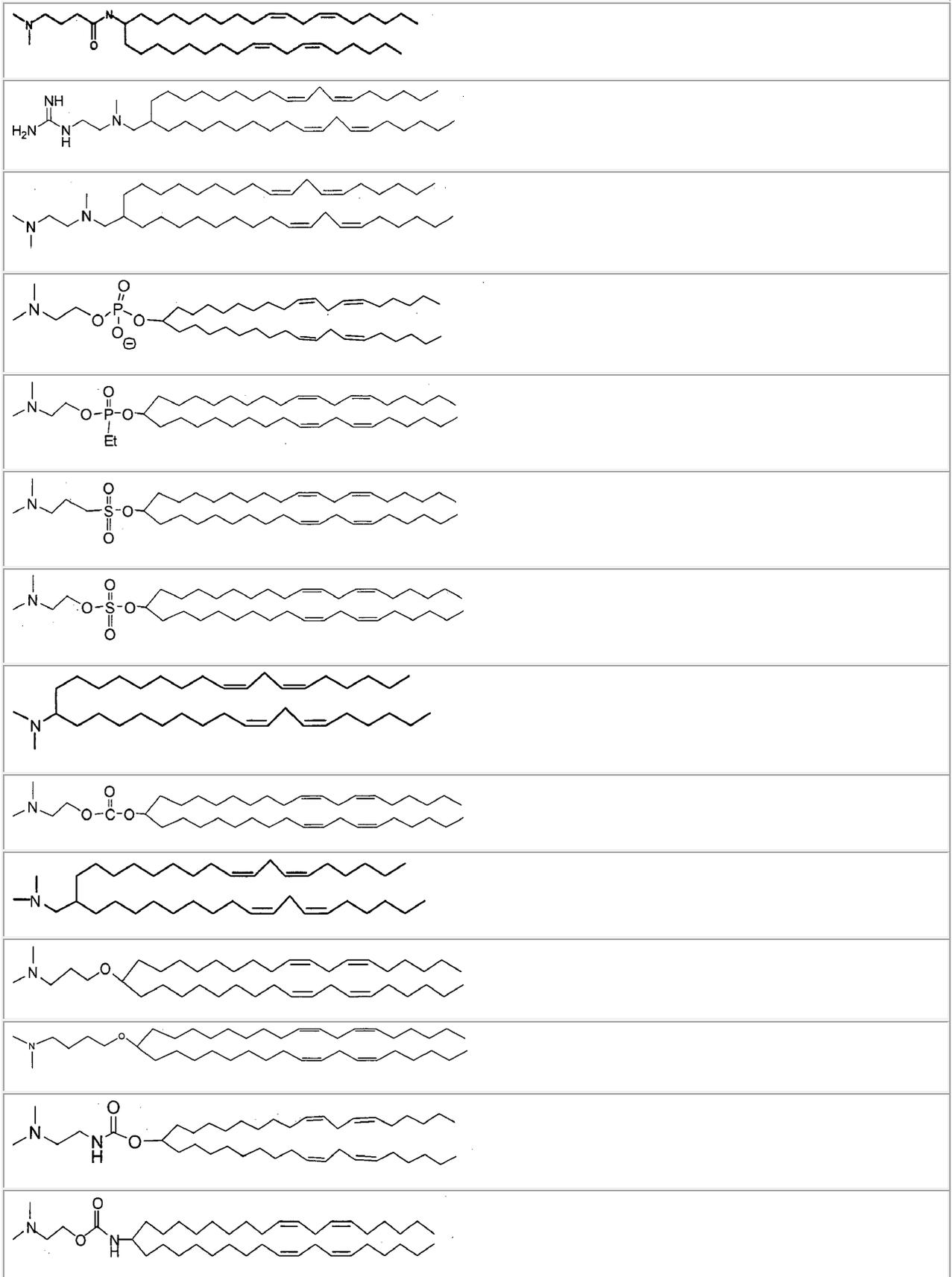


por ejemplo, X = Me, OH, Cl, etc



Tabla 3: Algunos lípidos catiónicos de ejemplo adicionales





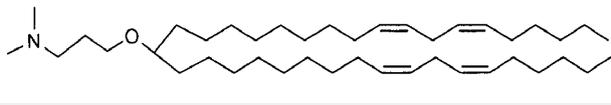
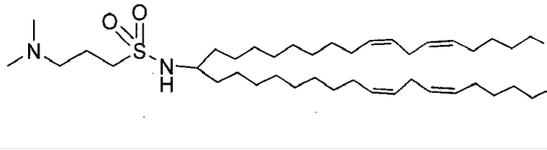
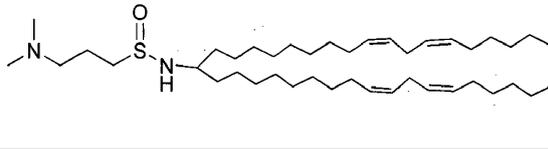
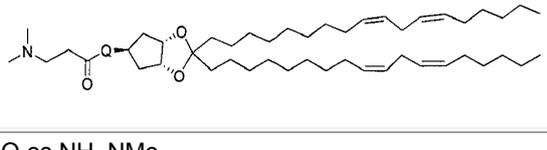
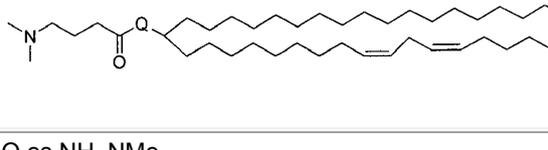
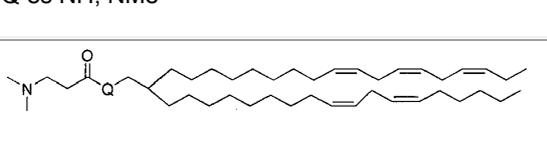
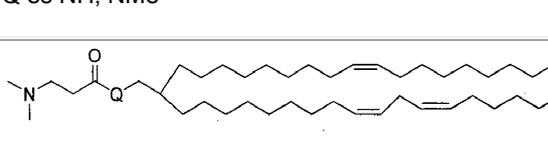
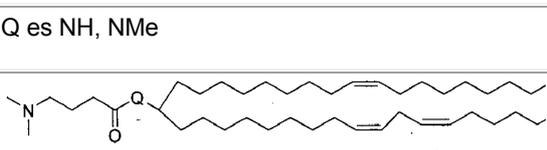
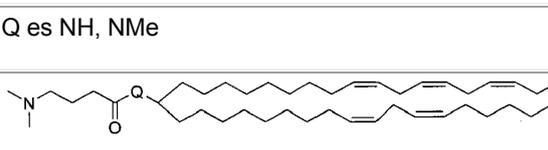
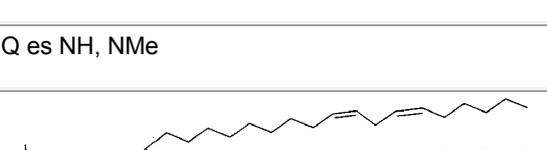
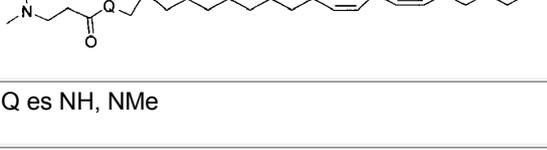
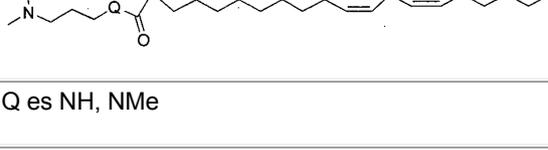
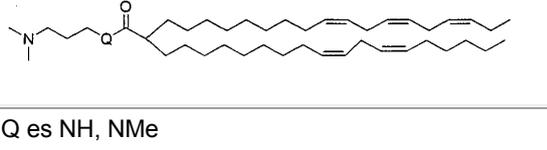
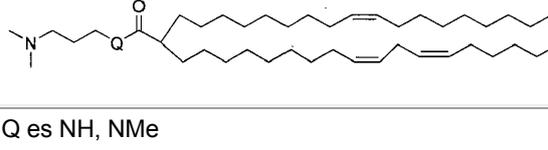
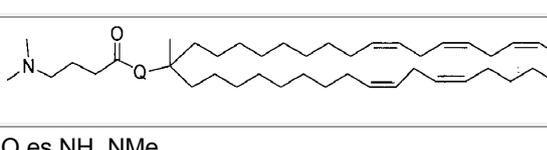
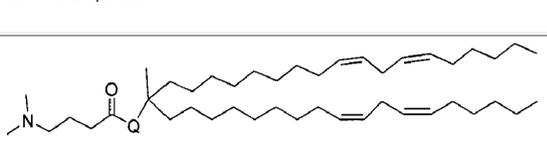
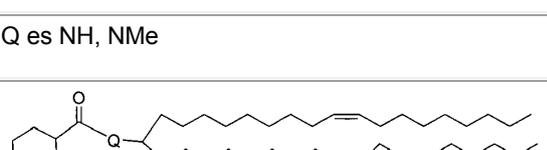
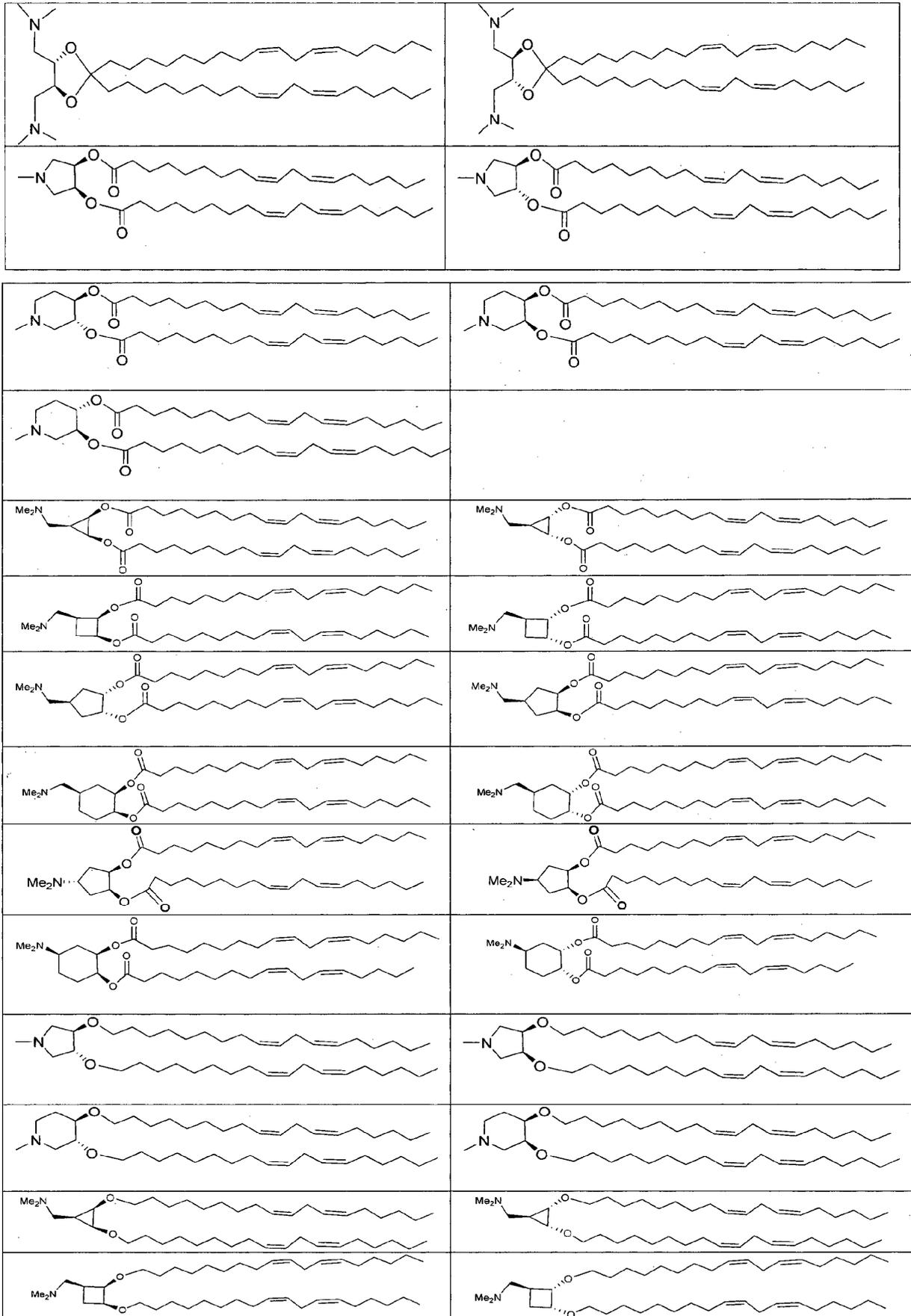
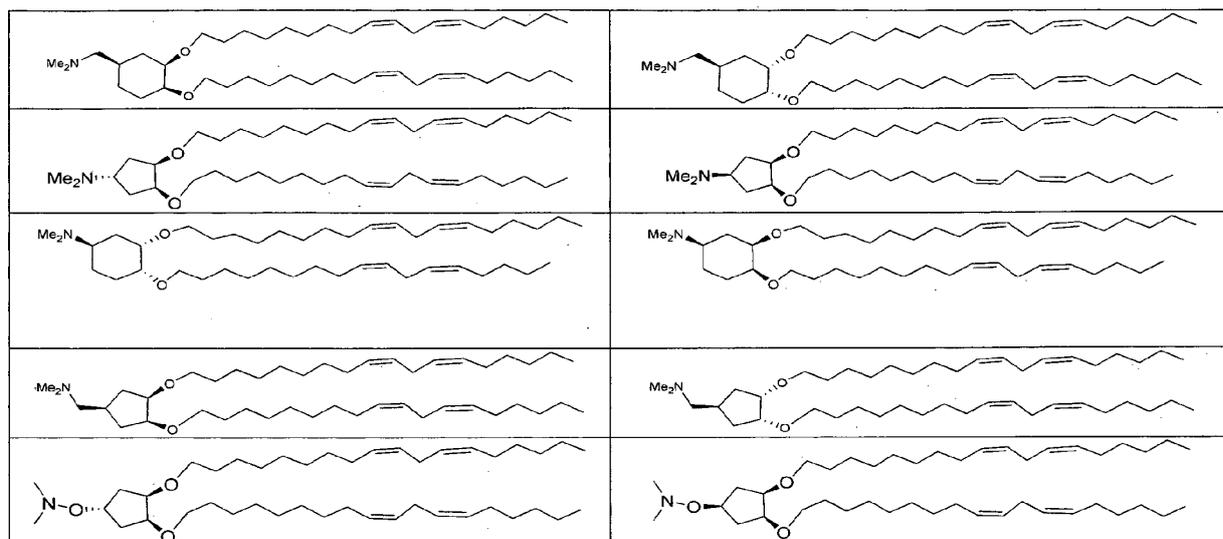
	
	
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	Q es NH, NMe
	
Q es NH, NMe	
	
Q es NH, NMe	
	

Tabla 4. Lípidos catiónicos de ejemplo adicionales





- Una cantidad de lípidos catiónicos, y métodos para elaborarlos, se describen, por ejemplo, en las solicitudes n.º PCT/US09/63933, PCT/US09/63927, PCT/US09/63931, y PCT/US09/63897, cada una presentada el 10 de noviembre de 2009, y las solicitudes referidas allí que incluyen los n.º 61/104,219, presentada el 9 de octubre de 2008; n.º 61/113,179, presentada el 10 de noviembre de 2008; n.º 61/154,350, presentada el 20 de febrero de 2009; n.º 61/171,439, presentada el 21 de abril de 2009; n.º 61/175,770, presentada el 5 de mayo de 2009; n.º 61/185,438, presentada el 9 de junio de 2009; n.º 61/225,898, presentada el 15 de julio 2009; y n.º 61/234,098, presentada el 14 de agosto de 2009; WO 2009/086558; y WO 2008/042973. Ver, por ejemplo, las Tablas 1 y 2 de la solicitud n.º PCT/US09/63933, presentada el 10 de noviembre de 2009, en las páginas 33-51.
- 5 En realizaciones particulares, los lípidos son lípidos catiónicos. Tal como se usa en la presente, el término "lípidos catiónicos" pretende incluir aquellos lípidos que tienen uno o dos ácidos grasos o cadenas alifáticas grasas y un grupo principal amino (que incluye un grupo alquilamino, dialquilamino, o trialquilamino) que puede ser protonado para formar un lípidos catiónicos a pH fisiológico. En algunas realizaciones, un lípidos catiónicos es referido como un "lípidos amino".
- 10 En realizaciones particulares, los lípidos son lípidos catiónicos. Tal como se usa en la presente, el término "lípidos catiónicos" pretende incluir aquellos lípidos que tienen uno o dos ácidos grasos o cadenas alifáticas grasas y un grupo principal amino (que incluye un grupo alquilamino, dialquilamino, o trialquilamino) que puede ser protonado para formar un lípidos catiónicos a pH fisiológico. En algunas realizaciones, un lípidos catiónicos es referido como un "lípidos amino".
- 15 Otros lípidos catiónicos incluirían aquellos que tienen grupos de ácidos grasos alternativos y otros grupos dialquilamino, que incluyen aquellos en los que los sustituyentes alquilo son diferentes (por ejemplo, N-etil-N-metilamino-, N-propil-N-etilamino- y similares). Para aquellas realizaciones en las que R₁ y R₂ son ambos grupos alquilo, alqueno, alquino o acilo de cadena larga, pueden ser iguales o diferentes. En general, los lípidos (por ejemplo, un lípidos catiónicos) que tiene cadenas de acilo menos saturadas son más fácilmente dimensionados, particularmente cuando los complejos tienen tamaños debajo de aproximadamente 0,3 micrones, para fines de esterilización de filtro. Los lípidos catiónicos que contienen ácidos grasos no saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀ son típicos. Otras estructuras también pueden ser usadas para separar el grupo amino (por ejemplo, el grupo amino del lípidos catiónicos) y el ácido graso o parte de alquilo graso del lípidos catiónicos. Las estructuras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.
- 20 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de modo que el lípidos es positivamente cargado a un pH a o debajo del pH fisiológico (por ejemplo, pH 7.4), y neutro a un segundo pH, preferentemente a o sobre el pH fisiológico. Tales lípidos también son referidos como lípidos catiónicos. Por supuesto, se entenderá que la adición o eliminación de protones como una función de pH es un proceso de equilibrio, y que la referencia a un lípidos cargado o neutro se refiere a la naturaleza de las especies predominantes y no requiere en absoluto que el lípidos esté presente en la forma cargada o neutro. Los lípidos pueden tener más de un grupo protonable o desprotonable, o pueden ser zwitteriónicos.
- 25 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de modo que el lípidos es positivamente cargado a un pH a o debajo del pH fisiológico (por ejemplo, pH 7.4), y neutro a un segundo pH, preferentemente a o sobre el pH fisiológico. Tales lípidos también son referidos como lípidos catiónicos. Por supuesto, se entenderá que la adición o eliminación de protones como una función de pH es un proceso de equilibrio, y que la referencia a un lípidos cargado o neutro se refiere a la naturaleza de las especies predominantes y no requiere en absoluto que el lípidos esté presente en la forma cargada o neutro. Los lípidos pueden tener más de un grupo protonable o desprotonable, o pueden ser zwitteriónicos.
- 30 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos (es decir, lípidos catiónicos) tienen un pK_a del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Típicamente, los lípidos tendrán un pK_a de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 7, tal como entre aproximadamente 5,5 y 6,8, cuando se incorpora en partículas de lípidos. Tales lípidos serán catiónicos a una etapa de formulación de pH inferior, mientras que las partículas serán en gran parte (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a pH fisiológico aproximadamente pH 7,4. Uno de los beneficios de un pK_a en el intervalo de entre aproximadamente 4 y 7 es que al menos algunos ácidos nucleicos asociados con la superficie externa de la partícula perderá su interacción electrostática a pH fisiológico y puede ser eliminado mediante diálisis simple; reduciendo de este modo de gran manera la susceptibilidad de la partícula a la eliminación. Las mediciones de pK_a de lípidos dentro de las partículas de lípidos se pueden realizar, por ejemplo, al usar la sonda fluorescente ácido sulfónico de 2-(p-toluidino)-6-naftaleno (TNS), usando métodos descritos en Cullis et al., (1986) Chem Phys
- 35 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos (es decir, lípidos catiónicos) tienen un pK_a del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Típicamente, los lípidos tendrán un pK_a de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 7, tal como entre aproximadamente 5,5 y 6,8, cuando se incorpora en partículas de lípidos. Tales lípidos serán catiónicos a una etapa de formulación de pH inferior, mientras que las partículas serán en gran parte (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a pH fisiológico aproximadamente pH 7,4. Uno de los beneficios de un pK_a en el intervalo de entre aproximadamente 4 y 7 es que al menos algunos ácidos nucleicos asociados con la superficie externa de la partícula perderá su interacción electrostática a pH fisiológico y puede ser eliminado mediante diálisis simple; reduciendo de este modo de gran manera la susceptibilidad de la partícula a la eliminación. Las mediciones de pK_a de lípidos dentro de las partículas de lípidos se pueden realizar, por ejemplo, al usar la sonda fluorescente ácido sulfónico de 2-(p-toluidino)-6-naftaleno (TNS), usando métodos descritos en Cullis et al., (1986) Chem Phys
- 40 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos (es decir, lípidos catiónicos) tienen un pK_a del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Típicamente, los lípidos tendrán un pK_a de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 7, tal como entre aproximadamente 5,5 y 6,8, cuando se incorpora en partículas de lípidos. Tales lípidos serán catiónicos a una etapa de formulación de pH inferior, mientras que las partículas serán en gran parte (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a pH fisiológico aproximadamente pH 7,4. Uno de los beneficios de un pK_a en el intervalo de entre aproximadamente 4 y 7 es que al menos algunos ácidos nucleicos asociados con la superficie externa de la partícula perderá su interacción electrostática a pH fisiológico y puede ser eliminado mediante diálisis simple; reduciendo de este modo de gran manera la susceptibilidad de la partícula a la eliminación. Las mediciones de pK_a de lípidos dentro de las partículas de lípidos se pueden realizar, por ejemplo, al usar la sonda fluorescente ácido sulfónico de 2-(p-toluidino)-6-naftaleno (TNS), usando métodos descritos en Cullis et al., (1986) Chem Phys

Lipids 40, 127-144.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente comprenden además una apolipoproteína. Tal como se usa en la presente, el término "apolipoproteína" o lipoproteína se refiere a apolipoproteínas conocidas por los expertos en la técnica y variantes y fragmentos de estas y a agonistas de apolipoproteína, análogos o fragmentos de estos descritos más adelante.

Las apolipoproteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE, y formas, isoformas, variantes y mutantes polimórficas activas así como fragmentos o formas truncadas de estos. En determinadas realizaciones, la apolipoproteína es un tiol que contiene apolipoproteína. "Tiol que contiene apolipoproteína" se refiere a una apolipoproteína, variante, fragmento o isoforma que contiene al menos un resto de cisteína. El tiol más común que contiene apolipoproteínas son ApoA-I Milano (ApoA-I_M) y ApoA-I Paris (ApoA-I_P) que contiene un resto de cisteína (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki y Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 y ApoE3 también son apolipoproteínas que contienen tiol. ApoE aislado y/o fragmentos activos y análogos de polipéptidos de estos, que incluyen formas producidas de forma recombinante de estos, se describen en las patentes estadounidenses n.º 5.672.685; 5.525.472; 5.473.039; 5.182.364; 5.177.189; 5.168.045; 5.116.739. ApoE3 se describe en Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 9077-9083; y Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982) 79: 4696-4700, Ver también el número de registro de GenBank K00396.

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

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

En determinadas realizaciones, los métodos y composiciones incluyen el uso de una construcción quimérica de una apolipoproteína. Por ejemplo, una construcción quimérica de una apolipoproteína puede comprender un dominio de apolipoproteína con capacidad de unión elevada asociada con un dominio de apolipoproteína que contiene propiedades protectoras de isquemia-reperusión. Una construcción quimérica de una apolipoproteína puede ser una construcción que incluye regiones separadas dentro de una apolipoproteína (es decir, construcción homóloga) o una construcción quimérica puede ser una construcción que incluye regiones separadas entre diferentes apolipoproteínas (es decir, construcciones heterólogas). Las composiciones que comprenden una construcción quimérica también pueden incluir segmentos que son variantes de apolipoproteína o segmentos diseñados a tener un carácter específico (por ejemplo, propiedad de unión al lípido, unión al receptor, enzimática, activación de enzima, antioxidante o reducción-oxidación) (ver Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson y Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42;

Steinmetz y Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23):15009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47):30979-84).

5 Las apolipoproteínas usadas en la presente también incluyen apolipoproteínas recombinantes, sintéticas, semi-sintéticas o purificadas. Los métodos para obtener apolipoproteínas o equivalentes de estos, usados en la presente son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las apolipoproteínas se pueden separar del plasma o productos naturales mediante, por ejemplo, centrifugación de gradiente de densidad o cromatografía de inmunoafinidad, o producido sintéticamente, semi-sintéticamente o usando técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Mulugeta et al., 1998, *J. Chromatogr.* 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, *J. Chromatogr.* 711:97-109; patente estadounidense n.º 5.059.528, 5.834.596, 5.876.968 y 5.721.114; y las publicaciones PCT WO 86/04920 y WO 87/02062).

15 Las apolipoproteínas usadas en la presente incluyen además agonistas de apolipoproteínas tal como péptidos y análogos de péptidos que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-_{IM}), ApoA-I Paris (ApoA-_{IP}), ApoA-II, ApoA-IV, y ApoE. Por ejemplo, la apolipoproteína puede ser cualquiera de aquellas descritas en la patente estadounidense n.º 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166, y 5.840.688.

20 Los péptidos agonistas de apolipoproteína o análogos de péptidos se pueden sintetizar o elaborar usando cualquier técnica para síntesis de péptidos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, las técnicas descritas en la patente estadounidense n.º 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar usando la técnica sintética de fase sólida inicialmente descrita por Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Otras técnicas de síntesis de péptidos se pueden encontrar en Bodanszky et al., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) y otras referencias fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Un resumen de técnicas de síntesis de polipéptidos se puede encontrar en Stuart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Los péptidos también se pueden sintetizar mediante métodos de solución tal como se describe en *The Proteins*, Vol. II, 3d Ed., Neurath et. ál., Eds., p. 105-237, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976). Los grupos protectores apropiados para usar en diferentes síntesis de péptidos se describen en los textos anteriormente mencionados así como en McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1973). Los péptidos descritos en la presente también puede que estén preparados mediante escisión química o enzimática de partes más grandes, por ejemplo, de apolipoproteína A-I.

35 En determinadas realizaciones, la apolipoproteína puede ser una mezcla de apolipoproteínas. En una realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla homogénea, que es, un solo tipo de apolipoproteína. En otra realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla heterogénea de apolipoproteínas, esto es, una mezcla de dos o más apolipoproteínas diferentes. Las realizaciones de mezclas heterogéneas de apolipoproteínas pueden comprender, por ejemplo, una mezcla de una apolipoproteína de una fuente animal y una apolipoproteína de una fuente semisintética. En determinadas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I y ApoA-I Milano. En determinadas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I Milano y ApoA-I Paris. Mezclas adecuadas para usar en los métodos y composiciones descritos en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica.

40 Si la apolipoproteína se obtiene de fuentes naturales, se puede obtener de una planta o fuente animal. Si la apolipoproteína se obtiene de una fuente animal, la apolipoproteína puede ser de cualquier especie. En determinadas realizaciones, la apolipoproteína puede obtenerse de una fuente animal. En determinadas realizaciones, la apolipoproteína puede obtenerse de una fuente humana. En realizaciones preferidas, la apolipoproteína deriva de las mismas especies que el individuo al que se le administró la apolipoproteína.

45 Partículas de lípidos

Las partículas de lípidos pueden incluir uno o más de los lípidos catiónicos descritos anteriormente. Las partículas lipídicas incluyen, pero no se limitan a, liposomas. Tal como se usa en la presente, un liposoma es una estructura que tiene membranas que contienen lípidos que rodean un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas lipídicas. Los liposomas pueden ser de una sola capa, se referidos como unilamelares, o de múltiples capas, referidos como multilamelares. Cuando se vuelven complejos junto con ácidos nucleicos, las partículas de lípidos también pueden ser lipoplexas, que están compuestas de bicapas de lípidos catiónicos en medio de capas de ADN, tal como se describe en, por ejemplo, Felgner, *Scientific American*.

55 Las partículas lipídicas pueden comprender adicionalmente uno o más lípidos adicionales y/o otros componentes, tales como el colesterol. Otros lípidos pueden estar incluidos en las composiciones de liposomas descritas en la presente para una variedad de fines, como para prevenir la oxidación de lípidos o para unir ligandos sobre la superficie de liposomas. Cualquiera de una cantidad de lípidos puede estar presente en los liposomas descritos en la presente, que incluyen lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Tales lípidos pueden usarse solos o en combinación. Ejemplos específicos de componentes de lípido adicionales que pueden estar presentes se describen más adelante.

Componentes adicionales que pueden estar presentes en una partícula de lípido descrita en la presente incluyen componentes de estabilización bicapa tal como oligómeros de poliamida (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.320.017), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado a ceramidas (ver, la patente estadounidense n.º 5.885.613).

- 5 En realizaciones particulares, las partículas de lípidos incluyen uno o más de un segundo lípido amino o lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroles, y un lípido que se selecciona para reducir la agregación de partículas de lípidos durante la formación, que puede tener como resultado la estabilización estérica de partículas que evitan la agregación inducida por carga durante la formación.

- 10 Las partículas lipídicas pueden incluir dos o más lípidos catiónicos. Los lípidos pueden seleccionarse para que proporcionen diferentes propiedades beneficiosas. Por ejemplo, los lípidos que tienen propiedades diferentes tales como el pK_a de amina, la estabilidad química, la semivida en circulación, la semivida en los tejidos, la acumulación neta en los tejidos o la toxicidad pueden utilizarse en una partícula lipídica. En particular, los lípidos catiónicos pueden elegirse de manera que las propiedades de la partícula lipídica mixta sea más deseable que las propiedades una partícula lipídica simple de lípidos individuales.

- 15 La acumulación de tejido neta y la toxicidad a largo plazo (si hay) de los lípidos catiónicos puede ser modulada de manera favorables mediante la elección de mezclas de lípidos catiónicos en vez de seleccionar un solo lípido catiónico en una formulación dada. Tales mezclas pueden también proporcionar una mejor encapsulación y/o liberación del fármaco. Una combinación de lípidos catiónicos también puede afectar la estabilidad sistémica en comparación a una entidad única en una formulación.

- 20 En un ejemplo, una serie de compuestos estructuralmente similares pueden tener valores variables de pK_a que abarcan un intervalo, por ejemplo, de menos de 1 unidad de pK_a , de 1 a 2 unidades pK_a , o un intervalo de más de 2 unidades pK_a . Dentro de la serie, se puede encontrar que un pK_a en el medio del intervalo está asociada con un aumento de las propiedades ventajosas (mayor eficacia) o una disminución en propiedades desfavorables (por ejemplo, toxicidad reducida), en comparación con los compuestos que tienen valores pK_a hacia los fines del intervalo. En tal caso, dos (o más) compuestos diferentes que tienen valores pK_a hacia extremos opuestos del intervalo se pueden seleccionar para usar juntos en una partícula de lípido. De esta manera, las propiedades netas de las partículas lipídicas (por ejemplo, la carga como una función del pH local) pueden estar más cerca que las de una partícula que incluya un único lípido de la mitad del rango. Los lípidos catiónicos con estructuras disímiles (por ejemplo, que no son parte de la serie de compuestos de estructura similar mencionada anteriormente) pueden también utilizarse en una partícula lipídica mixta. Las partículas de lípidos pueden incluir mezclas de lípidos catiónicos donde uno (o más) lípido catiónico es un lípido cargado, es decir, uno que porta una carga positiva permanente, tal como una amina cuaternaria.

- 35 En algunos casos, dos o más lípidos catiónicos diferentes pueden tener valores pK_a que difieren ampliamente, por ejemplo, que difieren en 3 o más unidades de pK_a . En este caso, el comportamiento neto de una partícula de lípido mezclada no necesariamente imitará a aquella de una partícula de lípido individual que tiene un pK_a intermedio. Por el contrario, el comportamiento neto puede ser aquel de una partícula que tiene dos sitios protonable distintos (o desprotonables según sea el caso) con diferentes valores pK_a . En el caso de un lípido individual, la fracción de sitios protonables que están de hecho protonados varía drásticamente a medida que el pH pasa de menos del pK_a a por encima del pK_a (cuando el pH es igual al valor pK_a , 50 % de los sitios están protonados). Cuando dos o más lípidos catiónicos diferentes que pueden tener valores pK_a ampliamente diferentes (por ejemplo, que difieren en 3 o más unidades pK_a) son combinados en una partícula de lípido, la partícula de lípido puede mostrar una transición más gradual de no protonado a protonado a medida que el pH varía.

- 45 En otros ejemplos, dos o más lípidos pueden seleccionarse en función de otras consideraciones. Por ejemplo, si un lípido en sí mismo es altamente eficaz pero moderadamente tóxico, puede combinarse con un lípido que sea menos eficaz pero no tóxico. En algunos casos, la combinación puede seguir siendo altamente eficaz pero puede tener una toxicidad muy reducida, incluso cuando podría predecirse que la combinación sería solo moderadamente eficaz y solo apenas menos tóxica.

- 50 La selección puede llevarse a cabo según un valor medido de una característica que se determina experimentalmente, por ejemplo, una característica a la que puede asignarse un valor numérico a partir de los resultados de un experimento. Las características determinables de forma experimental pueden incluir una medida de seguridad, una medida de eficacia, una medida de interacción con una biomolécula predeterminada, o pK_a .

- 55 Una medida de la seguridad incluye un índice de supervivencia, un LD_{50} , o un nivel de un biomarcador (tal como un biomarcador de suero) asociado con daño a los tejidos (por ejemplo, las enzimas hepáticas para el hígado; CPK para el músculo; el equilibrio iónico para el riñón). Una medida de la eficacia puede ser cualquier medida que indique si un agente terapéutico está produciendo un efecto; en particular, si está produciendo un efecto deseado y/o en qué medida lo está produciendo, tal como el tratamiento, la prevención, el alivio u otro que mejore una enfermedad, trastorno o afección clínica. La medida de la eficacia puede ser una medida indirecta; por ejemplo, si se pretende que un agente terapéutico produzca un efecto en particular a nivel celular, las medidas de tal efecto en cultivos celulares puede ser una medida de la eficacia. Una medida de la interacción con biomoléculas predeterminadas

puede incluir una K_d para unirse a una proteína en particular o una medida del carácter, grado o medida de interacción con otros lípidos, incluyendo subestructuras celulares tales como membranas celulares, membranas endosomales, membranas nucleares y similares.

5 Los lípidos catiónicos pueden seleccionarse en función del mecanismo de acción, por ejemplo, si los lípidos interactúan con biomoléculas predeterminadas, en qué condiciones lo hacen y en qué medida lo hacen. por ejemplo, determinados lípidos catiónicos están asociados con un mecanismo dependiente de ApoE (por ejemplo, DLin-M-C3-DMA y otros lípidos), mientras que otros lípidos (tales como C12-200 y otros lípidos) pueden ser asociados con un mecanismo que es independiente de Apo-E. Ver, por ejemplo, Love, K.T., et al., "Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing," PNAS 107, 5, (2010), 1864-1869; y Akinc, A., et al., "Targeted Delivery of RNAi Therapeutics with Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms," Mol. Therapy 18, 7, (2010), 1357-1364. Por lo tanto, un primer lípido catiónico puede ser elegido, en parte, porque está asociado con un mecanismo dependiente de ApoE; un segundo lípido catiónico puede ser elegido, en parte, porque está asociado con un mecanismo independiente de ApoE.

15 Por ejemplo, una partícula de lípido puede contener una mezcla de los lípidos catiónicos descritos en, por ejemplo, WO 2009/086558, y la solicitud estadounidense provisional n.º 61/104,219, presentada el 9 de octubre de 2008, y análogos de éster de estos. En otro ejemplo, una partícula de lípido puede contener una mezcla de XTC2 y TechG1.

20 Ejemplos de lípidos que reducen la agregación de partículas durante la formación incluyen lípidos modificados por polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gm1, y oligómeros de poliamida ("PAO") tales como (descritos en la patente estadounidense n.º 6.320.017). Otros compuestos con restos no cargados, hidrofílicos, de barrera-estéricos, que evitan la agregación durante la formulación, como PEG, Gm1 o ATTA, también pueden ser acoplados a lípidos para usar como en los métodos y composiciones descritos en la presente. Los lípidos ATTA se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.320.017, y conjugados de lípidos-PEG se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613. Típicamente, la concentración del componente de lípido seleccionado para reducir la agregación es aproximadamente 1 a 15 % (por porcentaje molar de los lípidos).

25 Los ejemplos específicos de lípidos modificados por PEG (o conjugados de lípidos-polioxitileno) que son útiles en la presente pueden tener una variedad de partes de lípido de "anclaje" para asegurar la parte de PEG a la superficie de la vesícula de lípido. Ejemplos de lípidos modificados por PEG adecuados incluyen fosfatidiletanolamina modificada por PEG y ácido fosfatídico, conjugados de ceramida-PEG (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en la patente estadounidense n.º 5.820.873, dialquilaminas modificadas por PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas por PEG. Los diacilgliceroles y dialquigliceroles modificados por PEG son particularmente preferidos.

35 En realizaciones donde un resto estéricamente grande tal como PEG o ATTA conjugado a un ancla de lípido, la selección del ancla del lípido depende de qué tipo de asociación el conjugado va a tener con la partícula de lípido. Es sabido que mPEG (mw2000)-diastearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) permanecerá asociada con un liposoma hasta que la partícula sea sacada de circulación, posiblemente en cuestión de días. Otros conjugados, tal como PEG-CerC20 tienen capacidad de permanencia similar. PEG-CerC14, sin embargo, intercambia rápidamente fuera de la formulación luego de la exposición a suero, con un $T_{1/2}$ de menos de 60 min en algunos ensayos. Tal como se ilustra en la patente estadounidense n.º 5.820.873, al menos tres características influyen la tasa de intercambio: longitud de cadena de acilo, saturación de cadena de acilo, y tamaño del grupo principal de la barrera estérica. Los compuestos que tienen variaciones adecuadas de estas características pueden ser útiles en la presente. Para algunas aplicaciones terapéuticas puede ser preferible que el lípido modificado por PEG se pierda rápidamente de la partícula de lípido-ácido nucleico *in vivo* y por lo tanto el lípido modificado por PEG poseerá anclas de lípidos relativamente cortas. En otras aplicaciones terapéuticas puede ser preferible que la partículas de lípido-ácido nucleico exhiban una vida de circulación en plasma más larga y por lo tanto el lípido modificado por PEG poseerá anclas de lípidos relativamente más largas.

45 Cabe destacar que los compuestos que evitan la acumulación no requieren necesariamente la conjugación de lípidos para funcionar de manera adecuada. PEG libre o ATTA libre en solución pueden ser suficientes para evitar la acumulación. Si las partículas son estables luego de la formulación, el PEG o ATTA puede dializarse antes de la administración a un sujeto.

50 Los lípidos neutros, cuando están presentes en la partícula de lípido, pueden ser cualquiera de una cantidad de especies de lípidos que existen ya sea en forma zwitteriónica neutra o sin carga a un pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélinea, dihidrosfingomiélinea, cefalina, y cerebrosidina. La selección de lípidos neutrales para usar en las partículas descritas en la presente es generalmente guiada por consideración de, por ejemplo, el tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Preferentemente, el componente de lípido neutral es un lípido que tiene dos grupos acilo, (es decir, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina). Los lípidos con una variedad de grupos de cadena acilo de diferente longitud de cadena y grado de saturación, están disponibles o pueden estar aislados o sintetizados por técnicas conocidas. En un grupo de realizaciones, se prefieren los lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C_{10} a C_{20} . En otro grupo de realizaciones, se usan los lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C_{10} a C_{20} . De

manera adicional, se pueden usar lípidos con mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Preferentemente, los lípidos neutros usados en la presente son DOPE, DSPC, POPC, DPPC o cualquier fosfatidilcolina relacionado. Los lípidos neutros útiles en la presente también pueden estar compuestos por esfingomielina, dihidroesfingomielina, o fosfolípidos con otros grupos principales, tales como serina e inositol.

- 5 El componente de esteroles de la mezcla de lípidos, cuando está presente, puede ser cualquiera de esos esteroides usados de forma convencional en el campo del liposoma, vesícula de lípidos o preparación de partículas de lípidos. Un esteroles preferido es el colesterol.

Otros lípidos catiónicos, que portan una carga positiva neta a aproximadamente pH fisiológico, además de aquellos específicamente descritos anteriormente, pueden también ser incluidos en partículas de lípidos descritas en la presente. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal de cloruro de 1,2-Dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3β -(N,N'-dimetilaminoetano)-carbamoilcolesterol ("DC-Chol"), trifluoracetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"), dioctadecil-amido-glicilo carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N, N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA"), y bromuro de N-(1,2-dimistiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethyl amonio ("DMRIE"). De manera adicional, se pueden utilizar una cantidad de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN (que incluye DOTMA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL), y LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL). En realizaciones particulares, un lípido catiónico es un lípido amino.

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en partículas de lípidos descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácidos diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidiletanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol, y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

25 En numerosas realizaciones, los lípidos anfipáticos están incluidos en partículas de lípidos descritos en la presente. Los "lípidos anfipáticos" se refieren a cualquier material adecuado en donde la parte hidrofóbica del material lipídico se oriente hacia una fase hidrofóbica, mientras que la parte hidrofílica se oriente hacia la fase acuosa. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos representativos incluyen esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, o dilinoleoilfosfatidilcolina. También pueden usarse otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles, y β -aciloxiácidos. Además, dichos lípidos anfipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

35 También adecuados para la inclusión en las partículas de lípidos descritas en la presente son los lípidos de fusión programables. Tales partículas de lípidos tienen poca tendencia a fusionarse con membranas celulares y administrar su carga hasta que ocurre un evento de señal dado. Esto permite que la partícula de lípido se distribuya de forma más pareja después de la inyección en un sitio de enfermedad u organismo antes de que comience a fusionarse con las células. El evento de señal puede ser, por ejemplo, un cambio en pH, temperatura, entorno iónico, o tiempo. En el último caso, un componente que "encubre" o demora la fusión, tal como un conjugado de ATTA-lípido o un conjugado de PEG-lípido, puede simplemente intercambiar fuera de la membrana de partícula de lípido en el tiempo. Para cuando la partícula de lípido esté adecuadamente distribuida en el cuerpo, ha perdido suficiente agente de encubrimiento para ser fusogénico. Con otros eventos de señal, es deseable elegir una señal que está asociada con el sitio de enfermedad o célula objetivo, tal como la temperatura aumentada en un sitio de inflamación.

45 En determinadas realizaciones, es deseable dirigirse a las partículas lipídicas descritas en la presente usando restos de direccionamiento que son específicos para un tipo de célula o tejido. El direccionamiento de las partículas lipídicas usando una variedad de restos de direccionamiento, tales como ligandos, receptores de la superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales, se ha descrito previamente (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 4.957.773 y 4.603.044). Los restos de direccionamiento pueden comprender la proteína entera o fragmentos de esta. Los mecanismos de direccionamiento en general requieren que los agentes de direccionamiento se posicionen en la superficie de la partícula lipídica de tal manera que el resto objetivo esté disponible para la interacción con la objetivo, por ejemplo, un receptor de la superficie celular. Se conocen una variedad de agentes y métodos de direccionamiento diferentes y están disponibles en la técnica, que incluyen los descritos, por ejemplo, en Sapra, P. y Allen, TM, Prog. Lipid Res. 42(5):439-62 (2003); y Abra, RM et al., J. Liposome Res. 12:1-3, (2002).

Se ha propuesto el uso de partículas de lípidos, es decir, liposomas, con un recubrimiento de superficie de cadenas de polímeros hidrofílicas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG) para el direccionamiento (Allen, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1237: 99-108 (1995); DeFrees, et al., Journal of the American Chemistry Society 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1149: 180-184 (1993); Klivanov, et al., Journal of Liposome Research 2: 321-334 (1992); patente estadounidense n.º 5.013556; Zalipsky, Bioconjugate Chemistry 4:

296-299 (1993); Zalipsky, FEBS Letters 353: 71-74 (1994); Zalipsky, en Stealth Liposomes Capítulo 9 (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL (1995). En un enfoque, un ligando, tal como un anticuerpo, para dirigirse a la partícula de lípido está unido al grupo principal polar de lípidos que forman la partícula de lípido. En otro enfoque, el ligando de direccionamiento está unido a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el revestimiento de polímero hidrofílico (Klibanov, et al., Journal of Liposome Research 2: 321-334 (1992); Kirpotin et al., FEBS Letters 388: 115-118 (1996)).

Pueden usarse tales métodos estándar para acoplar los agentes objetivos. Por ejemplo, se puede usar, fosfatidiletanolamina, que se puede activar para la unión con agentes objetivo, o compuestos lipofílicos derivatizados, tales como bleomicina derivatizada de lípido. Los liposomas dirigidos al anticuerpo se pueden construir usando por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (ver, por ejemplo, Renneisen, et al., J. Bio. Chem., 265:16337-16342 (1990) y Leonetti, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87:2448-2451 (1990). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpo se describen en la patente estadounidense la patente estadounidense n.º 6.027.726. Ejemplos de restos de direccionamiento pueden incluir otras proteínas que son específicos para componentes celulares, que incluyen antígenos asociados con neoplasmas o tumores. Las proteínas usadas como restos de direccionamiento pueden unirse con las liposomas mediante enlaces covalentes (ver, Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de direccionamiento incluyen el sistema de biotina-avidina.

En una realización de ejemplo, la partícula de lípido comprende una mezcla de un lípido catiónico descrito en la presente, los lípidos neutros (diferentes de un lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado por PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o PEG-DMA). En determinadas realizaciones, la mezcla de lípido consiste en o consiste esencialmente en un lípido catiónico descrito en la presente, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado por PEG. En realizaciones preferidas adicionales, la partícula de lípido consiste en o consiste esencialmente en la mezcla de lípido anterior en relaciones molares de aproximadamente 20-70 % de lípido amino: 5-45 % de lípido neutro:20-55 % de colesterol:0,5-15 % de lípido modificado por PEG.

En realizaciones particulares, la partícula de lípido consiste en o consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegidos de lípidos descritos en las Tablas 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol, y o bien PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 20-60 % de lípido catiónico: 5-25% DSPC :25-55% Chol:0,5-15% PEG-DMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro, DSPC, en estas composiciones es reemplazado con POPC, DPPC, DOPE o SM.

Composiciones y formulaciones de agente terapéutico-partícula de lípido

Se proporcionan las composiciones que incluyen una partícula de lípido y un agente activo, donde el agente activo está asociado con la partícula de lípido. En realizaciones particulares, el agente activo es un agente terapéutico. En realizaciones particulares, el agente activo está encapsulado dentro de un interior acuoso de la partícula de lípido. En otras realizaciones, el agente activo está presente dentro de una o más capas de lípidos de la partícula de lípido. En otras realizaciones, el agente activo está unido a la superficie de lípido exterior o interior de una partícula de lípido.

"Completamente encapsulado", tal como se usa en la presente, indica que el ácido nucleico en las partículas no se degrada de forma significativa luego de la exposición al suero o a un ensayo de nucleasa que degradaría de forma significativa los ácidos nucleicos libres. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente menos del 25 % del ácido nucleico de la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100 % del ácido nucleico libre, más preferentemente menos del 10 % y más preferentemente menos de 5 % del ácido nucleico de la partícula. De manera alternativa, la encapsulación completa se puede determinar mediante un ensayo Oligreen®. Oligreen® es un colorante de ácido nucleico fluorescente ultra-sensible para cuantificar los oligonucleótidos y ADN de cadena simple en solución (disponible de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Completamente encapsulado también sugiere que las partículas son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus componentes tras la administración *in vivo*.

Los agentes activos, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado en una célula, tejido, órgano o sujeto. Tales efectos pueden ser biológicos, fisiológicos o cosméticos, por ejemplo. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto, que incluye, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos y polipéptidos, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes, y anticuerpos Primatized™, citocinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores que inducen la diferenciación, receptores de superficie celular y sus ligandos; hormonas; y moléculas pequeñas, que incluyen compuestos o moléculas orgánicas pequeñas.

En una realización, el agente activo es un agente terapéutico o una sal o derivado de este. Los derivados de agentes terapéuticos pueden ser terapéuticamente activos ellos mismos o pueden ser profármacos, que se vuelven activos

luego de modificación adicional. Por lo tanto, en una realización, un derivado de agente terapéutico retiene parte o toda la actividad terapéutica en comparación con el agente sin modificar, mientras que en otra realización, un derivado de agente terapéutico no tiene actividad terapéutica.

5 En varias realizaciones, los agentes terapéuticos incluyen cualquier fármaco o agente terapéuticamente eficaz, tal como compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación anticonceptiva, antipiréticos, vasodilatadores, anti-angiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares, por ejemplo, agentes anti-arritmicos, vasoconstrictores, hormonas y esteroides.

10 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico es un fármaco oncológico, que también puede ser referido como un fármaco antitumor, un fármaco anticanceroso, un fármaco de tumor, un agente antineoplásico o similar. Ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden usar tal como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, alquerano, alopurinol, alretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, azatioprina, bexaroteno, biCNU, bleomicina, busulfán intravenoso, busulfán oral, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, arabinósido de citosina, daunorrubicina, Cytosan, daunorrubicina, dexametasona, dexrazoxano, dodetaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, fosfato de etopósido, etopósido y VP-16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumab-ozogamicina, acetato de goserelina, hidrea, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón, irinotecán (Campostar, CPT-111), letrozol, leucovorina, leustatina, leuprolida, levamisol, litretinoína, megastrol, melfalán, L-PAM, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxano, estreptozocina, STI-571, tamoxifeno, Taxotere, temozolamida, tenipósido, vM-26, topotecán (Hycamtin), toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, velbán, vinblastina, vincristina, VP16 y vinorelbina. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden utilizar tal como se describe en la presente memoria son elipticina y análogos o derivados de elipticina, epotilonas, inhibidores de cinasas intracelulares y camptotecinas.

Partículas de ácido nucleico-lípido

En ciertas realizaciones, las partículas de lípidos descritas en la presente memoria están asociadas con un ácido nucleico, dando lugar a una partícula de ácido nucleico-lípido. En realizaciones particulares, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de lípido. Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión "ácido nucleico" incluya cualquier oligonucleótido o polinucleótido. Los fragmentos que contienen hasta 50 nucleótidos son generalmente denominados oligonucleótidos, y los fragmentos más largos son denominados polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria tienen 15-50 nucleótidos de longitud.

35 En el contexto de la presente descripción, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de nucleótido o monómeros de nucleósido que consisten en bases de origen natural, uniones de azúcares y entre azúcares (cadena principal). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros de origen no natural o partes de estos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se suelen preferir en lugar de las formas naturales debido a propiedades tales como, por ejemplo, mejor absorción celular y mayor estabilidad en la presencia de nucleasas.

45 El ácido nucleico que está presente en una partícula de ácido nucleico-lípido descrito en la presente memoria incluye cualquier forma de ácido nucleico conocida. Los ácidos nucleicos utilizados en la presente pueden ser ADN o ARN de cadena simple, o ADN o ARN de cadena doble, o híbridos de ADN-ARN. Ejemplos de ADN de cadena doble incluyen genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y terminación, y sistemas de auto replicación tales como ADN viral o plásmido. Ejemplos de ARN de doble cadena incluyen ARN_i y otros reactivos de interferencia por ARN. Los ácidos nucleicos de cadena simple incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN, y oligonucleótidos formadores de triples. El ácido nucleico que está presente en una partícula de ácido nucleico-lípido descrito en la presente memoria puede incluir una o más de las modificaciones de oligonucleótidos descritas más adelante.

50 Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden tener varias longitudes, que dependen generalmente en la forma particular del ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden ser de aproximadamente 1000 a 100,000 restos de nucleótidos de longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden variar de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud. En varias realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, de cadena simple, de cadena doble y de cadena triple, pueden variar en longitudes de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 20 a alrededor 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a alrededor 30 nucleótidos, de aproximadamente 20 a alrededor 30 nucleótidos de longitud.

En realizaciones particulares, el oligonucleótido (o una cadena de este) descrito en la presente memoria se hibrida específicamente o es complementaria a un polinucleótidos objetivo. "Específicamente hibridable" y "complementario"

son términos que son usados para indicar un grado suficiente de complementariedad, de modo que se produzca una unión estable y específica entre el ADN o ARN objetivo y el oligonucleótido. Se comprende que no es necesario que un oligonucleótido sea 100 % complementario con respecto a su secuencia de ácido nucleico objetivo para poder hibridarse de forma específica. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido al objetivo interfiere con la función normal de la secuencia objetivo para causar una pérdida de utilidad o expresión de este, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no objetivo en condiciones donde se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las cuales se llevan a cabo los ensayos. Por lo tanto, en otras realizaciones, este oligonucleótido incluye 1, 2 o 3 sustituciones de bases, por ejemplo, mal apareamientos, en comparación con la región de una secuencia génica o de ARNm a la que se dirige o a la que hibrida de forma específica.

Ácidos nucleicos de interferencia por ARN

En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido están asociadas con moléculas de interferencia por ARN (iARN). Los métodos de interferencia por ARN usando moléculas de iARN se pueden usar para alterar la expresión de un gen o polinucleótido de interés. El ARN interferente pequeño (ARNip) ha sustituido esencialmente a los ODN y ribozimas antisentido como la próxima generación de fármacos de oligonucleótidos dirigidos en desarrollo.

Los ARNip son dúplex de ARN de normalmente 16-30 nucleótidos de largo que pueden asociarse con un complejo de multi-proteínas citoplásmicas conocido como complejo e silenciamiento inducido por iARN (RISC). RISC cargado con ARNip media la degradación de transcripciones de ARNm homólogo, por lo tanto ARNip se puede diseñar para inactivar la expresión de proteínas con alta especificidad. A diferencia de otras tecnologías antisentido, la función del ARNip a través de un mecanismo natural evolucionó para controlar la expresión génica a través de ARN no codificante. Esto generalmente se considera la razón por la cual su actividad es más potente *in vitro* e *in vivo* que el ODN antisentido o las ribozimas. Una variedad de reactivos iARN, que incluye ARNip que se dirige clínicamente a objetivos relevantes, se encuentran actualmente en desarrollo farmacéutico, tal como se describen, por ejemplo en de Fougerolles, A. et al., Nature Reviews 6:443-453 (2007).

Aunque las primeras moléculas de iARN descritas fueron híbridos ARN:ARN que comprendían tanto un ARN sentido como una cadena de ARN antisentido, ahora se ha demostrado que los híbridos de ADN sentido:ARN antisentido, los híbridos de ARN sentido:ADN antisentido, y los híbridos de ADN:ADN son capaces de mediar la iARN (Lamberton, J.S. y Christian, A.T., (2003) Molecular Biotechnology 24:111-119). Por lo tanto, en la presente memoria se describe el uso de moléculas de iARN que comprenden cualquiera de estos diferentes tipos de moléculas de doble cadena. Además, se entiende que las moléculas de iARN pueden ser usadas y ser introducidas en las células en una variedad de formas. Por consiguiente, tal como se usa en la presente memoria, moléculas de iARN abarca cualquiera y toda molécula capaz de inducir una respuesta de iARN en las células, que incluye, pero no se limitan a, oligonucleótidos de doble cadena que comprenden dos cadenas separadas, es decir, una cadena sentido y una cadena antisentido, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip); oligonucleótido de doble cadena que comprende dos cadenas separadas que están unidas entre sí por un enlazador que no es un nucleotidilo; los oligonucleótidos que comprenden un bucle de horquilla de secuencias complementarias, que forma una región de doble cadena, por ejemplo, moléculas iARNhc, y vectores de expresión que expresan uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido de doble cadena solo o en combinación con otro polinucleótido.

Un "compuesto de ARNip de cadena simple" como se usa en la presente, es un agente de ARNip que está hecho de una molécula individual. Puede incluir una región doble formada por pares entre cadenas, p. ej., puede ser, o incluir, una estructura tipo horquilla o pan. Los compuestos de ARNip de cadena individual puede ser antisentido con respecto a la molécula objetivo.

Un compuesto de ARNip de cadena simple puede ser lo suficientemente largo como para entrar en el RISC y participar en la escisión mediada por RISC de un ARNm objetivo. Un compuesto de ARNip de cadena simple tiene al menos 14 y en otras realizaciones al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, tiene menos de 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los compuestos de ARNip de horquilla tendrán una región dúplex igual o al menos 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región dúplex puede ser igual o menor que 200, 100 o 50 en longitud. En determinadas realizaciones, los intervalos de la región dúplex tienen 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla puede tener un excedente de una sola cadena o región no apareada terminal. En determinadas realizaciones, los excedentes tienen 2-3 nucleótidos de largo. En algunas realizaciones, el excedente se encuentra en el lado sentido de la horquilla y en algunas realizaciones en el lado antisentido de la horquilla.

Una "compuesto de ARNip de cadena doble" tal como se usa en la presente, es un compuesto de ARNip que incluye más de uno, y en algunos casos dos, cadenas en las que la hibridación entre cadenas puede formar una región de estructura dúplex.

La cadena antisentido de un compuesto de ARNip de doble cadena puede ser igual a o tener al menos, 14, 15, 16

17, 18, 19, 25, 29, 40, o 60 nucleótidos de longitud. Puede ser igual a o tener menos de 200, 100, o 50 nucleótidos de longitud. Los intervalos pueden ser 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud. Tal como se usa en la presente, el término “cadena antisentido” significa la cadena de un compuesto de ARNip que es lo suficientemente complementario a una molécula objetivo, por ejemplo, un ARN objetivo.

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

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

En muchas realizaciones, el compuesto de ARNip es lo suficientemente grande que puede ser escindido por una molécula endógena, por ejemplo, por Dicer, para producir compuestos de ARNip más pequeños, por ejemplo, agentes de ARNip.

- 15 Las cadenas sentido y antisentido pueden ser elegidas de modo que el compuesto de ARNip de cadena doble incluya una cadena simple o región no apareada en uno o ambos extremos de la molécula. Por lo tanto, un compuesto de ARNip de doble cadena puede contener cadenas sentido y antisentido, emparejadas para contener un excedente, por ejemplo, uno o dos excedentes 5' o 3', o un excedente 3' de 1 - 3 nucleótidos. Los excedentes pueden ser resultado de que una cadena sea más larga que la otra, o el resultado de que dos cadenas de la misma longitud estén escalonadas. Algunas realizaciones tendrán al menos un excedente 3'. En una realización, ambos extremos de una molécula de ARNip tendrán un excedente 3'. En algunas realizaciones, el excedente tiene 2 nucleótidos.

- 25 En determinadas realizaciones, la longitud para la región duplexada se encuentra entre 15 y 30, o 18, 19, 20, 21, 22 y 23 nucleótidos en longitud, por ejemplo, en el intervalo de compuestos de ARNip adherente mencionado anteriormente. Los compuestos de ARNip adherente pueden asemejarse en longitud y estructura a los productos naturales procesados por Dicer a partir de DsiRNA largos. También se incluyen realizaciones en las que las dos cadenas del compuesto de ARNip adherente están ligadas, por ejemplo, ligadas de forma covalente. También se describen en la presente estructuras en horquilla u otras estructuras de cadena simple que proporcionan la requerida región de doble cadena, y un excedente 3'.

- 30 Los compuestos de ARNip descritos en la presente, que incluyen compuestos de ARNip de cadena doble y compuestos de ARNip de cadena simple pueden mediar el silenciamiento de un ARN objetivo, por ejemplo, ARNm, por ejemplo, una transcripción de un gen que codifica una proteína. Por conveniencia, tal ARNm también es denominado en la presente memoria ARNm que ha de ser silenciado. Tal gen también es denominado gen objetivo. En general, el ARN que ha de ser silenciado es un gen endógeno o un gen patógeno. Además, también pueden dirigirse ARN distintos del ARNm, por ejemplo, los ARNt y los ARN virales.

Tal como se usa en la presente, la frase “media iARN” se refiere a la capacidad de silenciar, en una manera específica a la secuencia, un ARN objetivo. Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que el silenciamiento usa la maquinaria o el proceso de iARN y un ARN guía, por ejemplo, un compuesto de ARNip adherente de 21 a 23 nucleótidos.

- 40 En una realización, un compuesto de ARNip es “suficientemente complementario” respecto a un ARN objetivo, por ejemplo, un ARNm objetivo, de modo que el compuesto de ARNip silencia la producción de la proteína codificada por el ARNm objetivo. En otra realización, el compuesto de ARNip es “exactamente complementario” respecto a un ARN objetivo, por ejemplo, el ARN objetivo y el compuesto de ARNip se hibridan, por ejemplo, para formar un híbrido hecho exclusivamente de pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un ARN objetivo “suficientemente complementario” puede incluir una región interna (por ejemplo, de al menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria respecto a un ARN objetivo. Además, en determinadas realizaciones, el compuesto de ARNip discrimina específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el compuesto de ARNip solo media la iARN si se encuentra un elemento complementario exacto en la región (por ejemplo, dentro de 7 nucleótidos de) la diferencia de un solo nucleótido.

50 **MicroARN**

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

La cantidad de secuencias de miARN identificadas hasta la fecha es grande y en aumento, ejemplos ilustrativos de las cuales se pueden encontrar, por ejemplo, en: "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; "The microRNA Registry" Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; y también en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

Oligonucleótidos antisentido

En una realización, un ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido objetivo. El término "oligonucleótido antisentido" o simplemente "antisentido" pretende incluir oligonucleótidos que son complementarios con una secuencia de polinucleótidos objetivo. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias con una secuencia elegida, por ejemplo, un ARNm de gen objetivo. Se cree que los oligonucleótidos antisentido inhiben la expresión génica al unirse a un ARNm complementario. La unión al ARNm objetivo puede llevar a la inhibición de la expresión génica ya sea al prevenir la traducción de las cadenas de ARNm complementarias al unirse a esta, o al llevar la degradación del ARNm objetivo. El ADN antisentido se pueden usar para dirigirse a un ARN específico, complementario (codificante o no codificante). Si se lleva a cabo la unión, este híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima RNasa H. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos antisentido contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El término también abarca los oligonucleótidos antisentido que puede que no sean exactamente complementarios respecto al gen objetivo deseado. Por lo tanto, la invención se puede utilizar en instancias donde las actividades específicas que no son objetivo se encuentran con antisentido, o donde una secuencia antisentido que contiene uno o más mal apareamientos con la secuencia objetivo es la más preferida para un uso particular.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido son eficaces y que se dirijan a inhibidores de síntesis de proteínas, y, consecuentemente, se pueden utilizar para inhibir específicamente la síntesis de proteínas mediante un gen objetivo. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la síntesis de las proteínas está bien establecida. Por ejemplo, la síntesis de la poligalacturonasa y el receptor muscarínico de la acetilcolina tipo 2 son inhibidos por los oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus secuencias ARNm respectivas (patente estadounidense 5.739.119 y patente estadounidense 5.759.829). Adicionalmente, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la ciclina de proteína nuclear, el gen de resistencia de múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABA_A estriatal y EGF humano (Jaskulski et al., Science. 10 de junio de 1988; 240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989;1(4):225-32; Peris et al., Brain Res Mol Brain Res. 15 de junio de 1998; 57(2):310-20; patente estadounidense 5.801.154; patente estadounidense 5.789.573; patente estadounidense 5.718.709 y patente estadounidense 5.610.288). Además, también se han descrito construcciones antisentido que inhiben y se pueden utilizar para tratar una variedad de proliferaciones celulares anormales, por ejemplo, cáncer (patente estadounidense 5.747.470; patente estadounidense 5.591.317 y patente estadounidense 5.783.683).

Los métodos para producir los oligonucleótidos antisentido son conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido que se dirige a cualquier secuencia de polinucleótidos. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicas para una secuencia objetivo dada se basa en el análisis de la secuencia objetivo elegida y la determinación de la estructura secundaria, T_m , la energía de unión y la estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antisentido se pueden seleccionar en función de su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas, y otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm objetivo en una célula hospedadora. Las regiones objetivo más preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción de AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' de la ARNm. Estas consideraciones del análisis de la estructura secundaria y de la selección del sitio objetivo se pueden realizar, por ejemplo, utilizando el software OLIGO v.4 para los análisis de cebadores (Molecular Biology Insights) y/o el software de algoritmo BLASTN 2.0,5 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

Antagomires

Los antagomires son oligonucleótidos de tipo ARN que alojan varias modificaciones para la protección de RNasa y propiedades farmacológicas, tales como captación mejorada tisular y celular. Difieren del ARN normal, por ejemplo, por la 2'-O-metilación completa del azúcar, la cadena principal de fosforotioato y, por ejemplo, un resto de colesterol en el extremo 3'. Los antagomires se pueden usar para silenciar de forma eficaz los miARN endógenos al formar dúplex que comprenden el antagomir y miARN endógeno, lo cual impide de este modo el silenciamiento génico inducido por miARN. Un ejemplo de silenciamiento del miARN mediado por antagomires es el silenciamiento de miR-122, descrito en Krutzfeldt et al, Nature, 2005, 438: 685-689. Los ARN de antagomir se pueden sintetizar mediante el uso de protocolos estándar de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida. Ver las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2007/0123482 y 2007/0213292.

Un antagomir puede incluir subunidades de monómeros conjugadas por ligandos y monómeros para la síntesis de oligonucleótidos. Los monómeros de ejemplo se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2005/0107325. Un antagomir puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en WO 2004/080406. Se puede

hacer que un antagomir forme un complejo con un resto anfipático. Restos anfipáticos de ejemplo para usar con agentes de oligonucleótidos se describen en WO 2004/080406.

Aptámeros

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

Ribozimas

De acuerdo con otra realización descrita en la presente memoria, las partículas de ácido nucleico-lípidos están asociadas con las ribozimas. Las ribozimas son complejos de moléculas de ARN que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim y Cech, Proc Natl Acad Sci USA. diciembre de 1987; 84(24):8788-92; Forster y Symons, Cell. 24 de abril de 1987; 49(2):211-20). Por ejemplo, una gran cantidad de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia fosfoéster con un alto grado de especificidad, lo cual escinde generalmente solo uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótidos (Cech et al., Cell. diciembre de 1981; 27(3 Pt 2):487-96; Michel y Westhof, J Mol Biol. 5 de diciembre de 1990;216(3):585-610; Reinhold-Hurek y Shub, Nature. 14 de mayo de 1992; 357(6374):173-6). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una, mediante interacciones de formación de pares de bases específicas, a una secuencia de guía interna ("IGS", por sus siglas en inglés) del ribozima antes de la reacción química.

Al menos seis variedades básicas de ARN enzimáticos de origen natural son conocidas en la actualidad. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de las uniones fosfodiéster del ARN *in trans* (y por lo tanto puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN objetivo. Tal unión ocurre a través de la parte de unión objetivo de un ácido nucleico enzimático que se mantiene cerca de una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN objetivo. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y luego une un ARN objetivo mediante la formación de bases complementarias, y una vez unidas al sitio correcto, actúan enzimáticamente para cortar el ARN objetivo. La escisión estratégica de dicho ARN destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada. Luego de que un ácido nucleico enzimático ha unido y escindido su ARN objetivo, se libera de ese ARN para buscar otro objetivo y puede unir y escindir repetidamente nuevos objetivos.

La molécula de ácido nucleico enzimática se puede formar un motivo de cabeza de martillo, horquilla, un virus de la hepatitis δ , intrón del grupo I o ARN de RNasa P (asociado con una secuencia de guía de ARN), o ARN de Neurospora VS, por ejemplo. Ejemplos específicos de motivos de cabeza de martillo se describen en Rossi et al. Nucleic Acids Res. 11 de setiembre de 1992; 20(17):4559-65. Los ejemplos de motivos de horquilla se describen en Hampel et al. (publicación de solicitud de patente Europea n.º EP 0360257), Hampel y Tritz, Biochemistry 1989 Jun 13;28(12):4929-33; Hampel et al., Nucleic Acids Res. 25 de enero de 1990; 18(2):299-304 y patente estadounidense 5.631.359. Un ejemplo del motivo del virus de hepatitis δ es descrito por Perrotta y Been, Biochemistry. 1 de diciembre de 1992; 31(47):11843-52; un ejemplo del motivo de RNasaP se describe en Guerrier-Takada et al., Cell. diciembre de 1983; 35(3 Pt 2):849-57; el motivo de la ribozima de ARN vs Neurospora se describe en Collins (Saville y Collins, Cell. 18 de mayo de 1990; 61(4):685-96; Saville y Collins, Proc Natl Acad Sci USA. 1 de octubre de 1991; 88(19):8826-30; Collins y Olive, Biochemistry. 23 de marzo de 1993; 32(11):2795-9); y un ejemplo del intrón del Grupo I se describe en la patente estadounidense 4.987.071. Las características importantes de las moléculas de ácido nucleico enzimático utilizadas tal como se describe en la presente memoria son que tienen un sitio de unión de sustrato específico que es complementario a uno o más de las regiones de ADN o ARN del gen objetivo, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro de o rodeando ese sitio de unión de sustrato que imparte una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto, las construcciones de ribozimas no tienen por qué estar limitadas a motivos específicos mencionados en la presente.

Los métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Las ribozimas pueden estar diseñadas tal como se describen en las publicaciones de solicitudes de

patentes internacionales n.º WO 93/23569y WO 94/02595, y sintetizadas para ser sometidas a prueba *in vitro* e *in vivo* tal como se describen allí.

5 La actividad de las ribozimas puede ser optimizada al alterar la longitud de los brazos de unión de la ribozima o al sintetizar las ribozimas con modificaciones que impiden su degradación mediante ribonucleasas de suero (ver, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales n.º WO 92/07065, WO 93/15187, y WO 91/03162; publicación de solicitud de patente europea n.º 92110298.4; patente estadounidense 5,334,711; y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 94/13688, que describen diversas modificaciones químicas que pueden realizarse a los restos de azúcar de moléculas enzimáticas de ARN), modificaciones que potencian su eficacia en las células, y eliminación de bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir los requisitos químicos.

Oligonucleótidos inmunoestimuladores

15 Los ácidos nucleicos asociados con las partículas de lípidos descritas en la presente memoria pueden ser inmunoestimuladores, que incluyen oligonucleótidos inmunoestimuladores (ISS; de cadena simple o doble) capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a un sujeto, que puede ser un mamífero u otro paciente. El ISS incluye, por ejemplo, determinados palíndromos que llevan a estructuras secundarias horquilla (ver, Yamamoto S., et al. (1992) J. Immunol. 148: 4072-4076), o motivos CpG, así como otras característica ISS conocidas (tales como dominios multi-G, ver WO 96/11266).

20 La respuesta inmunitaria puede ser innata o una respuesta inmunitaria adaptativa. El sistema inmunitario se divide en un sistema inmunitario más innato, y el sistema inmunitario adaptivo adquirido de vertebrados, el último de los cuales se divide adicionalmente en componentes celulares humorales. En realizaciones particulares, la respuesta inmunitaria puede ser mucosal.

En realizaciones particulares, un ácido nucleico inmunoestimulador es solo inmunoestimulador cuando se administra en combinación con una partícula de lípido, y no es inmunoestimuladora cuando se administra en su "forma libre". De acuerdo con la presente descripción, se considera que tal oligonucleótido es inmunoestimulador.

25 Se considera que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores no son específicos de la secuencia cuando no se requiere que se unan y reduzcan específicamente la expresión de un polinucleótido objetivo para provocar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, determinados ácidos nucleicos inmunoestimuladores pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen o ARNm de origen natural, pero aún pueden ser considerados ácidos nucleicos inmunoestimuladores no específicos de la secuencia.

30 En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG puede estar metilado o sin metilar. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido CpG que tienen una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un único dinucleótido CpG, donde la citosina en dicho dinucleótido CpG está metilada. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3'. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, donde al menos una citosina en los dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina en los dinucleótidos CpG presente en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos CpG, donde al menos uno de dichos dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada.

40 En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TTCCATGACGTTCTGACGT 3'. En otra realización específica, la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia 5' TCCATGACGTTCTGACGT 3', donde las dos citosinas indicadas en negrita están metiladas. En realizaciones particulares, el ODN se selecciona de un grupo de ODN que consiste en ODN #1, ODN #2, ODN #3, ODN #4, ODN #5, ODN #6, ODN #7, ODN #8, y ODN #9, tal como se muestra más adelante.

Tabla 5. Oligonucleótidos inmunoestimuladores de ejemplo (ODN)

NOMBRE DE ODN	SEQ ID	SECUENCIA de ODN (5'-3')
ODN 1 C-myc humano		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3
* ODN 2m		5'-TCCATGAZGTTCTGAZGTT-3
ODN 3		5'-TAAGCATACGGGGTGT-3
ODN 5		5'-AACGTT-3

ES 2 749 426 T3

NOMBRE DE ODN	SEQ ID	SECUENCIA de ODN (5'-3')
ODN 6		5'-GATGCTGTGTCTCGGGGTCTCCGGG C-3'
ODN 7		5'-TCGTTCGTTTTTGTCTTTTTGTCTGTT-3'
ODN 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9		5'-TCTCCCAGCGTGCCCAT-3'
ODN 10 murina Intracelular Molécula-1 de adhesión		5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
ODN 11 humano Intracelular Molécula-1 de adhesión		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 12 humano Intracelular Molécula-1 de adhesión		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 13 humano erb-B-2		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ODN 14 humano c-myc		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 15 humano c-myc		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
Receptor de Factor de crecimiento de Insulina 1 de ODN 17 humano		5'-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3'
Receptor de Factor de crecimiento de Insulina 1 de ODN 18 humano		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
Receptor de Factor de crecimiento Epidérmico de ODN 19 humano		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
Receptor de Factor de crecimiento Epidérmico de ODN 20		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
Factor de crecimiento endotelial vascular de ODN 21 humano		5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
Fosfocinasa C - alfa de ODN 22 murino		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ODN 24 humano Bcl-2		5'-TCT CCCAGCGTGCCCAT-3'
ODN 25 humano C-Raf-s		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
Receptor 1 de Factor de crecimiento endotelial vascular de ODN #26 humano		5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG - CCGAAAGUCUG-3'
ODN #27		5'-RRCGYY-3'
ODN # 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN #29		5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
ODN #30 humano c-myc		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'
"Z" representa un resto de citosina metilada. ODN 14 es un oligonucleótido de 15-mero y ODN 1 es el mismo oligonucleótido que tiene una timidina agregada en el extremo 5' que convierte ODN 1 en un 16-mero. No se ha detectado diferencia en actividad biológica entre ODN 14 y ODN 1 y ambos exhiben actividad inmunoestimuladora similar (Mui et al., 2001)		

Secuencias de ácido nucleico específico adicionales de oligonucleótidos (ODN) adecuadas para usar en las composiciones y métodos descritos en la presente se describen en Raney et al., Journal of Pharmacology and

Experimental Therapeutics, 298:1185-1192 (2001). En determinadas realizaciones, los ODN utilizados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria tienen una estructura fosfodiéster ("PO") o una estructura fosforotioato ("PS"), y/o al menos un resto de citosina metilada en un motivo CpG.

Oligonucleótidos señuelo

5 Dado que los factores de transcripción reconocen sus secuencias de enlace relativamente cortas, aun en ausencia de ADN genómico circundante, los oligonucleótidos cortos que tienen la secuencia de enlace de consenso de un factor específico de transcripción pueden ser usados como herramientas para manipular la expresión génica en células vivas. Esta estrategia implica la administración intracelular de tales "oligonucleótidos señuelo", que luego son reconocidos y unidos por el factor objetivo. La ocupación del sitio de unión de ADN del factor de transcripción por el
10 señuelo vuelve al factor de transcripción incapaz de unirse posteriormente a las regiones promotoras de genes objetivo. Los señuelos pueden ser usados como agentes terapéuticos, ya sea para inhibir la expresión de genes que son activados por un factor de transcripción, o para regular por aumento genes que son suprimidos por la unión de un factor de transcripción. Se pueden encontrar ejemplos de la utilización de oligonucleótidos señuelo en Mann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075.

15 Supermir

Un supermir se refiere a un oligómero o polímero de cadena simple, de cadena doble o parcialmente de cadena doble de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), o ambos o modificaciones de estos, que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a un miARN y que es antisentido con respecto a su objetivo. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases, azúcares y uniones covalentes de internucleósidos (cadena principal) de origen natural y que contienen al menos una parte de origen no natural que funciona de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren en vez de las formas naturales por propiedades deseables tal como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada para dirigirse hacia ácido nucleico y estabilidad aumentada en la presencia de nucleasas. En una realización preferente, el supermir no incluye una cadena sentido, y en otra realización preferida, el supermir no se autohibrida de manera
25 significativa. Un supermir descrito en la presente memoria puede tener una estructura secundaria, pero es sustancialmente de cadena simple en condiciones fisiológicas. Un supermir que es sustancialmente de cadena simple es de cadena simple en la medida en que menos de aproximadamente 50 % (por ejemplo, menos de aproximadamente 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 %) del supermir forma un dúplex consigo mismo. El supermir puede incluir un segmento de horquilla, por ejemplo, una secuencia, preferentemente en el extremo 3' puede autohibridarse y formar una región doble, por ejemplo, una región doble de al menos 1, 2, 3 o 4 y, preferentemente menos de 8, 7, 6, o n nucleótidos, por ejemplo, 5 nucleótidos. La región duplicada puede estar conectada por un enlazador, por ejemplo, un enlazador de nucleótido, por ejemplo, 3, 4, 5, o 6 dTs, por ejemplo, dTs modificados. En otra realización el supermir está duplicado con un oligo más corto, por ejemplo, de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud, por ejemplo, en uno o ambos del extremo 3' y 5' o en un extremo y en la parte no terminal o del medio del supermir.

35 Imitadores de miARN

Los imitadores de miARN representan una clase de moléculas que pueden ser usadas para imitar la capacidad de silenciamiento génico de uno o más miARN. Por lo tanto, el término "imitación de microARN" se refiere a ARN sintéticos no codificantes (es decir, el miARN no es obtenido mediante purificación de una fuente del miARN endógeno) que son capaces de entrar a la vía de iARN y regular la expresión génica. Los imitadores de miARN se pueden diseñar como moléculas maduras (por ejemplo, de cadena simple) o como precursores imitadores (por ejemplo, pri o pre- miARN). Los imitadores de miARN pueden estar comprendidos por ácido nucleico (ácidos nucleicos modificados o no modificados), que incluye oligonucleótidos que comprenden, pero no se limitan a, ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados, o ácidos nucleicos puenteados con 2'-O,4'-C-etileno (ENA), o cualquier combinación de los anteriores (que incluye híbridos de ADN-ARN). Además, los imitadores de miARN pueden comprender conjugados que pueden afectar la administración, compartimentación intracelular, estabilidad, especificidad, funcionalidad, uso de cadena y/o potencia. En un diseño, los miméticos de miARN son moléculas bicatenarias (por ejemplo, con una región dúplex de aproximadamente 16 a aproximadamente 31 nucleótidos en longitud) y contienen una o más secuencias que tienen identidad con la cadena madura de un miARN dado. Las modificaciones pueden comprender modificaciones 2' (que incluyen modificaciones 2'-O-metilo y modificaciones 2' F) en una o ambas cadenas de la molécula y modificaciones internucleótido (por ejemplo, modificaciones de fosforotioato) que aumentan la estabilidad y/o la especificidad del ácido nucleico. Además, los imitadores de miARN pueden incluir excedentes. Los excedentes pueden consistir en 1-6 nucleótidos, ya sea en el extremo 3' o 5' de cualquiera de las cadenas y se pueden modificar para aumentar la estabilidad o funcionalidad. En una realización, un imitador de miARN comprende una región doble de entre 16 y 31 nucleótidos y uno o más de los siguientes patrones de modificación química: la cadena sentido contiene modificaciones de 2'-O-metilo de los nucleótidos 1 y 2 (contando desde el extremo 5' del oligonucleótido sentido), y todas las C y U; las modificaciones de la cadena antisentido pueden comprender la modificación 2' F de todas las C y U, la fosforilación del extremo 5' del oligonucleótido, y enlaces internucleótido estabilizados asociados con un excedente 3' de 2 nucleótidos.
55

Antimir o inhibidor de miARN

Los términos “antimir”, “inhibidor de microARN”, “inhibidor de miR”, o “inhibidor” son sinónimos y se refieren a oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados que interfieren con la capacidad de microARN específicos. En general, los inhibidores son ácido nucleico o ácidos nucleicos modificados en naturaleza, que incluye oligonucleótidos que comprenden ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), o cualquier combinación de los anteriores. Las modificaciones incluyen modificaciones 2' (que incluyen modificaciones alquilo 2'-O y modificaciones 2' F) y modificaciones internucleótido (por ejemplo, modificaciones de fosforotioato) que pueden afectar la distribución, estabilidad, especificidad, compartimentalización intracelular o potencia. Además, los inhibidores miARN pueden comprender conjugados que pueden afectar la administración, compartimentalización intracelular, estabilidad y/o potencia. Los inhibidores pueden adoptar una variedad de configuraciones, que incluyen diseños de cadena simple, cadena doble (dúplex de ARN/ARN o ARN/ADN) y de horquilla, en general, los inhibidores de microARN contienen una o más secuencias o partes de secuencias que son complementarias o parcialmente complementarias con la cepa madura(o cepas) del miARN que se va a seleccionar, además, el inhibidor de miARN también puede comprender secuencias adicionales situadas en 5' y 3' con respecto a la secuencia que es el complemento inverso del miARN maduro. Las secuencias adicionales pueden ser los complementos inversos de las secuencias que son adyacentes al miARN maduro en el pri-miARN del que se deriva el miARN maduro, o las secuencias adicionales pueden ser secuencias arbitrarias (que tienen una mezcla de A, G, C o U). En algunas realizaciones, una o ambas de las secuencias adicionales son secuencias arbitrarias capaces de formar horquillas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia que es el complemento inverso del miARN está flanqueado en el lado 5' y en el lado 3' por estructuras de horquilla. Los inhibidores de micro-ARN, cuando son de doble cadena, pueden incluir discrepancias entre nucleótidos en cadenas opuestas. Además, los inhibidores de micro-ARN pueden estar enlazados a restos conjugados para facilitar la absorción del inhibidor en una célula. Por ejemplo, un inhibidor de micro-ARN puede estar unido al colesterol 5-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3 hidroxipentilcarbamato) que permite la absorción pasiva de un inhibidor de micro-ARN en una célula. Los inhibidores de micro-ARN, que incluyen los inhibidores miARN de horquilla, se describen en detalle en Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13: 723-730 (2007) and in WO2007/095387 y WO 2008/036825. Un experto en la técnica puede seleccionar una secuencia de la base de datos para un miARN deseado y diseñar un inhibidor útil para los métodos descritos en la presente memoria.

Adaptador U1

Los adaptadores U1 inhiben los sitios poliA y son oligonucleótidos bifuncionales con un dominio objetivo complementario con un sitio en el exón terminal del gen objetivo y un “dominio U1” que se une al componente de ARN nuclear U1 más pequeño de la RNPp U1 (Goraczniak, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263). La RNPp U1 es un complejo de ribonucleoproteínas que funciona principalmente para dirigir las etapas tempranas en la formación de espliceosoma al unirse con el límite exón-intrón del pre-ARNm (Brown y Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:77-95). Los nucleótidos 2-11 del extremo 5' del par de bases del ARNp U1 con los 5'ss del pre ARNm. En una realización, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria son adaptadores U1. En una realización, el adaptador U1 puede ser administrado en combinación con al menos un otro agente ARNi.

Modificaciones de oligonucleótidos

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

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

En algunos casos la modificación ocurrirá en todas las posiciones objeto en el oligonucleótido, pero no en muchos de los casos, de hecho no en la mayoría. A modo de ejemplo, una modificación puede solo ocurrir en una posición de extremo 3' o 5', puede ocurrir solo en la región interna, puede ocurrir solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de un oligonucleótido. Una modificación puede ocurrir en una región de cadena doble, una región de cadena simple, o en ambas. Una modificación puede ocurrir solo en la región de cadena doble de un oligonucleótido de cadena doble o puede ocurrir solo en una región de cadena simple de un oligonucleótido de cadena doble. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición de oxígeno que no forma puentes solo puede ocurrir en uno o ambos extremos, puede solo ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones de cadena doble y cadena simple, particularmente en

los extremos. El o los extremos 5' pueden estar fosforilados.

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

En algunas realizaciones se prefiere en particular, por ejemplo, para aumentar la estabilidad, incluir nucleobases particulares en excedentes, o incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en excedentes de cadena simple, por ejemplo, en un excedente de 5' o 3', o en ambos. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en los excedentes. En algunas realizaciones, todas o algunas de las bases en un excedente de 3' o 5' serán modificadas, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente memoria. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en el grupo 2' OH del azúcar ribosa, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, por ejemplo, desoxitimidina, en vez de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones de fosfotioato. No es necesario que los excedentes sean homólogos con la secuencia objetivo.

Más adelante se describen en mayor detalle modificaciones específicas.

El grupo fosfato

El grupo fosfato es una especie cargada de forma negativa. La carga es distribuida por igual en los dos átomos de oxígeno que no forman puentes. Sin embargo, el grupo fosfato se puede modificar al reemplazar uno de los oxígenos con un sustituyente diferente. Un resultado de esta modificación a las cadenas principales de fosfato del ARN puede ser la resistencia aumentada del oligorribonucleótido a la descomposición nucleolítica. Por lo tanto, sin pretender limitarse a la teoría, puede ser deseable en algunas realizaciones introducir alteraciones que tienen como resultado ya sea un enlazador no cargado o un enlazador cargado con distribución de carga no simétrica.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosfortioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de arilo o alquilo y fosfodiésteres. En determinadas realizaciones, uno de los átomos de oxígeno que no forman puentes del fosfato en el resto de la cadena principal de fosfato puede ser reemplazado por cualquiera de los siguientes: S, Se, BR₃ (R es hidrógeno, alquilo, arilo), C (es decir, un grupo alquilo, un grupo arilo, etc...), H, NR₂ (R es hidrógeno, alquilo, arilo), u OR (R es alquilo o arilo). El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, el reemplazo de uno de los oxígenos que no forman puentes con uno de los átomos o grupos de átomos anteriores vuelve quiral al átomo fosforoso; en otras palabras, un átomo fosforoso en un grupo fosfato modificado de esta manera es un centro estereogénico. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer ya sea la configuración "R" (Rp en la presente memoria) o la configuración "S" (Sp en la presente memoria).

Los fosforoditioatos tienen ambos oxígeno que no forman puentes reemplazados por azufre. El centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral, lo cual impide la formación de diastereómeros oligorribonucleótidos. Por lo tanto, sin pretender limitarse a la teoría, modificaciones a ambos oxígenos que no forman puentes, que eliminan el centro quiral, por ejemplo la formación de fosforoditioatos, pueden ser deseables dado que no pueden producir mezclas de diastereómeros. Por lo tanto, los oxígenos que no forman puentes pueden ser, independientemente, cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo).

El enlazador de fosfato también puede ser modificado por el reemplazo del oxígeno puente (es decir, el oxígeno que une el fosfato con el nucleósido), con nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosfortioatos puenteados) y carbono (metilfosfonatos puenteados). El reemplazo puede ocurrir en cualquiera de los oxígenos de unión o en ambos oxígenos de unión. Cuando el oxígeno puente es el oxígeno 3' de un nucleósido, se prefiere el reemplazo con carbono. Cuando el oxígeno puente es el oxígeno 5' de un nucleósido, se prefiere el reemplazo con nitrógeno.

Reemplazo del grupo fosfato

El grupo fosfato puede reemplazarse mediante conectores que no contienen fósforo. Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que dado que el grupo fosfodiéster cargado es el centro de reacción en la degradación nucleolítica, su reemplazo con imitadores estructurales neutros debería impartir estabilidad de nucleasa aumentada. Una vez más, sin pretender limitarse a la teoría, puede ser deseable, en alguna realización, introducir alteraciones en las que el grupo fosfato cargado es reemplazado por un resto neutro.

Los ejemplos de restos que pueden reemplazar el grupo fosfato incluyen, fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilnimino, metilmetilimino, metilhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilnoximetilimino. Los reemplazos preferidos incluyen los grupos metilencarbonilamino y metilmetilimino.

Los enlaces de fosfato modificados donde al menos uno de los oxígenos unidos al fosfato ha sido reemplazado o el grupo fosfato ha sido reemplazado por un grupo no fosforoso también son referidos como "enlace de cadena

principal no fosfodiéster”.

Sustitución de la cadena principal de ribofosfato

También pueden construirse estructuras que imitan oligonucleótidos, donde el enlazador fosfato y el azúcar ribosa se reemplazan por sustitutos de nucleósidos o nucleótidos resistentes a la nucleasa. Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que la ausencia de una cadena principal cargada de manera repetitiva disminuye la unión a las proteínas que reconocen polianiones (por ejemplo, nucleasas). Una vez más, sin pretender limitarse a la teoría, puede ser deseable, en alguna realización, introducir alteraciones en las que las bases están amarradas por una cadena principal sustituta neutra. Los ejemplos incluyen los sustitutos nucleósidos de ácido peptid nucleico (PNA, por sus siglas en inglés), morfilino, ciclobutilo y/o pirrolidina. Un sustituto preferido es un sustituto de PNA.

10 Modificaciones de azúcar

Un ARN modificado puede incluir la modificación de todos o algunos de los grupos de azúcar del ácido ribonucleico. Por ejemplo, el grupo 2' hidroxilo (OH) se puede modificar o reemplazar con una cantidad de sustituyentes “oxi” o “desoxi” diferentes. Sin pretender limitarse a la teoría, se espera una estabilidad aumentada dado que el hidroxilo ya no puede ser desprotonado para formar un ion 2'-alcóxido. El 2'-alcóxido puede catalizar la degradación mediante ataque nucleofílico intramolecular en el átomo de fósforo enlazador. Una vez más, sin pretender limitarse a la teoría, puede ser deseable en algunas realizaciones introducir alteraciones en las que la formación de alcóxido en la posición 2' no es posible.

Ejemplos de modificaciones de grupo “oxi”-2' hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos “bloqueados” (LNA) en el que el hidroxilo 2' está conectado, por ejemplo, mediante un puente de metileno, al carbono 4' de la misma azúcar de ribosa; O-AMINA (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) y aminoalcoxi, $O(CH_2)_nAMINA$, (por ejemplo, AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino). Cabe mencionar que los oligonucleótidos que contienen solo el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado de PEG, exhiben estabilidades frente a las nucleasas comparables con aquellas modificadas con la fuerte modificación de fosforotioato.

Las modificaciones “desoxi” incluyen hidrógeno (es decir, azúcares de desoxirribosa, que son de particular relevancia para las partes excedentes del ARN de parcialmente cd); halo (por ejemplo, flúor); amino (por ejemplo, NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINA$ (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), $-NHC(O)R$ (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquino, que pueden estar opcionalmente sustituidos por ejemplo, con una funcionalidad amino. Los sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-flúor.

El grupo de azúcar puede también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un oligonucleótido puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa, como el azúcar. El monómero puede tener un enlace alfa en la posición 1' en el azúcar, por ejemplo, alfa-nucleósidos. Los oligonucleótidos también pueden incluir azúcares “abásicos”, que carecen de una nucleobase en C-1'. Estos azúcares abásicos también pueden contener modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes. Los oligonucleótidos también pueden contener uno o más azúcares que están en forma L, por ejemplo, L-nucleósidos.

Modificaciones en el extremo

Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido se pueden modificar Tales modificaciones pueden ser en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o el reemplazo de un fosfato terminal completo o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido se pueden conjugar con otras entidades moleculares funcionales tales como restos etiquetadores, por ejemplo, fluoróforos (por ejemplo, pireno, TAMRA, fluoresceína, colorantes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados por ejemplo, en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales se pueden unir al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un enlazador. El átomo terminal del enlazador puede conectarse con o puede reemplazar el átomo de unión del grupo fosfato o el grupo C-3' o C-5' O, N, S o C del azúcar. De manera alternativa, el enlazador puede conectarse con o puede reemplazar el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (por ejemplo, PNA).

Cuando una matriz de enlazador/fosfato-entidad molecular funcional-enlazador/fosfato se interpone entre dos cadenas de un ARNcd, esta matriz puede sustituir a un bucle de ARN de horquilla por un agente de ARN de tipo horquilla.

Las modificaciones terminales útiles para la modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, las cadenas antisentido de ARNcd están fosforiladas en 5' o incluyen un análogo de fosforilo en el extremo 5' primario. Las modificaciones de 5'-fosfato incluyen aquellas

que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); cap 5'-guanosina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'- (HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); cap 5'-adenosina (Aapp), y cualquier estructura de cap de nucleótido modificada o no modificada (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'- fosforotiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato difosfato y trifosfatos reemplazados por oxígeno/azufre, (por ejemplo, 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)PO-5'), 5'-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc. por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquiléterfosfonatos (R=alquiléter=metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., por ejemplo, R-P(OH)(O)-O-5'-).

Las modificaciones de extremo terminal también pueden ser útiles para monitorear la distribución, y en tales casos los grupos preferidos que se va a agregar incluyen fluoróforos, por ejemplo, fluoresceína o un colorante Alexa, por ejemplo, Alexa 488. Las modificaciones de extremo terminal también pueden ser útiles para mejorar la absorción, modificaciones útiles para esto incluyen el colesterol. Las modificaciones de extremo terminal también pueden ser útiles para el entrecruzamiento de un agente de ARN a otro resto; modificaciones útiles para esto incluyen mitomicina C.

Nucleobases

La adenina, guanina, citosina y uracilo son las bases más comunes que se encuentran en el ARN. Estas bases se pueden modificar o reemplazar para proporcionar ARN que tiene propiedades mejoradas. Por ejemplo, los oligorribonucleótidos resistentes a nucleasas se pueden preparar con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (por ejemplo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidina) y cualquiera de las modificaciones anteriores. De manera alternativa, se pueden emplear análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores, por ejemplo, "bases inusuales", "bases modificadas", "bases no naturales" y "bases universales" descritas en la presente memoria. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2- aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquil citosina, 7-desazadenina, N6, N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-aminoalil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracilo-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetil citosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metil-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas o bases O-alquiladas. Otras purinas y pirimidinas incluyen las descritas en la patente estadounidense n.º 3.687.808, aquellas descritas en el Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y aquellas descritas en Englisch et al., *Angewandte Chemie*, Edición internacional, 1991, 30, 613.

Grupos catiónicos

Las modificaciones a los oligonucleótidos también pueden incluir la unión de uno o más grupos catiónicos al azúcar, la base y/o el átomo de fósforo de un fosfato o resto de la cadena principal de fosfato modificada. Un grupo catiónico se puede unir a cualquier átomo capaz de ser sustituido en una base natural, inusual o universal. Una posición preferida es una que no interfiere con la hibridación, es decir, que no interfiere con las interacciones de unión al hidrógeno necesarias para el emparejamiento de bases. Un grupo catiónico se puede unir, por ejemplo, a través de la posición C2' de un azúcar o una posición análoga en un sustituto de azúcar cíclico o acíclico. Los grupos catiónicos pueden incluir, por ejemplo, grupos amino protonados, derivados, por ejemplo, de O-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino); aminoalcoxi, por ejemplo, O(CH₂)_nAMINA, (por ejemplo, AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroaril amino, etilendiamina, poliamino); amino (por ejemplo, NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroaril amino).

Colocación dentro de un oligonucleótido

Algunas modificaciones se pueden incluir preferentemente en un oligonucleótido en una ubicación particular, por ejemplo, en una posición interna de una cadena, o en el extremo 5' o 3' de un oligonucleótido. Una ubicación preferida de una modificación en un oligonucleótido, puede conferir propiedades preferidas en el agente. Por ejemplo, las ubicaciones preferidas de modificaciones particulares pueden conferir propiedades de silenciamiento génico óptimas, o resistencia aumentada a la actividad de endonucleasas o exonucleasas.

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

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

Referencias generales

15 Los oligorribonucleótidos y oligorribonucleósidos utilizados de acuerdo con esta descripción se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida, ver por ejemplo "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (especialmente el capítulo 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, capítulo 2, Oligoribonucleotide synthesis, capítulo 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotide- s: synthesis and applications, capítulo 4, Phosphorothioate oligonucleotides, capítulo 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, capítulo 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, y capítulo 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Otros procedimientos sintéticos particularmente útiles, reactivos, grupos bloqueadores y condiciones de reacción son descritos por Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311 y Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194, o referencias a las que se se refiere en estos. La modificación descrita en WO 00/44895, WO01/75164, o WO02/44321 se puede utilizar en la presente memoria.

25 Referencias de grupo fosfato

La preparación de oligorribonucleótidos de fosfinato se describe en la patente estadounidense n.º 5.508.270. La preparación de oligorribonucleótidos de fosfonato de alquilo se describe en la patente estadounidense No. 4.469.863. La preparación de oligorribonucleótidos de fosforamidito se describe en la patente estadounidense n.º 5.256.775 o la patente estadounidense n.º 5.366.878. La preparación de oligorribonucleótidos de fosfotriéster se describe en la patente estadounidense n.º 5.023.243. La preparación de oligorribonucleótido de fosfonato de borano se describe en la patente estadounidense n.º 5.130.302 y 5.177.198. La preparación de oligorribonucleótidos de fosforamidato de 3'-Deoxi-3'-amino se describe en la patente estadounidense n.º 5.476.925. Oligorribonucleótidos de 3'-Deoxi-3'-metileno fosfonato se describe en *An. H, et al. J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801. Preparación de nucleótidos puenteados de azufre se describe en Sproat et al. *Nucleosides Nucleotides* 1988, 7,651 y Crosstick et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693.

Referencias de grupo azúcar

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

Referencias del reemplazo del grupo fosfato

Los oligorribonucleósidos unidos por metileno metilimino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos por MMI, oligorribonucleósidos unidos por metilendimetilhidrazo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos por MDH, y los oligonucleósidos unidos por metilencarbonilamino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos por amida-3, y los oligonucleósidos unidos por metilenoaminocarbonilo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos por amida-4 así como compuestos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, uniones alternantes de MMI y PO o PS, se pueden preparar tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677 y en las solicitudes PCT publicadas PCT/US92/04294y PCT/US92/04305 (publicadas como WO 92/20822 WO y 92/20823, respectivamente). Los oligorribonucleósidos unidos por formacetal y tioformacetal se pueden preparar tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5.264.562 y 5.264.564. Los oligorribonucleósidos unidos por óxido de etileno se pueden preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.223.618. Se describen reemplazos de siloxano en Cormier, J.F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583. Se describen reemplazos de carbonato en Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* 1971, 1933. Se describen reemplazos de carboximetilo en Edge, M.D. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1972, 1991. Se describen reemplazos de carbamato en Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129.

Referencias del reemplazo de la cadena principal de fosfato-ribosa

Los compuestos sustitutos de azúcar ciclobutilo pueden ser preparados tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.359.044. El sustituto de azúcar pirrolidina se puede preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.519.134. Los sustitutos de azúcar morfolino se pueden preparar tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5.142.047 y 5.235.033, y otras descripciones de patentes relacionadas. Los ácidos peptidonucleicos (PNA) son conocidos per se y se pueden preparar de acuerdo con cualquiera de los varios procedimientos a los que se se refiere en Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. También se pueden preparar de acuerdo con la patente estadounidense n.º 5.539.083.

10 Referencias de modificaciones en los extremos

Las modificaciones en los extremos se describen en Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103-128 (2002) y referencias en estas.

Referencias de nucleobases

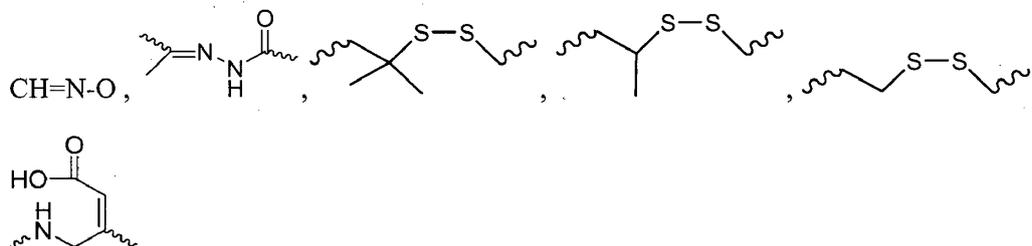
15 Las amiditas de nucleósido de purina sustituidas en N-2 se pueden preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.459.255. Las amiditas de nucleósido de 3-deaza purina se pueden preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.457.191. Las amiditas de nucleósido de pirimidina 5,6-sustituidas se pueden preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.614.617. Las amiditas de nucleósido de pirimidina 5-propinilo se pueden preparar tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.484.908.

Enlazadores

20 El término "enlazador" significa un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto. Los enlazadores comprenden típicamente un enlace directo o un átomo tal como de oxígeno o azufre, una unidad tal como NR¹, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH o una cadena de átomos, tal como alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquino sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalqueno, arilalquino, heteroarilalquilo, heteroarilalqueno, heteroarilalquino, heterociclilalquilo, heterociclilalqueno, heterociclilalquino, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilarilalquilo, alquilarilalqueno, alquilarilalquino, alquenilarilalquilo, alquenilarilalqueno, alquenilarilalquino, alquinilarilalquilo, alquinilarilalqueno, alquinilarilalquino, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalqueno, alquilheteroarilalquino, alquenheteroarilalquilo, alquenheteroarilalqueno, alquinheteroarilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalqueno, alquinheterociclilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalqueno, alquinheterociclilalquino, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquenheteroarilo, alquinheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden interrumpirse o terminarse mediante O, S, S(O), SO₂, N(R¹)₂, C(O), grupo de unión escindible, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido, donde R¹ es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido.

35 En una realización, el enlazador es $-(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_q-T-$, donde:

P, R, T, P', R' y T están cada una independientemente para cada aparición ausentes, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-,



40 o heterociclilo;

Q y Q' están cada una independientemente para cada aparición ausentes, $-(CH_2)_n-$, $-C(R^1)(R^2)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(R^1)(R^2)-$, $-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-$, o $-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NH-$;

X está ausente o es un grupo de unión escindible;

R^a es H o una cadena lateral de aminoácidos:

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

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

q, q' y q'' son cada uno independientemente para cada aparición 0-20 y donde la unidad de repetición puede ser la misma o diferente;

n es independientemente para cada aparición 1-20; y

5 m es independientemente para cada aparición 0-50,

En una realización, el enlazador comprende al menos un grupo de unión escindible.

En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador ramificado. El punto de ramificación del enlazador ramificado puede ser al menos trivalente, pero puede ser un átomo tetravalente, pentavalente o hexavalente o un grupo que presenta tales valencias múltiples. En determinadas realizaciones, el punto de ramificación es N, -N(Q)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C, -N(Q)C(O)-C, o -N(Q)C(O)O-C, donde Q es independientemente para cada aparición H o alquilo opcionalmente sustituido. En otra realización, el punto de ramificación es glicerol o un derivado de glicerol.

Grupos de unión escindibles

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

20 Los grupos de unión escindibles son susceptibles a los agentes de escisión, por ejemplo, el pH, potencial redox o la presencia de moléculas de degradación. Generalmente, los agentes de escisión son más frecuentes o se encuentran a niveles o actividades mayores dentro de las células que en el suero o la sangre. Ejemplos de tales agentes de degradación incluyen: agentes redox que son seleccionados para sustratos particulares o que no tengan ninguna especificidad de sustrato, que incluye, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo de unión escindible redox mediante reducción; esterasas; endosomas o agentes que puedan crear un entorno ácido, por ejemplo, aquellos que son resultado de un pH de cinco o menor; enzimas que puedan hidrolizar o degradar un grupo de unión escindible ácido al actuar como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas al sustrato), y fosfatasas.

30 Un grupo de unión escindible, tal como un enlace disulfuro, puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es 7.4, mientras que el pH intracelular promedio es apenas menor, que varía de aproximadamente 7.1-7.3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el intervalo de 5.5-6.0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido de aproximadamente 5.0. Algunos enlazadores tendrán un grupo enlazador escindible que se escinde a un pH preferido, de este modo se libera el lípido catiónico del ligando dentro de la célula, o al compartimento deseado de la célula.

35 Un enlazador puede incluir un grupo enlazador escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo enlazador escindible incorporado en un enlazador puede depender de la célula seleccionada como objetivo. Por ejemplo, los ligandos que seleccionan como objetivo al hígado pueden unirse a los lípidos catiónicos a través de un enlazador que incluye un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas, y, por lo tanto, el enlazador se escindirán más eficazmente en células hepáticas que en tipos de células que no son ricas en esterasas. Otros tipos de células ricas en esterasas incluyen las células del pulmón, de la corteza renal y del testículo.

Se pueden utilizar enlazadores que contienen enlaces peptídicos cuando se dirigen a tipos de células ricas en peptidasas, tales como células hepáticas y sinoviocitos.

45 En general, la aptitud de un grupo enlazador escindible candidato puede ser evaluada al someter a prueba la capacidad de un agente (o condición) de degradación de escindir el grupo enlazador candidato. También será deseable someter a prueba al grupo enlazador escindible candidato para evaluar la capacidad de resistir la escisión en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido no objetivo. Por lo tanto, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera condición y una segunda, donde se selecciona la primera para que sea indicativa de escisión en una célula objetivo y se selecciona la segunda para que sea indicativa de escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, por ejemplo, sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en sistemas libres de células, en células, en cultivo celular, en cultivo de un órgano o tejido, o en animales completos. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o libres de células, y confirmarlas mediante evaluaciones ulteriores en animales completos. En realizaciones preferidas, los compuestos candidatos útiles se escinden al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones extracelulares).

Grupos de unión escindibles redox

Una clase de grupos de unión escindibles son los grupos de unión escindibles redox que se escinden tras la reducción o la oxidación. Un ejemplo de grupo de unión escindible de forma reductiva es un grupo de unión disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo de unión escindible candidato es un "grupo de unión escindible de forma reductiva" adecuado, o por ejemplo es adecuado para usar con un resto ARNi particular y un agente dirigido particular, se puede recurrir a métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede evaluar a un candidato mediante incubación con ditioneitril (DTT), u otro agente reductor mediante el uso de reactivos conocidos en la técnica, que imitan la tasa de escisión que se observaría en una célula, por ejemplo, una célula objetivo. También se puede evaluar a los candidatos en condiciones que se seleccionan para imitar las condiciones de la sangre o el suero. En una realización preferida, los compuestos candidatos son escindidos como máximo un 10 % en la sangre. En realizaciones preferidas, los compuestos candidatos útiles se degradan al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones extracelulares). Se puede determinar la tasa de escisión de los compuestos candidatos mediante el uso de ensayos cinéticos enzimáticos estándar en condiciones elegidas para imitar medios intracelulares y en comparación con condiciones elegidas para imitar medios extracelulares.

Grupos de unión escindibles a base de fosfato

Los grupos de unión escindibles a base de fosfato son escindidos por agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde grupos fosfato en células son enzimas tales como las fosfatasas en las células. Ejemplos de grupos de unión a base de fosfatos son -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Las realizaciones preferidas son -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -O-P(S)(H)-S-. Una realización preferida es -O-P(O)(OH)-O-. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a aquellos descritos anteriormente.

Grupos de unión escindibles ácidos

Los grupos de unión escindibles ácidos son grupos de unión que se escinden en condiciones ácidas. En realizaciones preferidas, los grupos de unión escindibles ácidos se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6.5 o menor (por ejemplo, aproximadamente 6.0, 5.5, 5.0 o menor), o por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, orgánulos específicos de pH bajo, tal como los endosomas y los lisosomas pueden proporcionar un entorno de escisión para grupos de unión escindibles ácidos. Ejemplos de grupos de unión escindibles ácidos incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, ésteres, y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles ácidos pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O)O, o -OC(O). Una realización preferida es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario, tal como dimetilo, pentilo o t-butilo. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a aquellos descritos anteriormente.

Grupos de unión a base de éster

Los grupos de unión escindibles a base de éster son escindidos por enzimas como las esterasas y amidasas en las células. Ejemplos de grupos de unión escindibles a base de ésteres incluyen, pero no se limitan a, ésteres de grupos alquilenos, alquenileno y alquinileno. Los grupos de unión escindibles de éster tienen la fórmula general -C(O)O-, o -OC(O)-. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a aquellos descritos anteriormente.

Grupos de escisión a base de péptidos

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

Ligandos

Una amplia variedad de entidades se puede acoplar a los oligonucleótidos y lípidos descritos en la presente memoria. Restos preferidos son los ligandos, que están acoplados, preferentemente de manera covalente, ya sea directa o indirectamente, a través de una ligadura intermedia.

En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, direccionamiento o vida de la molécula en la que se incorpora. En realizaciones preferidas, un ligando proporciona una afinidad aumentada ante un objetivo seleccionado, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, por ejemplo, un compartimento celular o de órgano, tejido, órgano o zona del cuerpo, en comparación, por ejemplo, con una especie que no tiene tal ligando. Los ligandos que proporcionan afinidad aumentada ante un objetivo seleccionado también son denominados ligandos de direccionamiento. Los ligandos preferidos para conjugación con los lípidos descritos en la presente memoria son los ligandos de direccionamiento.

Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del endosoma y/o transporte de la composición descrita en la presente, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra la actividad de la membrana dependiente de pH y fusogenicidad. En determinadas realizaciones, el ligando endosomolítico asume su conformación activa al pH endosomal. La conformación "activa" es aquella conformación en la que el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o transporte de la composición descrita en la presente, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. Ligandos endosomolíticos de ejemplo incluyen el péptido GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586), y sus derivados (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). En determinadas realizaciones, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que experimentará un cambio en la carga o la protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado. En la Tabla 6 se muestran las secuencias primarias de ejemplo de ligandos endosomolíticos a base de péptidos.

Tabla 6: Lista de péptidos con actividad endosomolítica.

Nombre	Secuencia (N a C)	Ref.
GALA	AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALAEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALA AGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAAAG GSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K	4
	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	

n, *norleucina*

Referencias

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

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

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, por ejemplo, para aumentar la absorción; compuestos diagnósticos o grupos indicadores, por ejemplo, para monitorear la distribución; agentes reticulantes; y restos que confieren resistencia a la nucleasa. Ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas e imitadores de péptidos.

10 Los ligandos pueden incluir una sustancia de origen natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosán, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un ácido poliamino sintético, un oligonucleótido (por ejemplo, un aptámero). Ejemplos de ácidos poliamino
 15 incluyen cuando el ácido poliamino es polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero anhídrido de ácido estireno-maleico, copolímero de poli (L-lactida-co-glicólido), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina,
 20 poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, por ejemplo, un agente de direccionamiento a una célula o tejido, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un tipo de célula especificado, tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotrópina,
 25 melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioactiva A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un imitador de péptido RGD o un aptámero. La Tabla 7 muestra algunos ejemplos de ligandos de direccionamiento y sus receptores asociados.
 30

Tabla 7: Ligandos de direccionamiento y sus receptores asociados

Células hepáticas	Ligando	Receptor
Célula parenquimal (PC) hepatocitos	Galactosa	ASGP-R (receptor asialoglicoproteína)
	Lactosa de Gal NAc (n-acetil-galactosamina)	Receptor ASPG-R Gal NAc
	Asialofetuina	ASPG-r
Célula endotelial sinusoidal (SEC)	Hialuronano	Receptor de hialuronano
	Procolágeno	Receptor de procolágeno
	Moléculas cargadas negativamente	Receptores depuradores
	Manosa	Receptores de manosa
	Glucosamina de N-acetilo	Receptores depuradores
	Inmunoglobulinas	Receptor Fc
	LPS	Receptor CD14
Insulina	Transcitosis mediada por receptor	

Células hepáticas	Ligando	Receptor
	Transferrina	Transcitosis mediada por receptor
	Albúminas	No específico
	Manosa-6-fosfato	Receptor de manosa-6-fosfato
Célula de Kupffer (KC, por sus siglas en inglés)	Manosa	Receptores de manosa
	Fucosa	Receptores de fucosa
	Albúminas	No específico
	Conjugados de manosa-albúmina	

5 Otros ejemplos de ligandos incluyen tintas, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenacina, dihidrofenacina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), moléculas lipófilas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido acético adamantano, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleil)litocólico, ácido O3-(oleil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxacina) y conjugados de péptidos (por ejemplo, péptido Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores de radioetiquetado, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores del transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

15 Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glucoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica ante un co-ligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un tipo de célula especificada, tal como una célula cancerosa, una célula endotelial o una célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la p38 MAP cinasa o un activador de NF-κB

20 El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco que puede aumentar la absorción del agente ARNi en la célula, por ejemplo, al alterar el citoesqueleto de la célula, por ejemplo, al alterar los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jalplaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholide A, indanocina o mioservina.

25 El ligando puede aumentar la absorción del agente ARNi en la célula al activar, por ejemplo, una respuesta inflamatoria. Ligandos de ejemplo que tendrían tal efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 beta o interferón gamma.

30 En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula a base de lípido. Tal lípido o tal molécula a base de lípido se une, preferentemente, a una proteína sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a la HSA permite la distribución del conjugado a un tejido objetivo, por ejemplo, un tejido objetivo no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido objetivo puede ser el hígado, que incluye las células parenquimales del hígado. También se pueden usar como ligandos otras moléculas que se pueden unir a la HSA. Por ejemplo, se puede usar neproxina o aspirina. Un lípido o ligando a base de lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o transporte a una célula objetivo o membrana celular, y/o (c) puede ser usado para

35 ajustar la unión a una proteína sérica, por ejemplo, HSA. Un ligando a base de lípido se puede usar para modular, por ejemplo, controlar la unión del conjugado a un tejido objetivo. Por ejemplo, un lípido o ligando a base de lípido que se une a la HSA con más fuerza será menos probable que sea dirigido al riñón y, por lo tanto, menos probable que se eliminado del cuerpo. Un lípido o un ligando a base de lípido que se une a la HSA con menos fuerza se puede usar para dirigir el conjugado al riñón.

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

En otra realización preferida, el ligando a base de lípido se une a HSA de forma débil o no lo hace en absoluto, de modo que el conjugado se distribuirá preferentemente al riñón. También se pueden usar otros restos que se dirijan a células renales en lugar de o en adición del ligando a base de lípido.

5 En otro aspecto, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina, que es absorbido por una célula objetivo por ejemplo, una célula proliferativa. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación celular no deseada, por ejemplo, de tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Vitaminas de ejemplo incluyen las vitaminas A, E y K. Otras vitaminas de ejemplo incluyen la vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas. También se incluyen la HAS, la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL).
10

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferentemente un agente helicoidal de permeación celular. Preferentemente, el agente es anfipático. Un agente de ejemplo es un péptido tal como tat o antennopodia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, que incluye un peptidomimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es, preferentemente, un agente alfa-helicoidal, que preferentemente tiene una fase lipofílica y una lipofóbica.
15

El ligando puede ser un péptido o un peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente memoria oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El resto peptídico o peptidomimético puede tener de aproximadamente 5-50 aminoácidos de largo, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de largo (ver, por ejemplo, la Tabla 8).
20

Tabla 8. Péptidos de permeación celular de ejemplo.

Péptido de permeación celular	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al., J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Fragmento Tat (48-60)	GRKKRRQRRPPQC	Vives et al., J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
Péptido a base de secuencia señal	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKV	Chaloin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Elmqvist et al., Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Transportan	GWTLSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga et al., FASEB J., 12:67, 1998
péptido de modelo anfilílico	KLALKLALKALKALKLA	Oehlke et al., Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell et al., J. Pept. Res., 56:318, 2000
Permeación de la pared celular bacteriana	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES	
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGGIAIAIQGGP R	
α-defensina	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	
β-defensina	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYR GKAKCCK	
Bactenecina	RKCRIVVIRVCR	

Péptido de permeación celular	Secuencia de aminoácidos	Referencia
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPP RFPPRFPGKR-NH ₂	
Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, péptido catiónico, péptido anfipático, o péptido hidrofóbico (por ejemplo, que consiste principalmente de Tyr, Trp o Phe). Un resto de péptido puede ser un péptido de dendrímero, un péptido restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto de péptido puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrofóbica (MTS). Un péptido que contiene una MTS hidrofóbica de ejemplo es el RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP. También puede ser un resto de direccionamiento un análogo de RFGF (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP) que contiene una MTS hidrofóbica. El resto peptídico puede ser un péptido de "administración", que puede portar grandes moléculas polares que incluyen péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha descubierto que secuencias de la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRRPPQ) y la proteína Antennapedia de la *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK) son capaces de funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede estar codificado por una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de visualización de fagos, o de una biblioteca combinatoria de un compuesto por soporte [*one-bead-one-compound*] (OBOC) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Preferentemente, el péptido o peptidomimético ligado a un agente ARNi mediante una unidad monomérica incorporada es un péptido de direccionamiento celular tal como un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o un imitador de RGD. Un resto peptídico puede variar en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o dirigir las propiedades conformacionales. Se pueden utilizar cualesquiera de las modificaciones estructurales descritas más adelante.

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

Se pueden usar péptidos que se dirigen a marcadores enriquecidos en células proliferativas. Por ejemplo, los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD se pueden dirigir a células cancerosas, en particular células que presentan una integrina $\alpha_v\beta_3$. Por lo tanto, se podrían usar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, así como imitadores sintéticos de RGD. Además del RGD, se pueden usar otros restos que se dirigen al ligando de integrina $\alpha_v\beta_3$. Generalmente, se pueden usar tales ligandos para controlar las células proliferativas y la angiogénesis. Conjugados preferidos de este tipo son los ligandos que se dirigen a PECAM-1, VEGF u otro gen de cáncer, por ejemplo, un gen de cáncer descrito en la presente memoria.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de permear una célula, por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido de permeación de una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Cecropina P1), un péptido que contiene un enlace disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contiene solo uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que deriva de un dominio peptídico de fusión de gp41 del VIH-1 y la NLS del antígeno T grande del SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

En una realización, un péptido dirigido ligado a un agente ARNi y/o al oligómero portador puede ser un péptido α -helicoidal anfipático. Péptidos α -helicoidales anfipáticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a la bombinina (BLP, por sus siglas en inglés), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales del mixino (HFIAP, por sus siglas en inglés), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos de *Xenopus*, esculentinas-1 y caerinas. Se considerará preferentemente una cantidad de factores para mantener la integridad de la estabilidad helicoidal. Por ejemplo, se utilizará una cantidad máxima de restos de estabilización helicoidal (por ejemplo, leu, ala o lys), y se utilizará una cantidad mínima de restos de desestabilización de la helicoidal (por ejemplo, prolina o unidades monoméricas cíclicas). Se considerará que el resto envolvente (por ejemplo, Gly es un resto de N-

envoltura de ejemplo) y/o se puede usar amidación en el extremo C para proporcionar un enlace H extra para estabilizar la espiral. La formación de puentes de sal entre restos con cargas opuestas, separados por las posiciones $i \pm 3$ o $i \pm 4$ puede proporcionar estabilidad. Por ejemplo, los restos catiónicos tal como lisina, arginina, homoarginina, ornitina o histidina pueden formar puentes de sal con los restos aniónicos glutamato o aspartato.

- 5 Los ligandos peptídicos y peptidomiméticos incluyen los de origen natural o los péptidos modificados, por ejemplo, péptidos D o L; péptidos α , β , o γ ; péptidos de N-metilo; azapéptidos; péptidos que tienen una o más amidas, es deci, péptido, enlaces reemplazados con uno o más enlaces de urea, tiourea, carbamato o sulfonilo urea; o péptidos cíclicos.

- 10 El ligando de direccionamiento puede ser cualquier ligando que sea capaz de dirigirse a un receptor específico. Ejemplos son: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, agrupaciones de azúcares tales como una agrupación de GalNAc, agrupación de manosa, agrupación de galactosa o un aptámero. Una agrupación es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos de acceso también incluyen ligandos receptores de integrina, ligandos receptores de quimiocina, transferrina, biotina, ligandos receptores de serotonina, PSMA, endotelina, GCP11, somatostatina, ligandos de LDL y HDL. Los ligandos también pueden estar basados en ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones descritas en la presente memoria.

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

- 20 Modulador PK significa modulador farmacocinético. El modulador PK incluye lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípido, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas etc. El modulador PK de ejemplo incluye, pero no se limitan a, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina etc. También se sabe que los oligonucleótidos que comprenden varios enlaces de fosforotioato se unen a proteínas de suero, por lo tanto, los oligonucleótidos cortos por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces de fosforotioato en la cadena principal también se describen en la presente memoria como ligandos (por ejemplo, como ligandos de modulación de PK).

- 30 Además, los aptámeros que se unen a componentes séricos (por ejemplo, proteínas séricas) también se describen en la presente memoria como ligandos de modulación de PK.

Se describen otros ligandos en las patentes estadounidenses n.º 2005/0107325, 2005/0164235, y 2008-0255345, y la patente estadounidense n.º 7.021.394, y 7.626.014.

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

- 40 Los ligandos se pueden acoplar a los oligonucleótidos en varios lugares, por ejemplo, el extremo 3', el extremo 5', y/o en una posición interna. En realizaciones preferidas, el ligando se une a los oligonucleótidos a través de una ligadura intermedia. El ligando o ligando ligado puede estar presente en un monómero cuando dicho monómero se incorpora en la cadena en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando se puede incorporar mediante acoplamiento a un monómero "precursor" después de que dicho monómero "precursor" ha sido incorporado en la cadena en crecimiento. Por ejemplo, se puede incorporar un monómero que tiene, por ejemplo, una ligadura con extremo amino (es decir, que no tiene ningún ligando asociado), por ejemplo, TAP-(CH₂)_nNH₂ en una cadena sentido o antisentido en crecimiento. En una operación posterior es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo electrofílico, por ejemplo, un éster de pentafluorofenilo o un grupo aldehído puede unirse subsiguientemente al monómero precursor al acoplar el grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico terminal de la ligadura del monómero precursor.

- 50 Para oligonucleótidos de doble cadena los ligandos pueden estar unidos a una o ambas cadenas. En algunas realizaciones, un agente ARNi de doble cadena contiene un ligando conjugado a la cadena sentido. En otras realizaciones, un agente ARNi de doble cadena contiene un ligando conjugado a la cadena antisentido.

- 55 En algunas realizaciones, el ligando puede estar conjugado a nucleobases, restos de azúcar o enlaces internucleosídicos de moléculas de ácido nucleico. La conjugación a nucleobases de purina o de derivados de esta puede producirse en cualquier posición, que incluye átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 6, 7 u 8 de una nucleobase de purina están unidas a un resto conjugado. La conjugación con nucleobases de pirimidina o de derivados de esta también puede ocurrir en cualquier posición. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 5 y 6 de una nucleobase de pirimidina pueden ser sustituidas con un resto conjugado. La conjugación con restos de azúcar de nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono.

Átomos de carbono de ejemplo de un resto de azúcar que se pueden unir a un resto conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también se puede unir a un resto conjugado, tal como en un resto abásico. Los enlaces internucleosídicos también pueden tener restos conjugados. Para enlaces que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoamidato, y similares), el resto conjugado puede unirse directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S ligado al átomo de fósforo. Para enlaces internucleosídicos que contienen amina o amida (por ejemplo, PNA), el resto conjugado se puede unir al átomo de nitrógeno de la amina o la amida o a un átomo de carbono adyacente.

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

Por ejemplo, un grupo electrofílico puede ser una funcionalidad que contiene carbonilo y un grupo nucleofílico puede ser una amina o tiol. Los métodos para la conjugación de ácidos nucleicos y compuestos oligoméricos relacionados con y sin grupos de unión están bien descritos en la bibliografía, tal como, por ejemplo, en Manoharan in Antisense Research and Applications, Crooke y LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Capítulo 17.

Las patentes estadounidenses representativas que describen la preparación de conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.149.782; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.672.662; 5.688.941; 5.714.166; 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; y 6.559.279.

25 Características de partículas de ácido nucleico-lípido

Se proporcionan métodos y composiciones para producir partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en las que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de una capa de lípidos. Tales partículas de ácido nucleico-lípido, que incorporan oligonucleótidos de ARNip, se categorizan mediante el uso de una variedad de parámetros biofísicos, que incluyen: (1) proporción de fármaco respecto a lípido; (2) eficacia de encapsulación; y (3) tamaño de partícula. Son deseables las proporciones elevadas de fármaco respecto a lípido, una alta eficacia en encapsulación, buena resistencia a la nucleasa y estabilidad sérica y un tamaño de partículas controlable, generalmente menor de 200 nm de diámetro. Además, la naturaleza del polímero de ácido nucleico es significativa, dado que la modificación de los ácidos nucleicos en un esfuerzo por impartir resistencia a la nucleasa aumenta el costo de los productos terapéuticos mientras que en muchos casos solo proporciona una resistencia limitada. A menos que se indique lo contrario, estos criterios se calculan en la presente memoria de la siguiente manera:

La proporción de fármaco respecto a lípido es la cantidad de ácido nucleico en un volumen definido de preparación dividida entre la cantidad de lípido en el mismo volumen. Esto puede ser mol por mol, peso por peso o peso por mol. Para formulaciones finales listas para su administración, la proporción de ácido nucleico:lípido se calcula después de que la diálisis, la cromatografía y la digestión de enzimas (por ejemplo, nucleasa) hayan sido empleadas para eliminar cuanto más ácido nucleico externo sea posible.

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

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

Composiciones farmacéuticas

Las partículas de lípidos de la presente invención, particularmente cuando están asociadas con un agente terapéutico, se pueden volver a formular como una composición farmacéutica, por ejemplo, que comprende además un diluyente, excipiente, o portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o amortiguador de fosfato, que se selecciona de acuerdo con la vía de administración y prácticas farmacéuticas estándar.

En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de lípidos-ácidos nucleicos de la invención se preparan de acuerdo con técnicas estándar y comprenden además un portador

farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se utilizará solución salina normal como portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua amortiguada, solución salina al 0,9 %, glicina al 0,3 % y similares, que incluyen glicoproteínas para estabilidad aumentada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En composiciones que comprenden solución salina u otros portadores que contienen sal, el portador se añade preferentemente tras la formación de la partícula lipídica. Por lo tanto, luego de que se forman las composiciones de lípido-ácido nucleico, las composiciones se pueden diluir en portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina normal.

Las preparaciones farmacéuticas resultantes pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y conocidas. Las soluciones acuosas pueden luego envasarse para uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, con la preparación liofilizada combinada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables que sean necesarias para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como el ajuste de pH y agentes amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. De manera adicional, la suspensión lipídica puede incluir agentes protectores lipídicos que protegen los lípidos de daños peroxidativos de los lípidos y radicales libres durante el almacenamiento. Son adecuados los inactivadores de radicales libres lipofílicos, tales como α -tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

La concentración de partículas de lípidos o partículas de lípido-ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,01 %, generalmente a o al menos aproximadamente 0,05-5 % hasta del 10 al 30 % en peso y se seleccionará principalmente por los volúmenes, las viscosidades, etc., del fluido, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, se puede aumentar la concentración para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que padecen hipertensión grave o insuficiencia cardíaca congestiva asociada con aterosclerosis. De manera alternativa, los complejos compuestos por lípidos irritantes se pueden diluir hasta concentraciones bajas, para reducir la inflamación en el lugar de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico tendrá unida una etiqueta y será usada para el diagnóstico (al indicar la presencia del ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrada dependerá de la etiqueta particular usada, del estado de la enfermedad que se diagnostica y del criterio del médico pero generalmente se encontrará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.

Como se mencionó anteriormente, las partículas de lípido-agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) descritas en la presente memoria pueden incluir fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG), lípidos modificados con PEG-ceramida o con gangliósido G_{M1} u otros lípidos eficaces para evitar o limitar la agregación. La adición de tales componentes no impide meramente la agregación de complejos. En vez, también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos objetivo.

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

Métodos de elaboración

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria hacen uso de ciertos lípidos catiónicos, cuya síntesis, preparación y caracterización se describen más adelante y en los Ejemplos adjuntos. Además, se describen en la presente memoria métodos para preparar partículas lipídicas, que incluyen aquellas asociadas con un agente terapéutico, por ejemplo, un ácido nucleico. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa amortiguada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas de lípidos en donde los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una proporción de ácido nucleico/lípido de aproximadamente 3 % en peso a aproximadamente 25 % en peso, preferentemente 5 a 15 % en peso. La mezcla intermedia puede ser dimensionada opcionalmente para obtener partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en donde las partes de lípidos son vesículas unilamelares, que tienen preferentemente un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente aproximadamente 40 a 90 nm. El pH es luego elevado para neutralizar al menos una parte de las cargas superficiales en las partículas de lípidos-ácidos nucleicos, lo cual proporciona por lo tanto una composición lípido-ácido nucleico encapsulado al menos parcialmente neutralizada en la superficie.

Tal como se describe anteriormente, varios de estos lípidos catiónicos son aminolípidos que están cargados a un pH por debajo del pK_a del grupo amino y sustancialmente neutros a un pH por encima del pK_a . Estos lípidos catiónicos son denominados lípidos catiónicos valorables y se pueden usar en las formulaciones descritas en la presente memoria usando un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, se pueden formar vesículas lipídicas al pH

inferior con lípidos catiónicos valorables y otros componentes vesiculares en presencia de ácidos nucleicos. De esta manera, las vesículas encapsularán y atraparán los ácidos nucleicos. En segundo lugar, la carga superficial de las vesículas recién formadas se puede neutralizar mediante el aumento del pH del medio hasta un nivel por encima del pK_a de los lípidos catiónicos valorables presentes, es decir, hasta el pH fisiológico o superior. Aspectos particularmente ventajosos de este proceso incluyen tanto la eliminación simple de cualquier ácido nucleico adsorbido en superficie como un vehículo de distribución del ácido nucleico resultante que tiene una superficie neutra. Se espera que los liposomas o partículas lipídicas que tienen una superficie neutra eviten la eliminación rápida de la circulación y eviten determinadas toxicidades asociadas con las preparaciones de liposomas catiónicos. Se proporcionan detalles adicionales respecto a estos usos de tales lípidos catiónicos valorables en la formulación de partículas de ácido nucleico-lípido en la patente estadounidense n° 6.287.591 y la patente estadounidense n° 6.858.225.

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

Sin pretender estar limitado por ninguna teoría particular, se cree que la muy alta eficacia de la encapsulación del ácido nucleico es un resultado de la interacción electrostática a pH bajo. A pH ácido (por ejemplo pH 4.0), la superficie de la vesícula se carga y se une a una parte de los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas. Cuando el amortiguador ácido externo es intercambiado por un amortiguador más neutro (por ejemplo, pH 7.5), la superficie de la partícula lipídica o liposoma es neutralizada, lo cual permite que cualquier ácido nucleico externo sea eliminado. Información más detallada sobre el proceso de la formulación se proporciona en varias publicaciones (por ejemplo, la patente estadounidense n° 6.287.591 y la patente estadounidense n° 6.858.225).

Conforme a lo anterior, se describen en la presente memoria métodos para preparar formulaciones de lípido/ácido nucleico. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa amortiguada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas de lípidos, por ejemplo, en donde los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una proporción de ácido nucleico/lípido de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 20 % en peso. La mezcla intermedia puede ser dimensionada opcionalmente para obtener partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en donde las partes de lípidos son vesículas unilamelares, que tienen preferentemente un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente aproximadamente 40 a 90 nm. El pH es luego elevado para neutralizar al menos una parte de las cargas superficiales en las partículas de lípidos- ácidos nucleicos, lo cual proporciona por lo tanto una composición lípido-ácido nucleico encapsulado al menos parcialmente neutralizada en la superficie.

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

En la preparación de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria, la mezcla de lípidos es típicamente una solución de lípidos en un solvente orgánico. Esta mezcla de lípidos puede ser entonces secada para formar una película delgada o ser liofilizada para formar un polvo antes de ser hidratada con un amortiguador acuoso para formar liposomas. Alternativamente, en un método preferido, la mezcla de lípido se puede solubilizar en un alcohol miscible en agua, tal como etanol, y esta solución etanólica se agrega a un amortiguador acuoso que tiene como resultado la formación espontánea de liposomas. En la mayoría de las realizaciones, el alcohol se usa en la forma en que está disponible comercialmente. Por ejemplo, el etanol se puede usar como etanol absoluto (100 %), o como etanol al 95 %, siendo agua lo restante. Este método se describe con mayor detalle en la patente estadounidense n° 5.976.567).

En una realización de ejemplo, la mezcla de lípidos es una mezcla de lípidos catiónicos, lípidos neutros (diferentes de un lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado por PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o PEG-DMA) en un solvente de alcohol. En realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos consiste esencialmente en un lípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado por PEG en alcohol, más preferentemente etanol. En realizaciones preferidas adicionales, la primera solución consiste en la mezcla de lípidos anterior en proporciones molares de aproximadamente 20-70 % lípido catiónico:5-45 % lípido neutro:20-55 % colesterol:0,5-15 % lípido modificado con PEG. En otras realizaciones adicionales preferidas, la primera solución consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegidos de las Tablas 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol y PEG-DMG o PEG-DMA, más preferentemente en una proporción molar de aproximadamente 20-60 % lípido catiónico:5-25 % DSPC:25-55 % Chol:0,5-15 % PEG-DMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones preferidas, el lípido neutro en estas

composiciones es reemplazado con POPC, DPPC, DOPE o SM.

De acuerdo con la invención, la mezcla de lípido se combina con una solución acuosa amortiguada que puede contener los ácidos nucleicos. La solución acuosa amortiguada es típicamente una solución en la que el amortiguador tiene un pH inferior al pK_a del lípido protonable en la mezcla de lípidos. Ejemplos de amortiguadores adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un amortiguador particularmente preferido en el amortiguador de citrato. Los amortiguadores preferidos se encontrarán en el intervalo de 1-1000 mM del anión, que depende de la química del ácido nucleico que se encapsula, y la optimización de la concentración del amortiguador puede ser significativa para lograr niveles de carga elevados, (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n° 6.287.591 y la patente estadounidense n° 6.858.225. De manera alternativa, puede ser útil el agua pura acidificada hasta un pH de 5-6 con cloruro, sulfato o similares. En este caso, puede ser adecuado agregar glucosa al 5 %, u otro soluto no iónico que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de partículas cuando las partículas son dializadas para eliminar el etanol, aumentar el pH, o mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable tal como solución salina normal. La cantidad de ácido nucleico en el amortiguador puede variar, pero típicamente será de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL.

La mezcla de lípidos y la solución acuosa amortiguada de ácidos nucleicos terapéuticos se combina para proporcionar una mezcla intermedia. La mezcla intermedia es típicamente una mezcla de partículas de lípidos que tienen ácidos nucleicos encapsulados. De manera adicional, la mezcla intermedia también puede contener cierta parte de ácidos nucleicos que están unidos a la superficie de las partículas de lípidos (liposomas o vesículas lipídicas) debido a la atracción iónica de los ácidos nucleicos cargados negativamente y los lípidos cargados positivamente en la superficie de la partícula lipídica (los aminolípidos u otros lípidos que forman el primer componente lipídico protonable están cargados positivamente en un amortiguador que tiene un pH inferior al pK_a del grupo protonable en el lípido). En un grupo de realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos es una solución de alcohol de lípidos y los volúmenes de cada una de las soluciones se ajusta para que luego de la combinación, el contenido de alcohol resultante sea de aproximadamente 20 % en volumen a aproximadamente 45 % en volumen. El método para combinar las mezclas puede incluir cualquiera de una variedad de procesos, que generalmente dependen de la escala de la formulación producida. Por ejemplo, cuando el volumen total es de aproximadamente 10-20 mL o menos, las soluciones se pueden combinar en un tubo de ensayo y ser agitadas juntas mediante el uso de un mezclador de vórtex. Los procesos a gran escala se pueden llevar a cabo en instrumental de vidrio a escala de producción adecuada.

Opcionalmente, los complejos de lípido-agente terapéutico encapsulado (por ejemplo, ácido nucleico) que se producen al combinar la mezcla lipídica y la solución acuosa amortiguada de agentes terapéuticos (ácidos nucleicos) se pueden dimensionar para lograr una rango de tamaños deseados y una distribución relativamente estrecha de tamaños de partículas de lípidos. Preferentemente, las composiciones proporcionadas en la presente memoria estarán dimensionadas hasta un diámetro medio de aproximadamente 70 a aproximadamente 200 nm, más preferentemente aproximadamente 90 a aproximadamente 130 nm. Existen varias técnicas para adaptar el tamaño de los liposomas a un tamaño deseado. Un método para adaptar el tamaño se describe en la patente estadounidense n° 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas ya sea mediante sonicación de sonda o baño produce una reducción de tamaño progresiva hasta lograr vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) con un tamaño menor que aproximadamente 0,05 micrones. La homogeneización es otro método que utiliza energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en liposomas más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilamelares se hacen circular nuevamente a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 micrones. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula se puede controlar mediante determinación de tamaño de partículas con haz de láser convencional. Para determinados métodos en la presente memoria, se usa la extrusión para obtener un tamaño de vesículas uniforme.

La extrusión de composiciones de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o de una membrana de cerámica asimétrica tiene como resultado una distribución por tamaños relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se hace pasar por la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de complejo de liposomas deseado. Los liposomas se pueden extrudir a través de membranas con poros sucesivamente más pequeños, para lograr una reducción gradual del tamaño de los liposomas. En algunos casos, las composiciones de lípido-ácido nucleico que se forman pueden ser usadas sin ningún dimensionamiento.

En realizaciones particulares, los métodos descritos en la presente memoria comprenden además una etapa de neutralización de al menos algunas de las cargas superficiales en las partes lipídicas de las composiciones de lípido-ácido nucleico. Al neutralizar al menos parcialmente las cargas superficiales, el ácido nucleico no encapsulado se libera de la superficie de la partícula de lípido y se puede eliminar de la composición mediante el uso de técnicas convencionales. Preferentemente, los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en la superficie son eliminados de las composiciones resultantes mediante intercambio de soluciones amortiguadoras. Por ejemplo, el reemplazo de un amortiguador de citrato (pH de aproximadamente 4.0, usado para formar las composiciones) con una solución salina amortiguada con HEPES (pH de HBS de aproximadamente 7.5) tiene como resultado la neutralización de la superficie de liposomas y la liberación del ácido nucleico de la superficie. A continuación, el

ácido nucleico liberado puede ser eliminado mediante cromatografía usando métodos estándar, y luego ser cambiado a un amortiguador con un pH por encima del pK_a del lípido usado.

Opcionalmente, las vesículas lipídicas (es decir, las partículas lipídicas) se pueden formar mediante hidratación en un amortiguador acuoso y ser dimensionadas mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos anteriormente antes de la adición del ácido nucleico. Tal como se describe anteriormente, el amortiguador acuoso debería ser de un pH inferior al pK_a del aminolípido. Se puede agregar una solución de los ácidos nucleicos a estas vesículas preformadas dimensionadas. Para permitir la encapsulación de los ácidos nucleicos en tales vesículas "preformadas", la mezcla debería contener un alcohol, tal como etanol. En el caso del etanol, debería estar presente a una concentración de aproximadamente 20 % (p/p) a aproximadamente 45 % (p/p). Además, puede que sea necesario calentar la mezcla de vesículas preformadas y ácido nucleico en la mezcla de amortiguador acuoso-etanol hasta una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50°C, dependiendo de la composición de las vesículas lipídicas y de la naturaleza del ácido nucleico. Será evidente para un experto en la técnica que para que la optimización del proceso de encapsulación logre un nivel deseado de ácido nucleico en las vesículas lipídicas se requerirá de manipulación de variables tales como la concentración del etanol y la temperatura. Se proporcionan ejemplos de condiciones adecuadas para la encapsulación de ácidos nucleicos en los Ejemplos. Una vez que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de las vesículas preformadas, puede aumentarse el pH externo hasta neutralizar al menos parcialmente la carga superficial. Los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en la superficie pueden ser eliminados tal como se ha descrito anteriormente.

Método de uso

Las partículas de lípidos de la presente invención se pueden usar para administrar un agente terapéutico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones particulares, el agente terapéutico es un ácido nucleico, que se administra a una célula usando una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención. Mientras que la siguiente descripción de varios métodos de uso de las partículas lipídicas y composiciones farmacéuticas relacionadas de la presente invención está ejemplificada por la descripción relacionada con las partículas de ácido nucleico-lípido, se entiende que estos métodos y composiciones pueden ser adaptadas fácilmente para la administración de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier trastorno o enfermedad que se beneficiaría de tal tratamiento.

En determinadas realizaciones, se describen en la presente memoria métodos para introducir un ácido nucleico en una célula. Los ácidos nucleicos preferidos para su introducción en células son el ARNip, oligonucleótidos estimulantes del sistema inmunitario, plásmidos, antisentido y ribozimas. Estos métodos se pueden llevar a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones descritas en la presente memoria con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la administración intracelular.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden absorber en casi cualquier tipo de célula. Una vez adsorbidas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden ingerirse mediante endocitosis a través de una parte de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la parte de ácido nucleico del complejo puede suceder a través de cualquiera de estas vías. Sin pretender estar limitado con respecto al alcance de la descripción, se cree que en el caso de las partículas adsorbidas en la célula mediante endocitosis, las partículas luego interactúan con la membrana endosomal, lo cual tiene como resultado la desestabilización de la membrana endosomal, posiblemente por la formación de capas no bicapas, lo cual tiene como resultado la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma celular. De modo similar, en el caso de la fusión directa de las partículas con la membrana de plasma celular, cuando ocurre la fusión, la membrana liposomal se integra en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de lípido-ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, se realizará en un medio biológicamente compatible. La concentración de las composiciones puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero es generalmente entre aproximadamente 1 μmol y aproximadamente 10 mmol. En determinadas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido-ácido nucleico generalmente se llevará a cabo a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37 °C) por períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 24 horas, preferentemente de aproximadamente 2 a 8 horas. Para las aplicaciones *in vitro*, la administración de ácidos nucleicos puede realizarse a cualquier célula de cultivo, ya sea de origen animal o vegetal, vertebrado o invertebrado y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células serán células animales, más preferentemente células de mamífero, y más preferentemente células humanas.

En un grupo de realizaciones, una suspensión de partículas de lípido-ácido nucleico se agrega a células en placas con 60-80 % de confluencia que tienen una densidad celular de aproximadamente 10³ a aproximadamente 10⁵ células/mL, más preferentemente aproximadamente 2 x 10⁴ células/mL. La concentración de la suspensión agregada a las células es preferentemente de aproximadamente 0,01 a 20 μg/mL, más preferentemente aproximadamente 1 μg/mL.

En otra realización, las partículas de lípidos descritas en la presente se pueden usar para administrar un ácido nucleico o una línea celular (por ejemplo, una línea celular tumoral). Los ejemplos no taxativos de tales líneas celulares incluyen: HELA (n.º de cat ATCC: CCL-2), KB (n.º de cat ATCC: CCL-17), HEP3B (n.º de cat ATCC: HB-8064), SKOV-3 (n.º de cat ATCC: HTB-77), HCT-116 (n.º de cat ATCC: CCL-247), HT-29 (n.º de cat ATCC: HTB-38), PC-3 (n.º de cat ATCC: CRL-1435), A549 (n.º de cat ATCC: CCL-185), MDA-MB-231 (n.º de cat ATCC: HTB-

26).

Las aplicaciones típicas incluyen usar procedimientos conocidos para proporcionar administración intracelular de ARNip para inactivar o silenciar objetivos celulares específicos. De manera alternativa, las aplicaciones incluyen la administración de secuencias de ADN o ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. De esta manera, se proporciona una terapia para enfermedades genéticas mediante el suministro de productos de genes deficientes o ausentes (es decir, para la distrofia de Duchenne, ver Kunkel, et al., Brit. Med. Bull. 45(3):630-643 (1989), y para la fibrosis quística, ver Goodfellow, Nature 341:102-103 (1989)). Otros usos para las composiciones descritas en la presente memoria incluyen la introducción de oligonucleótidos antisentido en células (ver Bennett, et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992)).

De manera alternativa, las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden usar para administrar ácidos nucleicos a células *in vivo*, mediante el uso de métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. Con respecto a la administración de las secuencias de ADN o ARNm, Zhu, et al., Science 261:209-211 (1993), describe la administración intravenosa de un plásmido de expresión de citomegalovirus (CMV)- cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) mediante el uso de complejos DOTMA-DOPE. Hyde, et al., Nature 362:250-256 (1993), describe la administración del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) a epitelios de la vía aérea y a los alveolos en el pulmón de ratones, usando liposomas. Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989), que se incorpora a la presente memoria mediante referencia, describe la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procariótico funcional que codifica la enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser usadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar preferentemente de forma parenteral, es decir, intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo. Por ejemplo, ver Stadler, et al., la patente estadounidense n.º 5.286.634 La administración de ácido nucleico intracelular también ha sido mencionada en Straubinger, et al., Methods in Enzymology, Academic Press, Nueva York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:239-271 (1989), y Behr, Acc. Chem. Res. 26:274-278 (1993). Aun otros métodos para administrar terapéuticos a base de lípidos se describen en, por ejemplo, Rahman et al., patente estadounidense n.º 3.993.754; Sears, patente estadounidense n.º 4.145.410; Papahadjopoulos et al., patente estadounidense n.º 4.235.871; Schneider, patente estadounidense n.º 4.224.179; Lenk et al., patente estadounidense n.º 4.522.803; y Fountain et al., patente estadounidense n.º 4.588.578.

En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas se pueden poner en contacto con el tejido objetivo mediante aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación se puede realizar mediante procedimientos tópicos "abiertos" o "cerrados". Por "tópico" se quiere decir que la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, la orofaringe, el canal auditivo externo y similares. Procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y visualizar directamente el tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto se logra generalmente mediante un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía para tener acceso a los pulmones, una laparotomía abdominal para tener acceso a las vísceras abdominales, u otro enfoque quirúrgico directa al tejido objetivo. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos objetivo internos no son directamente visualizados, sino que se accede a estos mediante la inserción de instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden ser administradas al peritoneo mediante lavado con aguja. Asimismo, las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar a las meninges o a la médula espinal por infusión durante una punción lumbar seguida por la colocación apropiada del paciente tal como se practica comúnmente para la anestesia raquídea o la imaginología de la médula espinal con metrazamida. De manera alternativa, las preparaciones se pueden administrar a través de dispositivos endoscópicos.

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

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica en una variedad de hospedadores. Los hospedadores preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas y similares.

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

En una realización, en la presente memoria se describe un método para modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. Estos métodos generalmente comprenden poner en contacto una célula con una partícula lipídica descrita en la presente memoria que está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. Tal como se usa en la presente memoria, el término "modular" se refiere a la

alteración de la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. En realizaciones diferentes, la modulación puede implicar aumentar o potenciar, o puede implicar disminuir o reducir. Métodos para medir el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo se conocen y están disponibles en la técnica, e incluyen, por ejemplo, métodos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y técnicas inmunohistoquímicas. En realizaciones particulares, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo es aumentado o reducido en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más de un 50 % en comparación con un valor de control apropiado.

Por ejemplo, si se desea una expresión aumentada de un polipéptido, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluya un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otro lado, si se desea una expresión reducida de un polinucleótido o polipéptido, entonces el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un ARNip o un microARN que comprenda una secuencia de polinucleótidos que se hibrida específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido objetivo, alternado de ese modo la expresión del polinucleótido o polipéptido objetivo. De manera alternativa, el ácido nucleico puede ser un plásmido que expresa tal ARNip, microARN u oligonucleótido antisentido.

En una realización particular, en la presente memoria se describe un método para modular la expresión de un polipéptido por parte de una célula, que comprende proporcionar a una célula una partícula lipídica que consiste o consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegidos de los lípidos descritos en las Tablas 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol y PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % DSPC:25-55 % Chol:0,5-15 % PEG-DMG o PEG-DMA, donde la partícula de lípido está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión del polipéptido. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es reemplazado con POPC, DPPC, DOPE o SM.

En realizaciones particulares, el agente terapéutico se selecciona de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y donde el ARNip, el microARN o el ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento de este, de modo que se reduzca la expresión del polipéptido.

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

En realizaciones relacionadas, se describe en la presente un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionarle al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en donde el agente terapéutico se selecciona de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y donde el ARNip, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido o un complemento de este.

En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula de lípido que consiste en o consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegidos de lípidos descritos en las Tablas 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol, y PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % DSPC:25-55 % Chol:0,5-15 % PEG-DMG o PEG-DMA, donde la partícula de lípido está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es reemplazado con POPC, DPPC, DOPE o SM.

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

En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula de lípido que consiste en o consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegidos de lípidos descritos en las Tablas 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol, y PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % DSPC:25-55 % Chol:0,5-15 % PEG-DMG o PEG-DMA, donde la partícula de lípido está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es reemplazado con POPC,

DPPC, DOPE o SM.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende proporcionarle al sujeto la composición farmacéutica descrita en la presente, donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral o mucosal. En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula de lípido que consiste en o consiste esencialmente en la mezcla de lípidos catiónicos elegidos de lípidos descritos en la Tabla 1-4 y la Tabla 9, DSPC, Chol y PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una proporción molar de aproximadamente 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % DSPC:25-55 % Chol:0,5-15 % PEG-DMG o PEG-DMA, donde la partícula de lípido está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación de lípido molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% molar de lípido catiónico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es reemplazado con POPC, DPPC, DOPE o SM.

En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica se proporciona al sujeto en combinación con una vacuna o antígeno. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan vacunas que comprenden una partícula lipídica descrita en la presente memoria, que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador, y también están asociadas con un antígeno ante el que se desea una respuesta inmunitaria. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno tumoral o está asociado con un agente infeccioso, tal como, por ejemplo, un virus, bacteria, o parásito.

Una variedad de antígenos tumorales, antígenos de agentes de infecciones y antígenos asociados con otras enfermedades son conocidos en la técnica y ejemplos de estos se describen en referencias citadas en la presente memoria. Ejemplos de antígenos adecuados para su uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, antígenos de polipéptido y antígenos de ADN. Ejemplos específicos de antígenos son los antígenos de hepatitis A, hepatitis B, viruela, polio, ántrax, gripe, tifus, tétano, sarampión, rotavirus, difteria, tos ferina, tuberculosis y rubéola. En una realización preferida, el antígeno es un antígeno recombinante de hepatitis B. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno recombinante de hepatitis A. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno tumoral. Ejemplos de tales antígenos asociados a tumores son MUC-1, antígeno EBV y antígenos asociados con el linfoma de Burkitt. En un aspecto adicional, el antígeno es un antígeno recombinante del antígeno tumoral proteínico relacionado con la tirosinasa. Los expertos en la técnica conocen otros antígenos adecuados para usar en la presente memoria.

Los antígenos asociados a tumores, adecuados para su uso en la presente memoria incluyen moléculas mutadas y no mutadas que puedan ser indicativas de un tipo de tumor individual, compartidas entre varios tipos de tumores, y/o expresadas o sobreexpresadas de forma exclusiva en las células tumorales, en comparación con las células normales. Además de proteínas y glicoproteínas, también se han documentado patrones de expresión específicos a tumores de carbohidratos, gangliósidos, glicolípidos y mucinas. Antígenos asociados a tumores de ejemplo para ser usados en las vacunas contra el cáncer de la presente memoria incluyen productos proteínicos de oncogenes, genes supresores tumorales y otros genes con mutaciones o reordenamientos exclusivos a las células tumorales, productos génicos embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos de tejidos (pero no específicos de tumores), receptores del factor de crecimiento, restos de carbohidratos en la superficie celular, proteínas virales extrañas y una cantidad de otras proteínas propias.

Realizaciones específicas de antígenos asociados a tumores incluyen, por ejemplo, antígenos mutados tales como los productos proteínicos de los protooncogenes Ras p21, supresor tumoral p53 y oncogenes BCR-abl, así como CDK4, MUM1, Caspasa 8 y Beta catenina; antígenos sobreexpresados tales como galectina 4, galectina 9, anhidrasa carbónica, Aldolasa A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales tales como alfa fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG); autoantígenos tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígenos de diferenciación de melanocitos, tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados con la próstata, tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos génicos embrionarios reactivados tales como MAG1, MAG3, MAG4, GAGE1, GAGE2, BAGE, RAGE, y otros antígenos del cáncer de testículo tales como NY-ESO1, SSX2 y SCP1; mucinas tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos tales como GM2, GD2 y GD3, glicolípidos y glicoproteínas neutros, tales como Lewis (y) y globo-H; y glicoproteínas tales como Tn, antígeno de Thompson-Friedenreich (TF) y sTn. También se incluyen en la presente memoria como antígenos asociados a tumores los lisados de células enteras y de células tumorales, así como partes inmunogénicas de estos, así como idiotipos de inmunoglobulina expresados en las proliferaciones monoclonales de linfocitos B para usar contra linfomas de linfocitos B.

Los patógenos incluyen, pero no se limitan a, agentes infecciosos, por ejemplo, virus que infectan a mamíferos y, más particularmente seres humanos. Ejemplos de virus infecciosos incluyen, pero no se limitan a: retrovirus (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; picornavirus (por ejemplo, virus de polio, virus de hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, capas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo,

virus del Ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Bunyaviridae (por ejemplo, virus del Hantaan, bunyavirus, phlebovirus y nairovirus); arenavirus (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela-zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus variola, virus vacuna, virus de la viruela); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiformes, el agente de la delta hepatitis (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A no B (clase 1=transmitida internamente; clase 2=transmitida parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Las bacterias gramnegativas y grampositivas también sirven como antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, las especies *Pasteurella*, las especies *Staphylococci*, y las especies *Streptococcus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, las especies *Pseudomonas* y las especies *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaeróbicas.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Ejemplos adicionales de patógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos infecciosos que infectan a mamíferos y más particularmente seres humanos. Ejemplos de hongos infecciosos incluyen, pero no se limitan a: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Ejemplos de parásitos infecciosos incluyen *Plasmodia* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Toxoplasma gondii*.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria pueden ser usadas para silenciar o modular un gen objetivo, tal como de modo no taxativo, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, el gen PDGF beta, el gen Erb-B, el gen Src, el gen CRK, el gen GRB2, el gen RAS, el gen MEKK, el gen JNK, el gen RAF, el gen Erk1/2, el gen PCNA(p21), el gen MYB, el gen JUN, el gen FOS, el gen BCL-2, el gen Ciclina D, el gen VEGF, el gen EGFR, el gen Ciclina A, el gen Ciclina E, el gen WNT-1, el gen beta-catenina, el gen c-MET, el gen PKC, el gen NFkB, el gen STAT3, el gen survivina, el gen Her2/Neu, el gen topoisomerasa I, el gen topoisomerasa II alfa, el gen p73, el gen p21(WAF1/CIP1), el gen p27(KIP1), el gen PPM1D, el gen RAS, el gen caveolina I, el gen MIB I, el gen MTAI, el gen M68, genes supresores tumorales, el gen supresor tumoral p53, el miembro DN-p63 de la familia p53, el gen supresor tumoral pRb, el gen supresor tumoral APC1, el gen supresor tumoral BRCA1, el gen supresor tumoral PTEN, el gen de fusión mLL, el gen de fusión BCR/ABL, el gen de fusión TEL/AML1, el gen de fusión EWS/FLI1, el gen de fusión TLS/FUS1, el gen de fusión PAX3/FKHR, el gen de fusión AML1/ETO, el gen alfa v-integrina, el gen receptor Flt-1, el gen tubulina, el gen del virus del papiloma humano, un gen requerido para la duplicación del virus del papiloma humano, el gen del virus de inmunodeficiencia humana, un gen requerido para la duplicación del virus de inmunodeficiencia humana, el gen del virus de la hepatitis A, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis A, el gen del virus de la hepatitis B, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis B, el gen del virus de la hepatitis C, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis C, el gen del virus de la hepatitis D, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis D, el gen del virus de la hepatitis E, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis E, el gen del virus de la hepatitis F, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis F, el gen del virus de la hepatitis G, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis G, el gen del virus de la hepatitis H, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis H, el gen del virus sincitial respiratorio, un gen que se requiere para la duplicación del virus sincitial respiratorio, el gen del virus del herpes simple, un gen que se requiere para la duplicación del virus del herpes simple, el gen del citomegalovirus del herpes, un gen que se requiere para la duplicación del citomegalovirus del herpes, el gen del virus de Epstein Barr del herpes, un gen que se requiere para la duplicación del virus de Epstein Barr del herpes, el gen del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, un gen que se requiere para la duplicación del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, el gen del virus jC, el gen humano que se requiere para el virus JC, el gen del mixovirus, un gen que se requiere para la duplicación del gen del mixovirus, el gen del rinovirus, un gen que se requiere para la duplicación del rinovirus, el gen del coronavirus, un gen que se requiere para la duplicación del coronavirus, el gen del virus del Nilo Occidental, un gen que se requiere para la duplicación del virus del Nilo Occidental, el gen de la encefalitis de San Luis, un gen que se requiere para la duplicación de la encefalitis de San Luis, el gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el gen del virus de la encefalitis del valle del Murray, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalitis del valle del Murray, el gen del virus del dengue,

un gen que se requiere para la duplicación del virus del dengue, el gen del virus 40 del simio, un gen que se requiere para la duplicación del virus 40 del simio, el gen del virus linfotrópico de células T humanas, un gen que se requiere para la duplicación del virus linfotrópico de células T humanas, el gen del virus de la leucemia murina de Moloney, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la leucemia murina de Moloney, el gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalomiocarditis, el gen del virus del sarampión, un gen que se requiere para la duplicación del virus del sarampión, el gen del virus de la varicela-zóster, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la varicela-zóster, el gen del adenovirus, un gen que se requiere para la duplicación del adenovirus, el gen del virus de la fiebre amarilla, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la fiebre amarilla, el gen del poliovirus, un gen que se requiere para la duplicación del poliovirus, el gen del poxvirus, un gen que se requiere para la duplicación del poxvirus, el gen del plasmodium, un gen que se requiere para la duplicación del gen del plasmodium, el gen de *Mycobacterium ulcerans*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium ulcerans*, el gen de *Mycobacterium tuberculosis*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium tuberculosis*, el gen de *Mycobacterium leprae*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium leprae*, el gen del *Staphylococcus aureus*, un gen que se requiere para la duplicación del *Staphylococcus aureus*, el gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación del *Streptococcus pneumoniae*, el gen del *Streptococcus pyogenes*, un gen que se requiere para la duplicación del *Streptococcus pyogenes*, el gen de la *Chlamydia pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación de la *Chlamydia pneumoniae*, el gen del *Mycoplasma pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación del *Mycoplasma pneumoniae*, un gen de integrina, un gen de selectina, el gen del sistema del complemento, el gen de la quimiocina, el gen receptor de la quimiocina, el gen GCSF, el gen Gro1, el gen Gro2, el gen Gro3, el gen PF4, el gen MIG, el gen de la proteína básica plaquetaria, el gen MIP-11, el gen MIP-1J, el gen RANTES, el gen MCP-1, el gen MCP-2, el gen MCP-3, el gen CmbkR1, el gen CMBKR2, el gen CMBKR3, el gen CMBKR5v, el gen AIF-1, el gen 1-309, un gen a un componente de un canal de iones, un gen a un receptor de neurotransmisores, un gen a un ligando de neurotransmisores, gen de la familia amiloide, el gen de la presenilina, el gen HD, el gen DRPLA, el gen SCA1, el gen SCA2, el gen MJD1, el gen CACNL1A4, el gen SCA7, el gen SCA8, el gen del alelo que se encuentra en las células LOH, o un gen de alelo de un gen polimórfico.

Definiciones

“Alquilo” significa un hidrocarburo alifático saturado, cíclico o no cíclico, de cadena lineal o ramificada, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo y similares, mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentilo y ciclohexenilo, y similares.

“Alquenilo” significa un alquilo, tal como se definió anteriormente, que contiene al menos un enlace doble entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen isómeros *cis* y *trans*. Los alquenos ramificados y cadena lineal representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares.

“Alquínilo” significa cualquier alquilo o alquenilo, tal como se definió anteriormente, que contiene además al menos un enlace triple entre carbonos adyacentes. Los alquínulos representativos ramificados y de cadena lineal incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentínilo, 2-pentínulo, 3-metil-1-butinilo, y similares.

El término “acilo” se refiere a hidrógeno, alquilo, cicloalquilo parcialmente saturado o completamente saturado, heterociclo parcialmente saturado o completamente saturado, arilo y grupos carbonilo sustituidos con heteroarilo. Por ejemplo, el acilo incluye grupos tales como alcanilo (C_1 - C_{20}) (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, *t*-butilacetilo, etc.), cicloalquilcarbonilo (C_3 - C_{20}) (por ejemplo, ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, etc.), carbonilo heterocíclico (por ejemplo, pirrolidinilcarbonilo, pirrolid-2-onal-5-carbonilo, piperidinilcarbonilo, piperazinilcarbonilo, tetrahidrofuranilcarbonilo, etc.), aroilo (por ejemplo, benzoilo) y heteroarilo (por ejemplo, tiofenilo-2-carbonilo, tiofenilo-3-carbonilo, furanilo-2-carbonilo, furanilo-3-carbonilo, 1H-pirrol-2-carbonilo, 1H-pirrol-3-carbonilo, benzo[b]tiofenilo-2-carbonilo, etc.).

El término “arilo” se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico, bicíclico, o tricíclico donde cualquier átomo de anillo se puede sustituir. Ejemplos de restos de arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, antraceno y pirenilo.

“Heterociclo” significa un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros o heterocíclico bicíclico de 7 a 10 miembros, aromático, saturado o no saturado y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno se puede cuaternizar opcionalmente, incluidos los anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos antencionados se fusionan con un anillo de benceno. El heterociclo puede acoplarse a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos tal como se define más adelante. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

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

10 El término “sustituido” se refiere al reemplazo de uno o más radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado que incluye, pero no se limitan a: halo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxi, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilosulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquiloaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquiloamino, arilamino, alquiloaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino, hidroxilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico, y alifático. Se entiende que es posible sustituir adicionalmente el sustituyente. Los sustituyentes de ejemplo incluyen compuestos amino, alquilamino, dialquilamino y amino cíclicos.

15 “Halógeno” significa flúor, cloro, bromo y yodo.

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

20 El término “alquilfosfato” se refiere a -O-P(Q')(Q'')-O-R, donde Q' y Q'' son cada uno independientemente O, S, N(R)₂, alquilo o alcoxi opcionalmente sustituido; y R es alquilo, ω-aminoalquilo o ω-aminoalquilo(sustituido) opcionalmente sustituido.

El término “alquilfosforotioato” se refiere a un alquilfosfato en donde al menos uno de Q' o Q'' es S.

El término “alquilfosfonato” se refiere a un alquilfosfato en donde al menos uno de Q' o Q'' es alquilo.

El término “hidroxialquilo” significa el radical -O-alquilo.

25 El término “alquilheterociclo” se refiere a un alquilo donde al menos un metileno ha sido reemplazado por un heterociclo.

El término “ω-aminoalquilo” se refiere a un radical -alquil-NH₂. Y el término “ω-aminoalquilo(sustituido)” se refiere a un ω-aminoalquilo en donde al menos uno del H o N ha sido reemplazado con alquilo.

30 El término “ω-fosfoalquilo” se refiere a -alquilo-O-P(Q')(Q'')-O-R, en donde Q' y Q'' son cada uno independientemente O o S y R alquilo opcionalmente sustituido.

El término “ω-tiofosfoalquilo” se refiere a un ω-fosfoalquilo en donde al menos uno de Q' o Q'' es S.

35 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden requerir el uso de grupos protectores. La metodología del grupo protector es conocida por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. Et. ál., Wiley-Interscience, Nueva York City, 1999). Brevemente, los grupos protectores dentro del contexto descrito en la presente memoria son cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional. Se puede agregar un grupo protector a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante determinadas reacciones y luego se quita para revelar el grupo funcional original. En algunas realizaciones se utiliza un “grupo protector de alcohol”. Un “grupo protector de alcohol” es cualquier grupo que disminuye o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional de alcohol. Se pueden agregar y quitar los grupos protectores mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica.

40 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas, incluyendo los métodos descritos más detalladamente en los Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación de FVII *in vivo* mediante el uso de los liposomas derivados del lípido catiónico

45 Ratones C57BL/6 (Charles River Labs, MA) recibieron o solución salina o ARNip en formulaciones deseadas mediante inyección en la vena de la cola a un volumen de 0,01 mL/g. En varios momentos después de la administración, los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isofluorano y se recolectó sangre en tubos con separación de suero mediante sangrado retroorbital. Los niveles séricos de la proteína Factor VII fueron determinados en muestras usando un ensayo cromogénico (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH, o Biophen FVII, Aniera Corporation, OH) de acuerdo con protocolos del fabricante. Se generó una curva estándar mediante el uso de suero recolectado de animales tratados con solución salina. En experimentos donde se evaluaron los niveles de ARNm del hígado, en varios momentos posteriores a la administración, los animales fueron sacrificados y sus hígados se recolectaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El tejido hepático congelado se molió

hasta convertirlo en polvo. Se prepararon lisados tisulares y se determinaron los niveles del ARNm del hígado de Factor VII y *apoB* mediante el uso de un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Ejemplo 2: Determinación de la eficacia de las formulaciones de partícula de lípido que contienen varios lípidos catiónicos mediante el uso de un modelo de silenciamiento del Factor VII de roedor *in vivo*.

- 5 El Factor VII (FVII), una proteína prominente en la cascada de coagulación, es sintetizado en el hígado (hepatocitos) y segregado al plasma. Los niveles de FVII en el plasma se pueden determinar mediante un ensayo colorimétrico en placa simple. Como tal, FVII representa un modelo conveniente para determinar la regulación por disminución mediada por ARNip de proteínas derivadas de hepatocitos, así como para monitorear las concentraciones en el plasma y la distribución tisular de las partículas de lípidos de ácido nucleico y ARNip.

Dúplex	Secuencia 5'-3'	la SEQ ID NO:	Objetivo
AD-1661	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

La letra minúscula es la modificación 2'OMe y Nf es una nucleobase modificada 2'F, dT es desoxitimidina, s es fosfotioato.

- 10 Los lípidos catiónicos mostrados anteriormente se usaron para formular liposomas que contienen el dúplex AD-1661 que usa un método de mezclado en línea, tal como se describe en la solicitud de patente provisional estadounidense 61/228.373. Las partículas de lípidos se formularon usando la siguiente proporción molar: 50 % lípido catiónico/ 10 % distearoilfosfatidilcolina (DSPC) / 38,5 % Colesterol/ 1,5 % PEG-DMG (1-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular de PEG promedio de 2000).

Protocolo general para mezclado en línea

- 20 Se prepararon soluciones madre individuales y separadas- una que contenía lípido y la otra ARNip. Se preparó solución madre de lípido que contenía lípido deseado o mezcla de lípido, DSPC, colesterol y lípido PEG mediante disolución en etanol al 90 %. El 10 % restante era amortiguador citrato de pH bajo. La concentración de la solución madre de lípidos era de 4 mg/mL. El pH de este amortiguador citrato puede oscilar entre pH 3 y pH 5, dependiendo del tipo de lípido fusogénico empleado. El ARNip también se disolvió en amortiguador citrato a una concentración de 4 mg/mL. Se preparó 5 mL de cada solución madre.

- 25 Las soluciones madre eran completamente transparentes y se aseguró que los lípidos estuvieran completamente disueltos antes de combinarse con el ARNip. Las soluciones madre se pueden calentar para que disuelvan los lípidos por completo. Los ARNip usados en el proceso pueden ser oligonucleótidos modificados o no modificados, y pueden estar conjugados con restos lipófilos tal como colesterol.

- 30 Las soluciones madre individuales se combinaron al bombear cada solución a un unión T. Una bomba Watson-Marlow de cabezal doble se usó para controlar de forma simultánea el inicio y fin de las dos corrientes. Un tubo de polipropileno de 1.6 mm se redujo en tamaño adicionalmente hasta un tubo de 0,8 mm para aumentar la tasa de flujo lineal. La línea de polipropileno (ID= 0,8 mm) se adjuntó a cada lado de una unión en T. La T de polipropileno tiene un borde lineal de 1.6 mm para un volumen resultante de 4.1 mm³. Cada uno de los extremos grandes (1.6 mm) de la línea de polipropileno se colocó en tubos de ensayo que contienen ya sea la solución madre de lípido disuelto o el ARNip disuelto. Después de la unión en T, se colocó un solo tubo de donde sale la corriente combinada. El tubo luego se extendió a un recipiente con un volumen de 2x de PBS, el cual se agitó rápidamente. La tasa de flujo para la bomba se encontraba en una configuración de 300 rpm o 110 mL/min. Se quita el etanol y se intercambia con PBS mediante diálisis. Luego las formulaciones lipídicas se concentraron usando centrifugación o diafiltración hasta lograr una concentración operativa apropiada.

- 40 Ratonos C57BL/6 (Charles River Labs, MA) recibieron o solución salina o ARNip formulada mediante inyección en la vena de la cola. En varios puntos temporales después de la administración, las muestras de suero se recolectaron mediante sangrado retroorbital. Los niveles séricos de la proteína Factor VII fueron determinados en muestras mediante el uso de un ensayo cromogénico (Biophen FVII, Aniara Corporation, OH). Para determinar los niveles de ARNm del hígado del Factor VII, los animales fueron sacrificados y sus hígados se recolectaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se prepararon lisados tisulares a partir de tejidos congelados y se cuantificaron los niveles de ARNm del hígado del Factor VII mediante el uso de un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

- 45 La actividad FVII se evaluó en animales tratados con ARNip FVII 48 horas después de la inyección intravenosa (bolo) en ratones C57BL/6. FVII se midió mediante el uso de un kit disponible comercialmente para determinar los niveles de proteína en suero o tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante a una escala de microplaca. La reducción de FVII se determinó contra ratones de control no tratados, y los resultados se expresaron como % de

FVII residual. Dos niveles de dosis (0,05 y 0,005 mg/kg de ARNip FVII) se usaron en la evaluación de cada composición de liposomas novedosa. La Figura 6 muestra una gráfica que ilustra los niveles de proteína de FVII en animales a los que se les administró 0,05 o 0,005 mg/kg de partículas de lípidos que contienen diferentes lípidos catiónicos.

5 Ejemplo 3: formulación de ARNip mediante el uso de vesículas preformadas

Las partículas que contienen lípidos catiónicos se elaboraron usando el método de vesícula preformada. El lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG-lípido se disolvieron en etanol a una relación molar de 40/10/40/10, respectivamente. La mezcla de lípido se agregó a un amortiguador acuoso (citrato 50 mM, pH 4) con mezclado a un etanol final y concentración de lípido de 30 % (vol/vol) y 6.1 mg/mL respectivamente y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 2 min antes de la extrusión. Los lípidos hidratados se extrujeron a través de dos filtros de tamaño de poro de 80 nm apilados (Nuclepore) a 22 °C mediante el uso de un Extrusor Lipex (Northern Lipids, Vancouver, BC) hasta que se obtuvo un diámetro de vesícula de 70-90 nm, tal como se determinó mediante análisis Nicomp. Esto generalmente requirió 1-3 pasadas. Para algunas mezclas de lípidos catiónicos que no formaron vesículas pequeñas, hidratar la mezcla de lípido con un amortiguador de pH inferior (citrato 50 mM, pH 3) para protonar el grupo fosfato en el grupo principal DSPC ayudó a formar vesículas estables de 70-90 nm.

El ARNip FVII (disuelto en un citrato 50 mM, solución acuosa de pH 4 que contiene etanol al 30 %) se agregó a las vesículas, previamente equilibradas a 35 °C a una velocidad de ~5mL/min con mezclado. Después de que se logró una proporción de ARNip/lípido objetivo final de 0,06 (p/p), la mezcla se incubó durante unos 30 min adicionales a 35°C para permitir la reorganización de la vesícula y encapsulación del ARNip FVII. El etanol luego se quitó y el amortiguador externo se reemplazó con PBS (NaCl 155 mM, Na₂HPO₄ 3mM, KH₂PO₄ 1mM, pH 7.5) ya sea por diálisis o diafiltración de flujo tangencial. La proporción de ARNip respecto a lípido encapsulado final se determinó después de la eliminación de ARNip no encapsulado mediante el uso de columnas de agitación de exclusión por tamaño o columnas de agitación de intercambio de iones.

Ejemplo 4: Determinación in vivo de la eficacia de las formulaciones de lípido

Las formulaciones de prueba se evaluaron inicialmente para probar su inactivación de FVII en ratones C57B1/6 hembra de 7-9 semanas, 15-25 g a 0,1, 0,3, 1.0 y 5.0 mg/kg con 3 ratones por grupo de tratamiento. Todos los estudios incluyeron animales que reciben ya sea solución salina amortiguada con fosfato (PBS, grupo de control) o una formulación de referencia. Las formulaciones se diluyeron hasta la concentración apropiada en PBS inmediatamente antes de la evaluación. Los ratones fueron pesados y se calcularon los volúmenes de dosificación apropiada (10 µl/g peso corporal). Las formulaciones de prueba y referencia así como PBS (para animales de Control) se administraron de forma intravenosa por la vena de la cola lateral. Los animales fueron anestesiados 24 horas después con una inyección intraperitoneal de Ketamina/Xylazina y 500-700 µl de sangre fue recolectada mediante punción cardíaca en tubos separadores de suero (BD Microtainer). La sangre se centrifugó a 2.000 x g durante 10 minutos a 15 °C y el suero se recolectó y almacenó a -70 °C hasta el análisis. Las muestras de suero se descongelaron a 37 °C durante 30 min, se diluyó en PBS y se separó en alícuotas en placas de ensayo de 96 pocillos. Los niveles del factor VII se evaluaron usando un ensayo cromogénico (kit Biophen FVII, Hyphen BioMed) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la absorbancia medida en el lector de microplaca equipado con un filtro de longitud de onda de 405 nm. Los niveles FVII de plasma se cuantificaron y los ED₅₀ (la dosis que es resultado de una reducción del 50 % en niveles FVII en plasma en comparación con los animales de control) se calcularon usando una curva estándar generada de una muestra agrupada de suero de animales de Control. Esas formulaciones de interés que muestran niveles elevados de inactivación de FVII (ED₅₀ << 0,1 mg/kg) se reevaluaron en estudios independientes a una dosis inferior para confirmar la potencia y establecer ED₅₀. Los valores ED₅₀ de un número representativo de los compuestos se muestran en la Tabla 9.

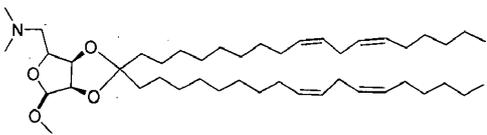
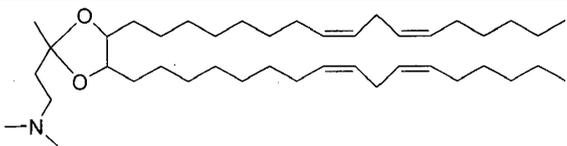
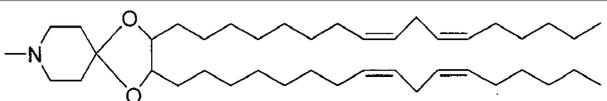
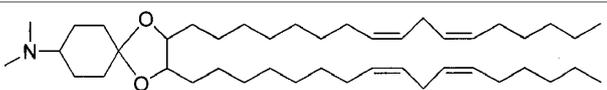
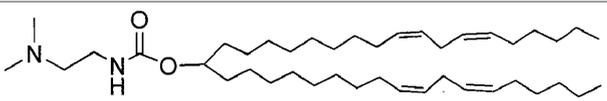
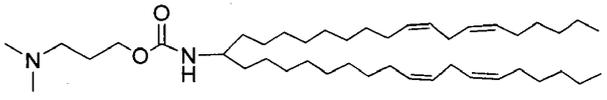
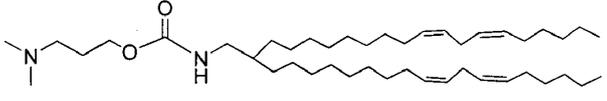
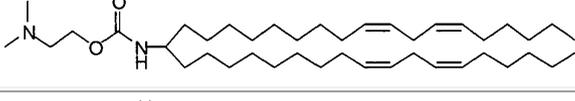
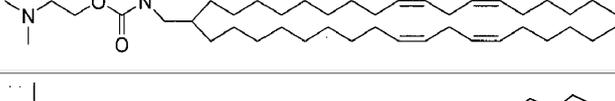
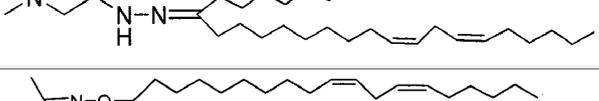
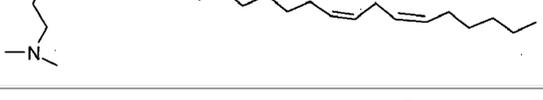
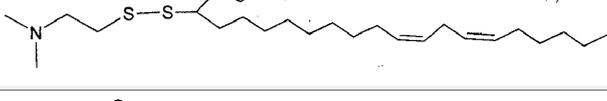
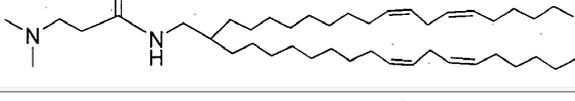
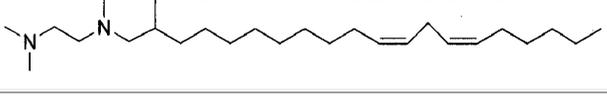
Ejemplo 5: Determinación de pK_a de lípidos formulados

Los valores pK_a para los lípidos catiónicos ionizables diferentes se determinaron esencialmente tal como se describe (Eastman et al., 1992 Biochemistry 31:4262-4268) mediante el uso de la sonda fluorescente de ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalenosulfónico (TNS), que es no fluorescente en agua pero se vuelve apreciablemente fluorescente cuando se une a las membranas. Las vesículas compuestas de lípido catiónico/DSPC/CH/PEG-c-DOMG (40:10:40:10 proporción molar) se diluyeron hasta 0,1 mM en amortiguadores (NaCl 130 mM, CH₃COONH₄ 10 mM, MES 10 mM, HEPES 10 mM) de varios valores de pH que varían de 2 a 11. Una alícuota de la solución acuosa TNS (1 µM final) se agregó a las vesículas diluidas y después de un período de equilibrio de 30 segundos la parte fluorescente de la solución que contiene TNS se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 321nm y 445nm, respectivamente. El pK_a de las vesículas que contienen lípido catiónico se determinó al graficar la fluorescencia medida contra el pH de las soluciones y que ajustan los datos a una curva Sigmodial mediante el uso del programa de producción de gráficos comercial IgorPro. Los valores pK_a para un número representativo de los compuestos se muestran en la Tabla 9. Además de los compuestos descritos de forma explícita en la Tabla 9, también se contemplan las formas cuaternizadas (por ejemplo, donde el nitrógeno de amina está adicionalmente modificado, tal como alquilado adicionalmente, para proporcionar una amina cuaternaria).

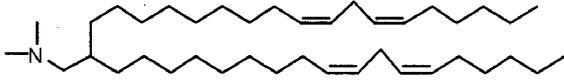
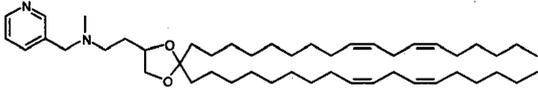
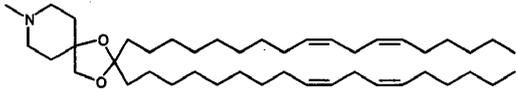
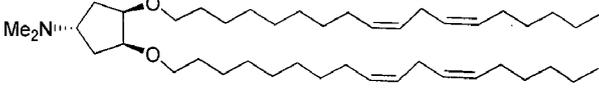
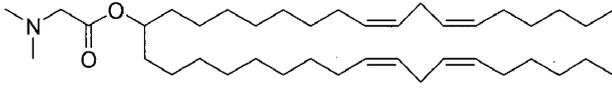
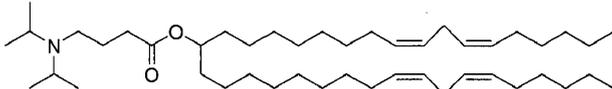
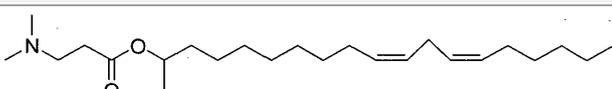
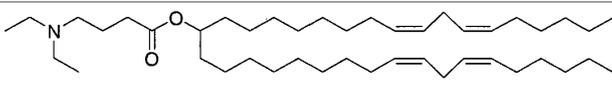
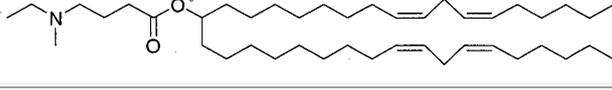
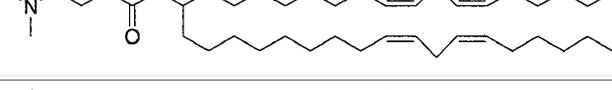
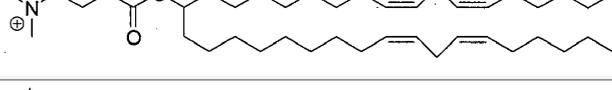
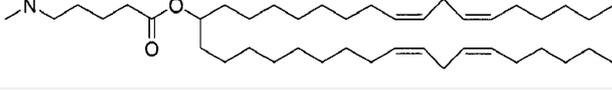
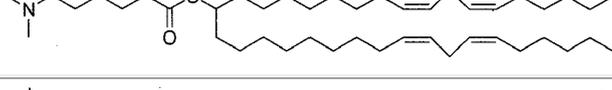
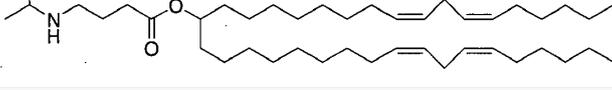
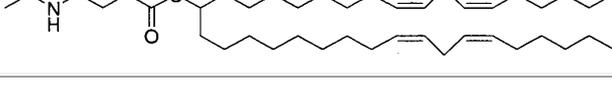
Tabla 9

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
ALNY-104		2,5	5,65
ALNY-105		1,5	5,60
ALNY-106		0,3	6,85
ALNY-100		0,3	6,4
ALNY-101		0,1	6,43
ALNY-102		2,0	7,3
ALNY-103		2,5	6,98
ALNY-107		0,25	6,63
ALNY-108		0,75	6,55
ALNY-109		2,0	6,75
ALNY-110		2,0	6,5
ALNY-115		1,0	
ALNY-116		1,0	
ALNY-121		0,5	6,60
ALNY-122		0,55	
ALNY-169		2,60	
ALNY-144		0,60	

ES 2 749 426 T3

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
ALNY-151		>5,00	5,50
ALNY-152		0,15	6,60
ALNY-156		< 0,1	6,08
ALNY-158		1,40	
ALNY-190		0,47	6,49
ALNY-192		2,1	7,21
ALNY-200		>5,00	7,57
ALNY-202		0,12	6,52
ALNY-203		5,0	7,07
ALNY-175		2,7	
ALNY-149		0,1	5,81
ALNY-160		2,00	5,18
ALNY-201		>5,0	8,02
ALNY-141		0,14	6,62

ES 2 749 426 T3

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
ALNY-181		0,25	
ALNY-140		>5,0	4,95
ALNY-148		0,3	6,53
ALNY-117		>5,0	
DLin-M-C1-DMA		5,00	4,17
DLin-M-C3-DIPA		4,5	5,44
DLin-M-C2-DMA		0,6	5,64
DLin-M-C3-DEA		0,3	6,17
DLin-M-C3-MEA		0,03	6,21
DLin-M-C3-DMA		0,03	6,44
DLin-M-C3-TMA		No corresponde	>1,00
DLin-M-C4-DMA		0,15	6,93
DLin-M-C5-DMA		0,65	7,16
DLin-M-C3-IPA		1,00	7,31
DLin-M-C3-EA		5,00	7,62

ES 2 749 426 T3

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
DLin-M-C3-MA		5,00	8,11
DLin-M-C3-A		5,00	8,12
ALNY-139		5,00	10,00
ALNY-171		0,25	6,63
ALNY-232			10,00
DAra-K5-C2-DMA		0,52	6,26
DDha-K5-C2-DMA		0,20	6,09
DLen(y)-M-C3-DMA		0,08	6,30
DLen(y)-M-C4-DMA		0,50	6,75
DLen-K5-C2-DMA		0,05	6,59
DLin-K5-C2-DMA		0,10	6,68
DLin-K6A-C2-DMA		0,25	6,73
DLin-K6A-C3-DMA		0,70	6,95
DLin-K6S-C1-DMA		0,10	5,97

ES 2 749 426 T3

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
DLin-K6S-C2-DMA		3,00	7,25
DLin-K6S-C4-DMA		4,00	7,61
DLin-K-DMA (Biofina)		0,25	5,94
DLin-K-DMA (CDRD)		0,40	5,91
DLin-K-XTC2-DMA-(R)		0,10	6,79
DLin-K-XTC2-DMA-(S)		0,10	6,65
DLin-MAL-C2-DMA		1,50	6,66
DLin-M-C1-DMA		5,00	4,17
DLin-M-C2-DMA		0,60	5,64
DLin-M-C3-A		5,00	8,12
DLin-M-C3-DEA		0,30	6,17
DLin-M-C3-DIPA		4,50	5,44
DLin-M-C3-DMA		0,03	6,44
DLin-M-C3-EA		5,00	7,62
DLin-M-C3-IPA		1,00	7,31
DLin-M-C3-MA		5,00	8,11

Compuesto	Estructura	ED ₅₀	pK _a
DLin-M-C3-MEA		0,03	6,21
DLin-M-C4-DMA		0,15	6,93
DLin-M-C5-DMA		0,65	7,16
M-C2/M-C3 (12:28)		0,05	6,32
M-C2/M-C3 (28:12)		0,10	6,11
M-C2/M-C4 (20:20)			6,45
M-C3/M-C4 (12:28)		0,10	6,83
M-C3/M-C4 (28:12)		0,05	6,61
TLin-MAL-C2-DMA			3,93
DLin-DAP-DMA			5,67

Valores ED₅₀ medidos se graficaron como una función de los valores pK_a medidos, Ver la FIG. 1. Los lípidos más activos se agruparon en el intervalo de pK_a de 5,8 a 6,9, con un pK_a óptimo evidente de ~6,3.

- 5 Las series DLin-M de compuestos proporcionaron una prueba directa del efecto de pK_a en ED₅₀, ya que los compuestos son estructuralmente similares pero tienen valores pK_a que varían de menos de 5 a mayores que 8. Cuando lo valores ED₅₀ medidos se graficaron como una función de los valores pK_a medidos para la serie DLin-M, se observó una pK_a óptima fuerte de ~6,2 - 6,4 (FIG. 2). Dependiendo de la forma y posición a lo largo de la curva de respuesta de pK_a, un pequeño cambio en la pK_a del lípido (o pH del entorno) puede tener un gran efecto en la ED₅₀ observada, posiblemente tan grande como 3 a 5 veces.
- 10 La eficacia de un lípido catiónico para administrar ácidos nucleicos puede variar entre una especie y otra. Una diferencia en los valores de pH de la sangre u otros entornos *in vivo* podrían atribuir a las diferencias entre especies. Por consiguiente, si se determina una pK_a óptima para una especie (por ejemplo, ratón), otra especie puede tener una pK_a óptima diferente. Por lo tanto, la selección de lípido catiónico puede ser guiado de una especie a otra mediante referencia a los valores pK_a de los lípidos catiónicos y diferencias en valores de pH *in vivo* de diferentes especies.
- 15

Una mezcla de dos o más lípidos catiónicos puede tener un pK_a promedio o media que disminuye entre los valores de pK_a de los lípidos catiónicos individuales. Un pK_a promedio para una mezcla de lípidos catiónicos se puede definir como:

$$pK_a^{prom} = \sum_i f_i (pK_a)_i$$

5 donde f_i es la fracción molar del lípido i -ésimo. y $(pK_a)_i$ es el pK_a del lípido i -ésimo. La mezcla de lípidos puede tener una pK_a empírica (medida, por ejemplo, usando el ensayo de fluorescencia TNS descrito anteriormente) cerca del pK_a promedio calculado. El pK_a empírico y el pK_a promedio calculado se pueden considerar cercanos si se encuentran dentro de 0,4 unidades pK_a , dentro de 0,3 unidades pK_a , dentro de 0,2 unidades pK_a o dentro de 0,1 unidades pK_a entre sí. La FIG. 3A muestra la fluorescencia TNS relativa como una función de pH para las partículas de lípidos preparadas con varias composiciones de lípido catiónico, tal como se explica en la leyenda. De estos datos, se determinó el pK_a de cada composición. La FIG. 3B muestra la relación entre el cálculo y los valores pK_a medidos para las composiciones. Por ejemplo, una partícula de lípido que incluye una mezcla de partes iguales de DLin-M-C2-DMA y DLin-M-C4-DMA, tenían un pK_a medido de -6,5, dentro de 0,2 unidades pK_a del pK_a promedio calculado, ~6,3 para esta mezcla.

15 Una mezcla de lípidos, cada uno con un pK_a que difiere sustancialmente de un pK_a óptimo (por ejemplo, que difiere en al menos 0,1 unidades pK_a , en al menos 0,2 unidades pK_a , en al menos 0,3 unidades pK_a , o por más de 0,3 unidades pK_a), puede producir un ED_{50} inferior (es decir, más eficaz) del que se esperaría basado en ED_{50} solo. En otras palabras, una mezcla de lípido seleccionado de forma apropiada puede de forma inesperada ser más eficaz que cualquier lípido individualmente.

20 La FIG. 4 ilustra la eficacia de diferentes composiciones de lípidos, con diferentes valores pK_a , en el ensayo del factor VII de ratón. Las leyendas indican la identidad y fracción de lípidos catiónicos en las nanopartículas. Por ejemplo, la leyenda en el extremo izquierdo, "M-C2 (40 %)" indica una formulación de nanopartícula lipídica 40 % DLin-M-C2-DMA, 10 % de distearoilfosfatidilcolina (DSPC), 40 % Colesterol, y 10 % PEG-DMG (1-(monometoxipoli(etilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular PEG promedio de 2000). Las leyendas "M-C3" y "M-C4" hacen referencia a DLin-M-C3-DMA y DLin-M-C4-DMA, respectivamente. Los diamantes corresponden a un nivel de dosificación de 0,05 mg/kg ARNip, y los cuadrados a 0,10 mg/kg.

25 Tal como puede observarse en la FIG. 4, las composiciones más eficaces tenían un pK_a entre 6,2 y 6,8. Las mezclas de lípido fueron de forma más marcada más eficaces que lo que se esperaba basándose en el rendimiento de los componentes individuales. Una composición que incluye MC-2 como el único lípido catiónico tenía un % de FVII residual de aproximadamente 90 % en cualquier nivel de dosificación. De manera similar, una composición que incluye MC-4 como el único lípido catiónico también tenía un % de FVII residual de aproximadamente 90 % en cualquier nivel de dosificación. Cuando los dos fueron combinados en partes iguales (pero manteniendo la misma fracción de lípido catiónico en la mezcla general), proporcionan una composición con un pK_a de 6,45, el % de FVII residual medido fue menor que 40 % a 0,05 mg/kg. La eficacia medida fue similar a aquella de una composición que incluye MC-3 como el único lípido catiónico. El pK_a de DLin-M-C3-DMA es 6,44, muy cercano a aquel de la mezcla.

Ejemplo 6: Resumen de los resultados

30 La Tabla 10 resume los resultados obtenidos para una variedad de mezclas de lípidos. En la tabla 10, la denominación MC2 se refiere a DLin-M-C2-DMA; las denominaciones MC3 y MC3-DMA ambas se refieren a DLin-M-C3-DMA, la denominación MC3-TMA se refiere a DLin-M-C3-TMA, la denominación MC4 se refiere a DLin-M-C4-DMA, y la denominación 149B se refiere a ALNY-149. Ver la Tabla 9. La denominación C12-200 se refiere al compuesto denominado C12-200 en Love, K.T., et al., "Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing," PNAS 107, 5, (2010), 1864-1869.

Tabla 10

Lípido A	pK_a ($\pm 0,2$)	ED_{50}	Lípido B	pK_a ($\pm 0,2$)	ED_{50}	Lípido A/B (mol:mol)	Formulación*	mezcla pK_a ($\pm 0,2$)	mezcla ED_{50}
MC2	5,64	0,600	MC3	6,50	0,030	27:13	40:10:40:10	6,11	0,100
MC2	5,64	0,600	MC3	6,50	0,030	13:27	40:10:40:10	6,32	0,050
MC3	6,50	0,030	MC4	6,93	0,150	28:12	40:10:40:10	6,61	0,050
MC3	6,50	0,030	MC4	6,93	0,150	12:28	40:10:40:10	6,83	0,100
MC3-DMA	6,50	0,030	MC3-TMA	No corresponde	>1,00	35:5	40:10:40:10	6,36	0,370
MC3-DMA	6,50	0,030	MC3-TMA	No corresponde	>1,00	30:10	40:10:40:10	6,34	>1,00

ES 2 749 426 T3

MC2	5,64	0,600	MC4	6,93	0,150	20:20	40:10:40:10	6,45	0,040
149B	6,05	0,050	MC4	6,93	0,150	20:20	40:10:40:10	6,56	0,030
MC3	6,50	0,030	C12-200	6,47	0,030	20:20	40:10:40:10	6,55	0,007
MC3	6,46	0,010	**C12-200	6,47	0,030	20:20	50:10:38,5:1,5	6,13	0,008
* proporción de lípido catiónico total: DSPC:colesterol:PEG-DMG									
**datos (pK _a y ED ₅₀) para C12-200 en sí mismo fue de la formulación 40:10:40:10									

Listado de secuencias

<110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5 <130> B 3202EU

<140> 10 838 298.7

<141> 2010-12-17

<150> 61/287,995

<151> 2009-12-18

10 <160> 62

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1

taacgttgag gggcat 16

20 <210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

<222> (4)..(4)

<223> Citosina metilada

30 <400> 2

taacgttgag gggcat 16

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3

tccatgacgt tctgacgtt 20

40 <210> 4

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

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

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

 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> Citosina metilada

 <400> 4
 15 tccatgacgt tctgacgt 20

 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <400> 5
 taagcatacg gggtgt 16

 <210> 6
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 6
 30 aacgtt 6

 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <400> 7
 gatgctgtgt cgggtctcc gggc 24

 40 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 8
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24

 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50

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

<220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (2)..(2)
 <223> Citosina metilada

<220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Citosina metilada

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

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> Citosina metilada

20 <400> 9
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

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

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

<400> 10
 tccaggactt ctctcaggtt 20

30 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 11
 tctcccagcg tgcgcat 18

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

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

<400> 12
 tgcaccccc aggccacat 20

45 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

50 <400> 13
 gcccaagctg gcatccgtca 20

<210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 14
 ggtgctcact gcggc 15

10 <210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 15
 aaccgttgag gggcat 16

<210> 16
 <211> 24
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

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

<400> 16
 tatgctgtgc cggggtcttc gggc 24

25 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 17
 gtgccggggt ctcgggc 18

<210> 18
 <211> 18

35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 18
 ggaccctcct ccggagcc 18

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

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

<400> 19
 tcctccggag ccagact 18

<210> 20
 <211> 15
 <212> ADN

50

- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 20
- 5 aacgttgagg ggcac 15
- <210> 21
- <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 21
- ccgtggtcat gctcc 15
- <210> 22
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 22
- 20 cagcctggct caccgcttg g 21
- <210> 23
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 23
- cagccatggt tcccccaac 20
- <210> 24
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 24
- gttctcgctg gtgagttca 20
- <210> 25
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 25
- 45 tctcccagcg tgcgcat 18
- <210> 26
- <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 26
 gtgctccatt gatgc 15

5 <210> 27
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 27
 gaguucugau gaggccgaaa ggccgaaagu cug 33

<210> 28
 <211> 6
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

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

<400> 28
 rrcgyy 6

20 <210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

25 <400> 29
 aacgttgagg ggcatt 15

30 <210> 30
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 30
 caacgttatg gggaga 16

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 31
 ttccatgacg ttctgacgt 20

45 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

50 <220>

<221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> Citosina metilada

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> Citosina metilada

 <400> 32
 tccatgacgt tctgacgt 9

 10 <210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 15 <223> Descripción de desconocido: Péptido GALA

 <400> 33
 Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

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

 <210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido EALA

 <400> 34
 Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

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

 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido de ligando endosomolítico

 <400> 35
 Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

 <210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido INF-7

 <400> 36
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15

 Met Ile Trp Asp Tyr Gly
 20

<210> 37
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido Inf HA-2

<400> 37
 Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
 20

10 <210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Descripción de desconocido: péptido diINF-7

<400> 38
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys
 20

20 <210> 39
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: péptido diINF3

25 <400> 39
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15
 Met Ile Asp Gly Gly Cys
 20

<210> 40
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido GLF

<400> 40
 Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu
 1 5 10 15
 His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ser Cys
 35

35 <210> 41
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<400> 45
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

5 <210> 46
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido a base de secuencia señal

<400> 46
 Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

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

<210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido PVEC

<400> 47
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15

Ser Lys

20 <210> 48
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido de transportano

25 <400> 48
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
 1 5 10 15

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

30 <210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido de modelo anfifílico

<400> 49
 Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

35 Leu Ala

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>

<223> Descripción de desconocido: Péptido de permeación celular

<400> 50
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5 <210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: Péptido de permeación de pared celular bacteriana

10 <400> 51
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10

15 <210> 52
<211> 37
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: Polipéptido LL-37

<400> 52
Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

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

Pro Arg Thr Glu Ser
35

20 <210> 53
<211> 31
<212> PRT
<213> Desconocido

25 <220>
<223> Descripción de desconocido: Polipéptido Cecropin P1

<400> 53
Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
1 5 10 15

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

30 <210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: Polipéptido Alda-defensina

<400> 54
Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

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

<210> 55
<211> 36

<212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido Beta-defensina

5 <400> 55
 Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
 1 5 10 15

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

Lys Cys Cys Lys
 35

<210> 56
 <211> 12
 <212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido Bactenecina

<400> 56
 Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
 1 5 10

15 <210> 57
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido PR-39

<400> 57
 Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
 1 5 10 15

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

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

25 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido de indolicidina

<400> 58
 Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
 1 5 10

35 <210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido que contiene MTS hidrofóbico de ejemplo

<400> 59

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: Péptido que contiene MTS hidrofóbico de ejemplo

<400> 60
 Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

10 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

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

<220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (3)..(4)
 <223> nucleobase modificada 2'F

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(9)
 25 <223> nucleobase modificada 2'F

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(16)
 <223> nucleobase modificada 2'F

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> nucleobase modificada 2'F

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> Desoxitimidina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> enlace de fosfotioato

40 <400> 61
 ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

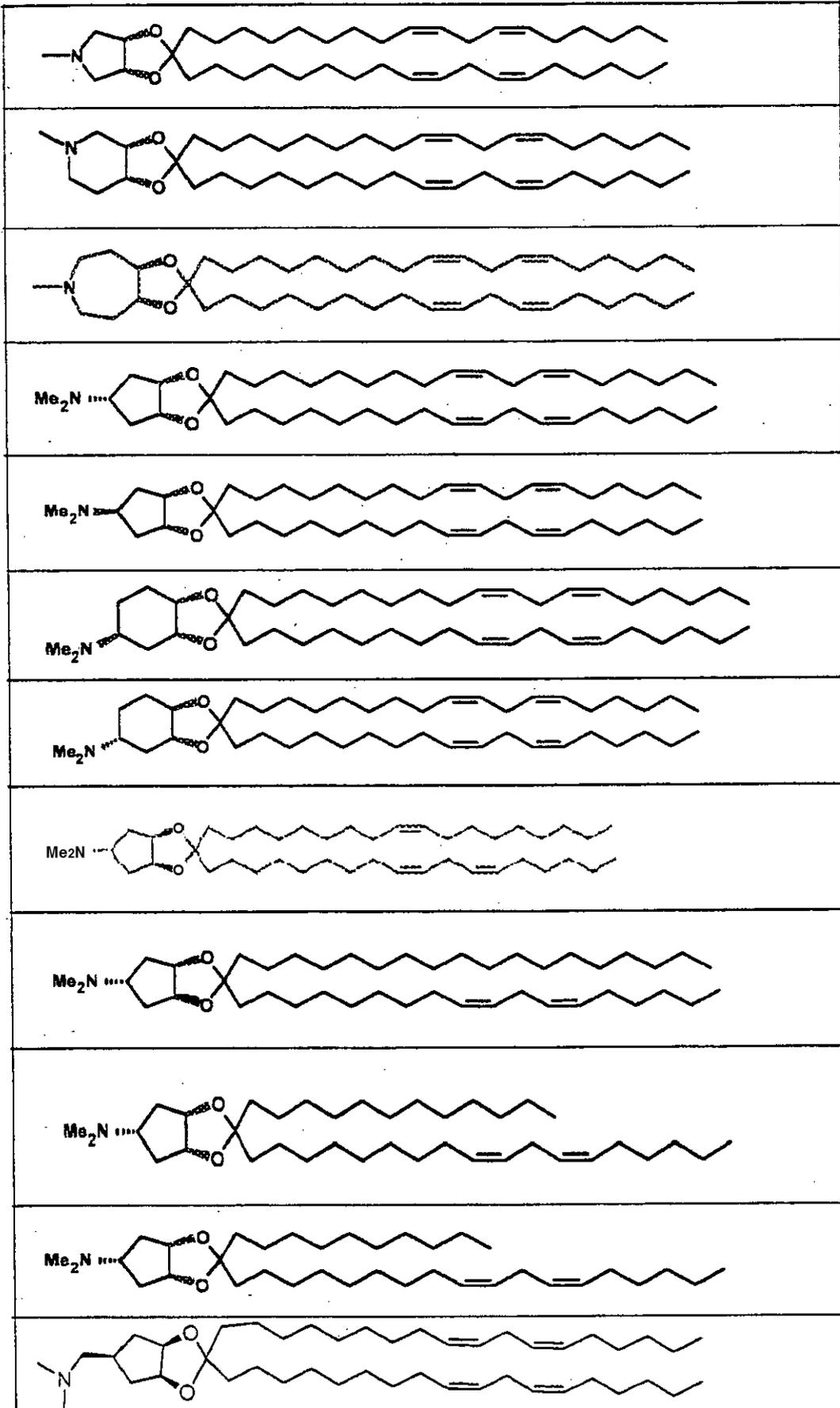
45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

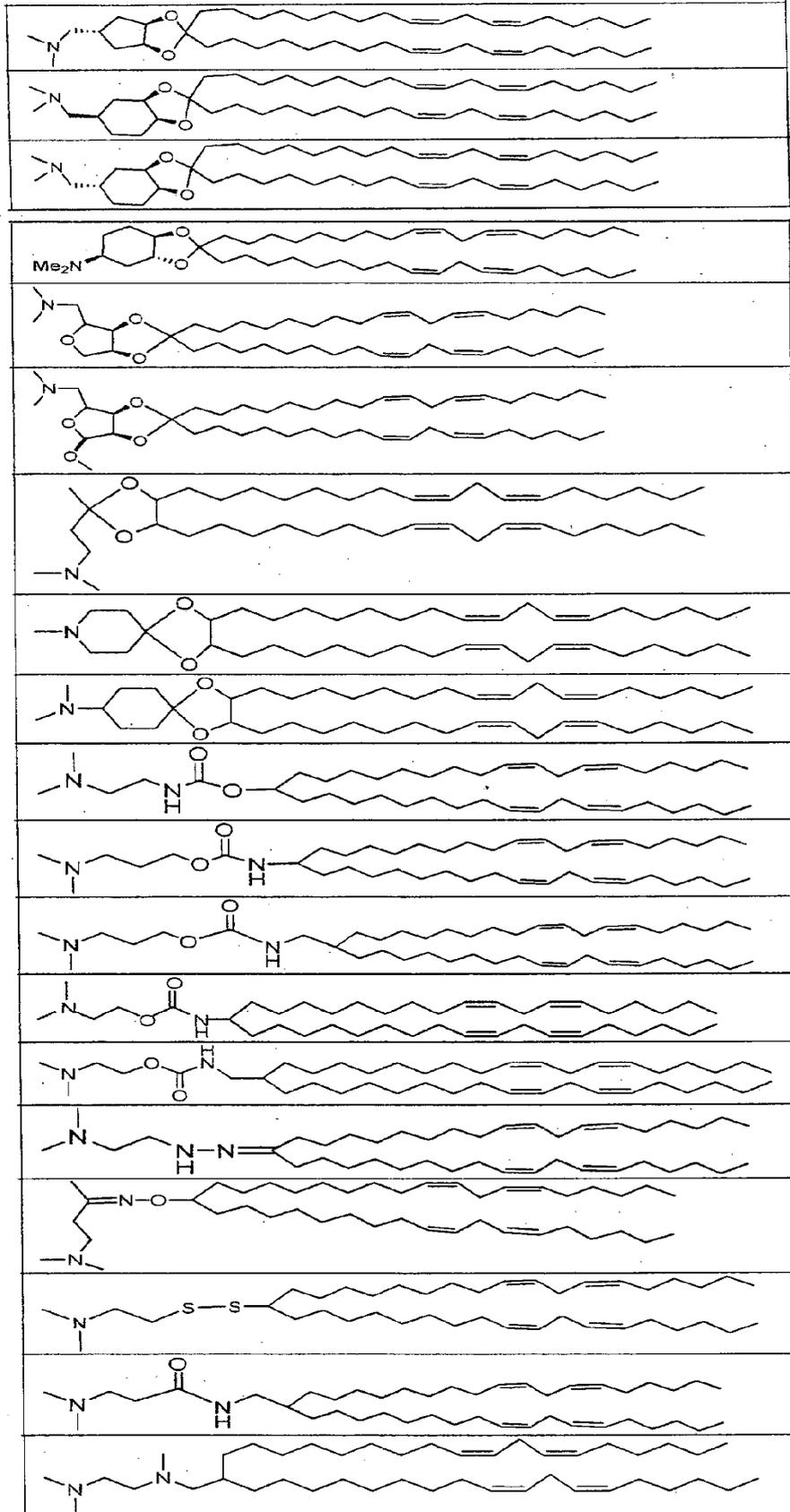
<220>
 50 <223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

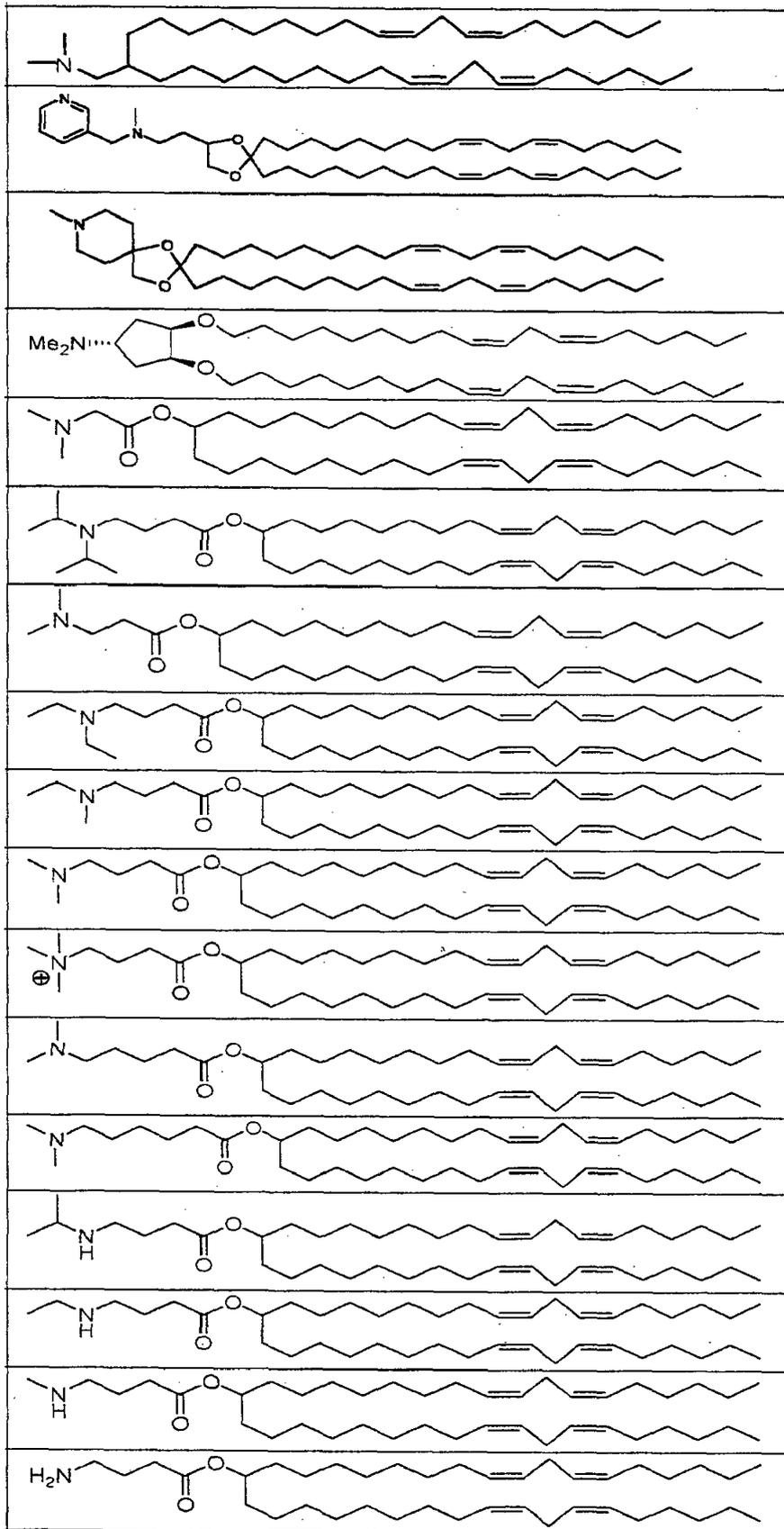
<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> nucleobase modificada 2'F
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(8)
 <223> nucleobase modificada 2'F
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13) .. (13)
 <223> nucleobase modificada 2'F
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (18)
 <223> nucleobase modificada 2'F
 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> Desoxitimidina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> enlace de fosfotioato
 25 <400> 62
 gaaagacuug agaugaucct t 21

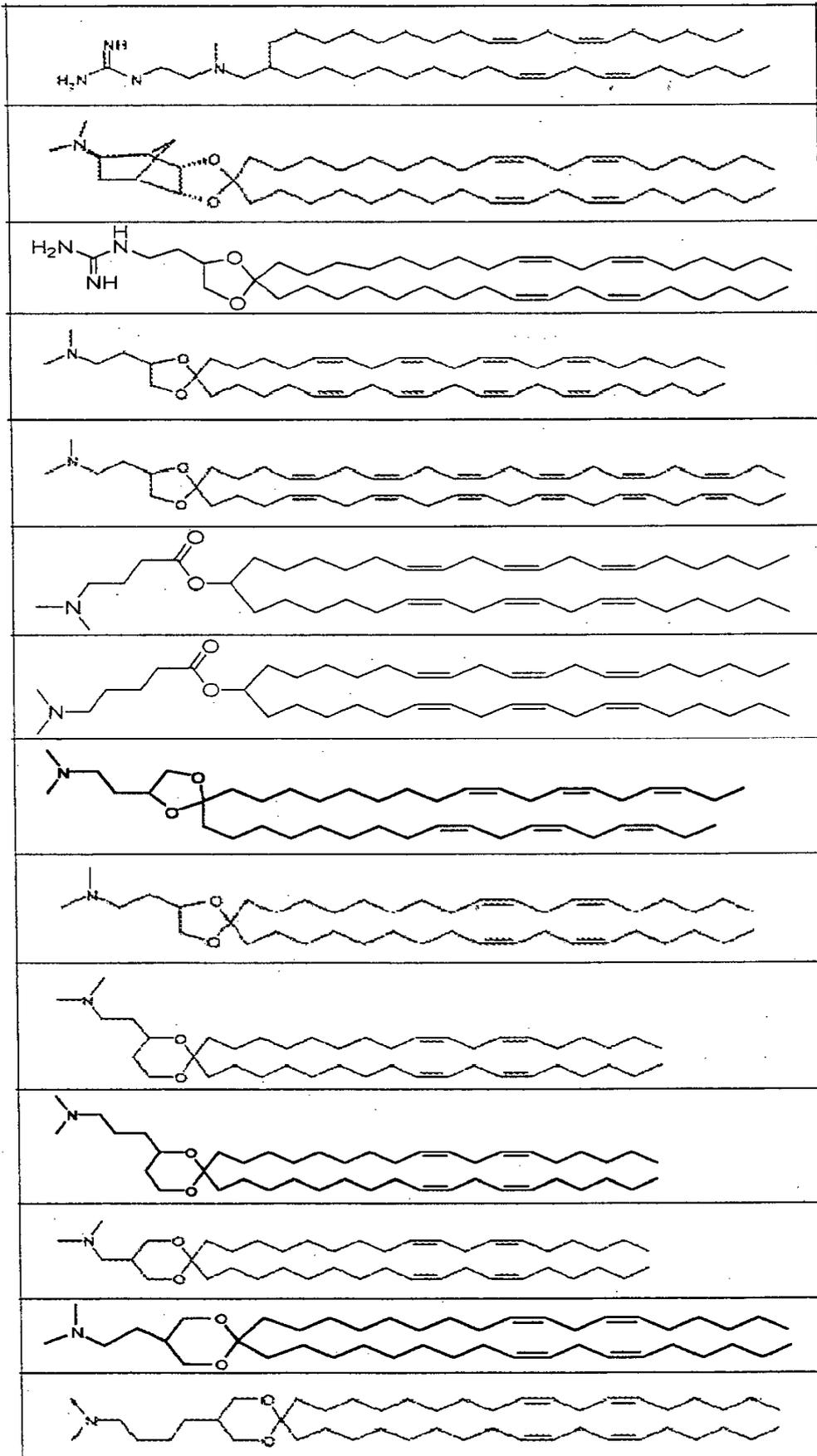
REIVINDICACIONES

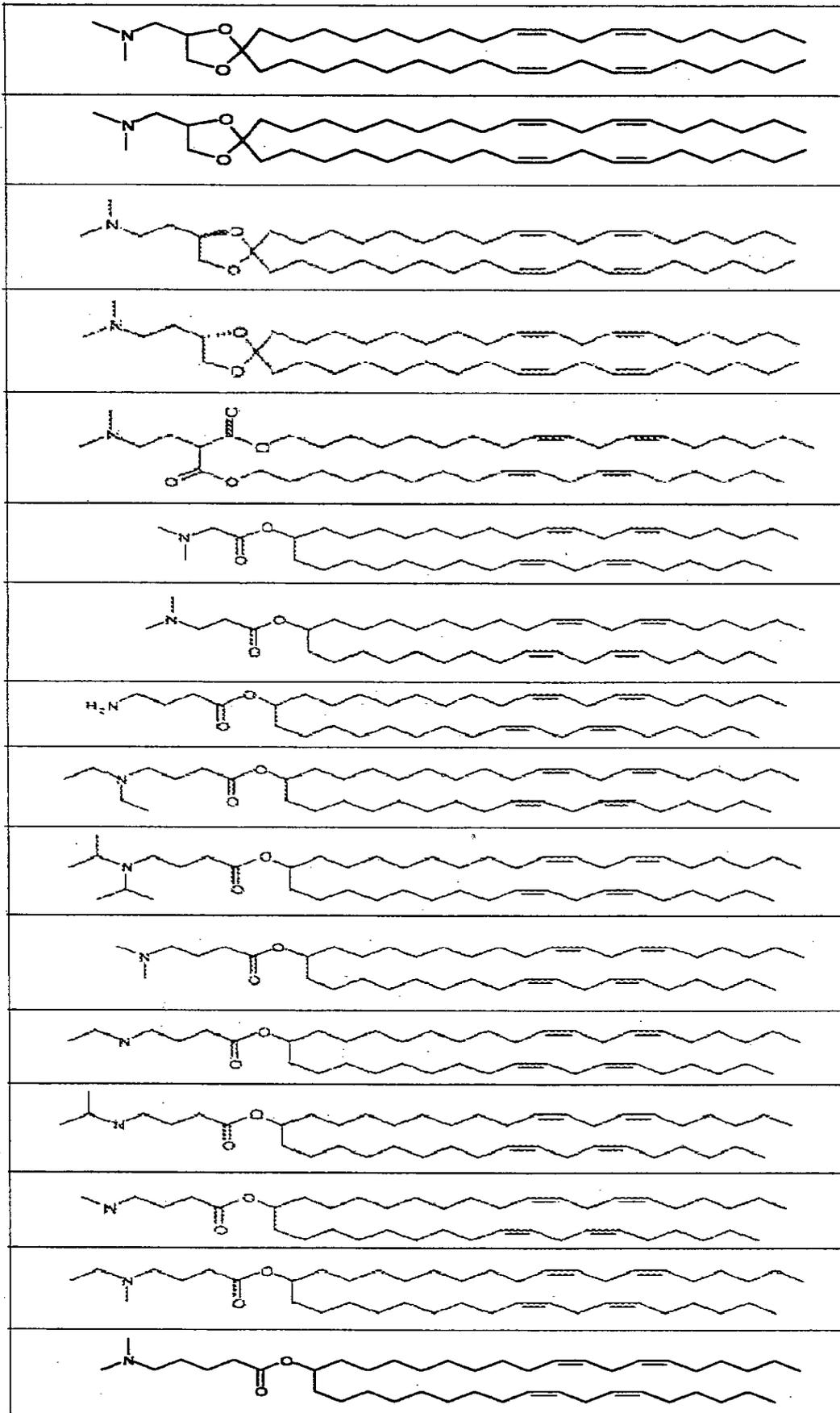
1. Una partícula de lípido que comprende un primer lípido catiónico, un segundo lípido catiónico, un lípido neutro, y un lípido PEG capaz de reducir la agregación; en donde el primer lípido catiónico y el segundo lípido catiónico son cada uno, independientemente, seleccionados de los siguientes lípidos, y versiones cuaternizadas de estos,

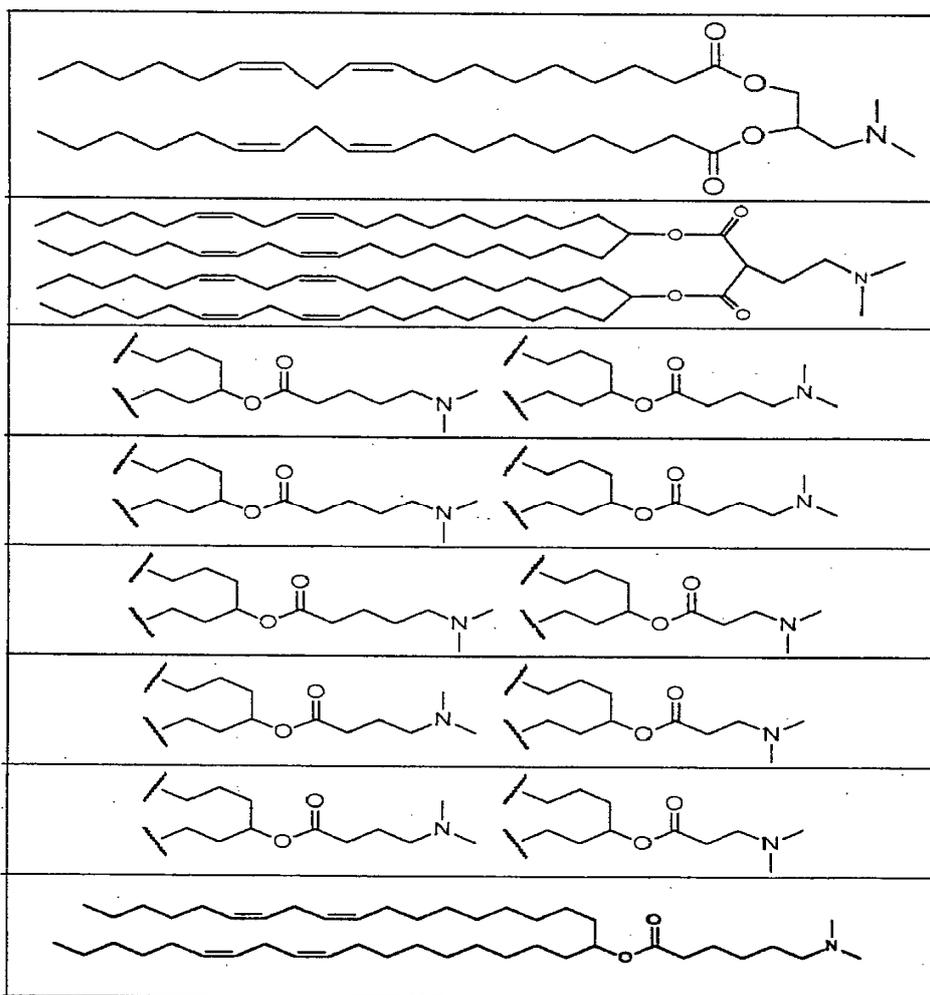












y donde el primer lípido catiónico y el segundo lípido catiónico tienen cada uno un pKa que difiere del pKa combinado en al menos 0,1 unidades pKa, al menos 0,2 unidades pKa, o al menos 0,3 unidades pKa.

- 5 **2.** La partícula de lípido de la reivindicación 1, donde el lípido neutro se selecciona de DSPC, DPPC, POPC, DOPE, o esfingomielina (SM); y la partícula de lípido comprende además un estero.
- 10 **3.** La partícula de lípido de la reivindicación 2, donde el primer lípido catiónico está presente en una relación molar de 0 % a 60 % y el segundo lípido catiónico está presente en una relación molar de 0 % a 60 %, siempre y cuando la relación molar de todos los lípidos catiónicos en la partícula sea entre 20 % y 60 %; el lípido neutro está presente en una relación molar de 5 % a 25 %; el estero está presente en una relación molar de 25 % a 55 %; y el lípido PEG es PEG-DMA, PEG-DMG, o una combinación de estos, y está presente en una relación molar de 0,5 % a 15 %.
- 4.** La partícula de lípido de la reivindicación 1, que comprende además un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulador, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.
- 15 **5.** Una composición farmacéutica que comprende una partícula de lípido de la reivindicación 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 **6.** La composición farmacéutica de la reivindicación 5 para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en un ARNip, un microARN, y un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNip, microARN, u oligonucleótido antisentido incluye un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido o un complemento de este.
- 7.** La composición farmacéutica de la reivindicación 5 para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se caracteriza por la subexpresión de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento de este.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 para usar para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador.

9. La partícula de lípido de la reivindicación 4 para usar en la modulación de la expresión de un gen objetivo en una célula.

- 5 **10.** La partícula de lípido para usar de la reivindicación 9, en donde el gen objetivo se selecciona del grupo que consiste en el Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen Ciclina A, gen Ciclina E, gen WNT-1, gen beta-catenina, gen c-MET, gen PKCe, gen NFkB, gen STAT3, gen survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen topoisomerasa I, gen topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27(KIP1), gen PPM1D, gen RAS, gen caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores de tumores, y gen supresor de tumor p53.
- 10

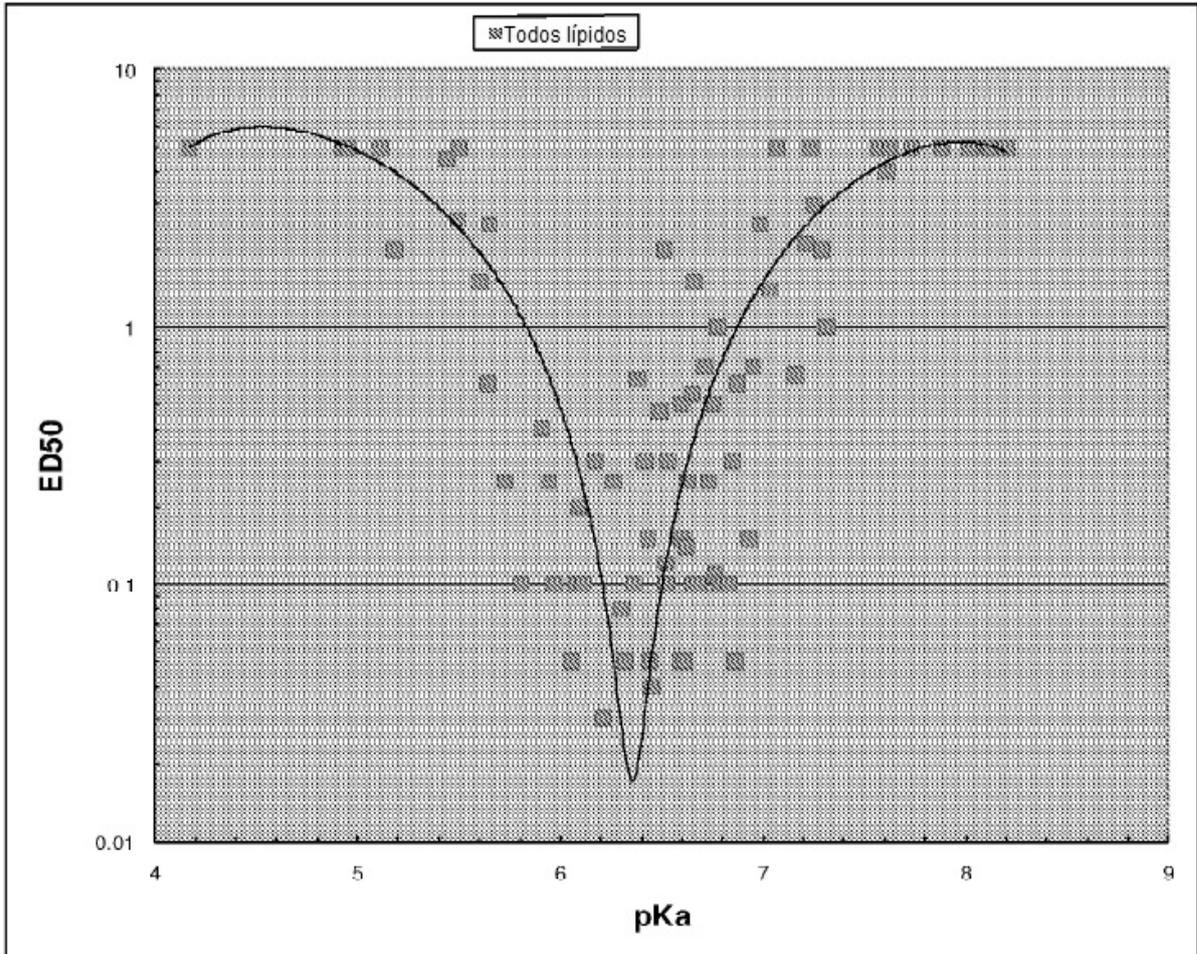


FIG. 1

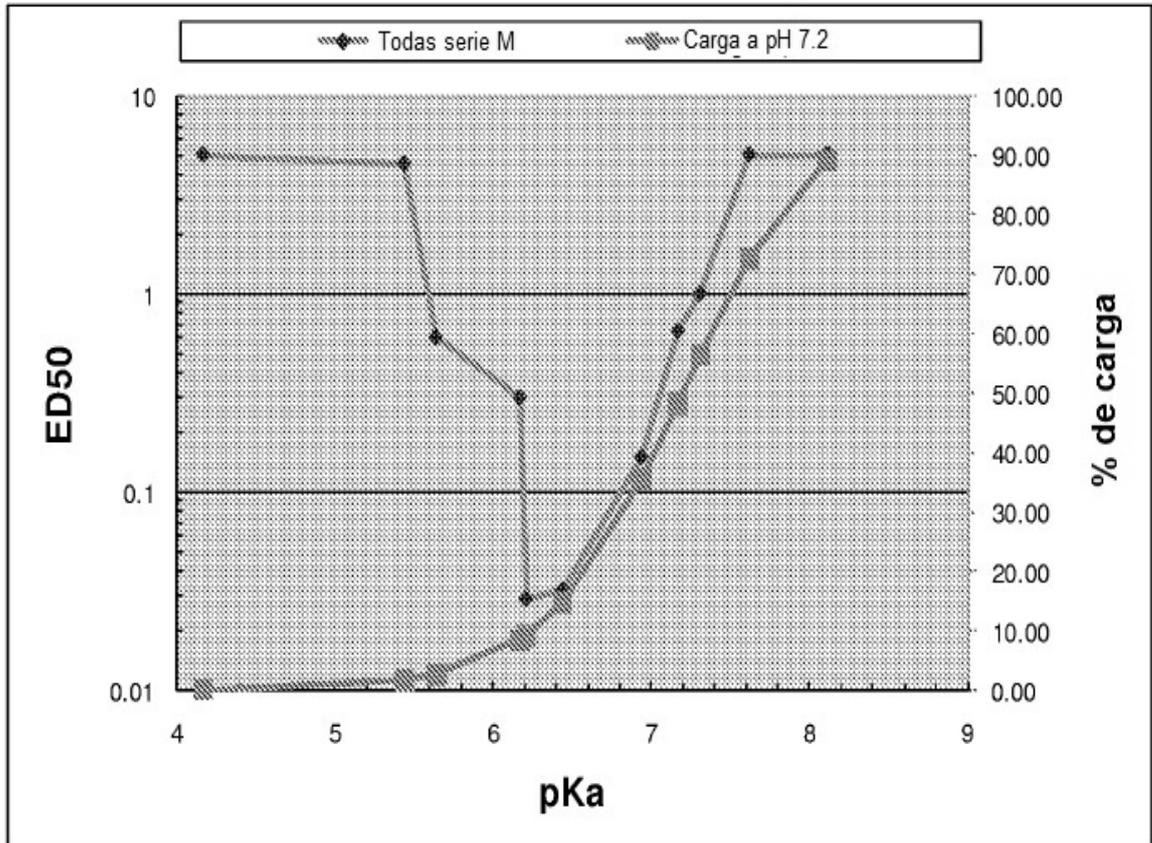


FIG. 2

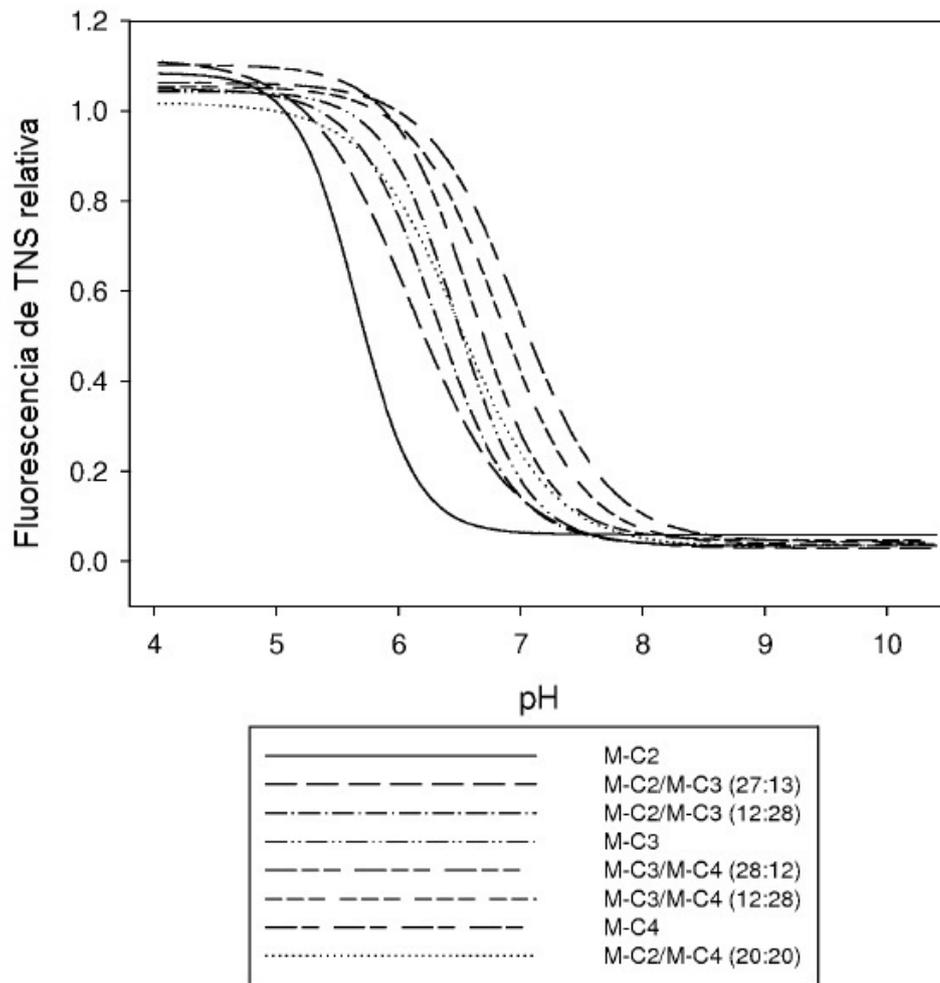
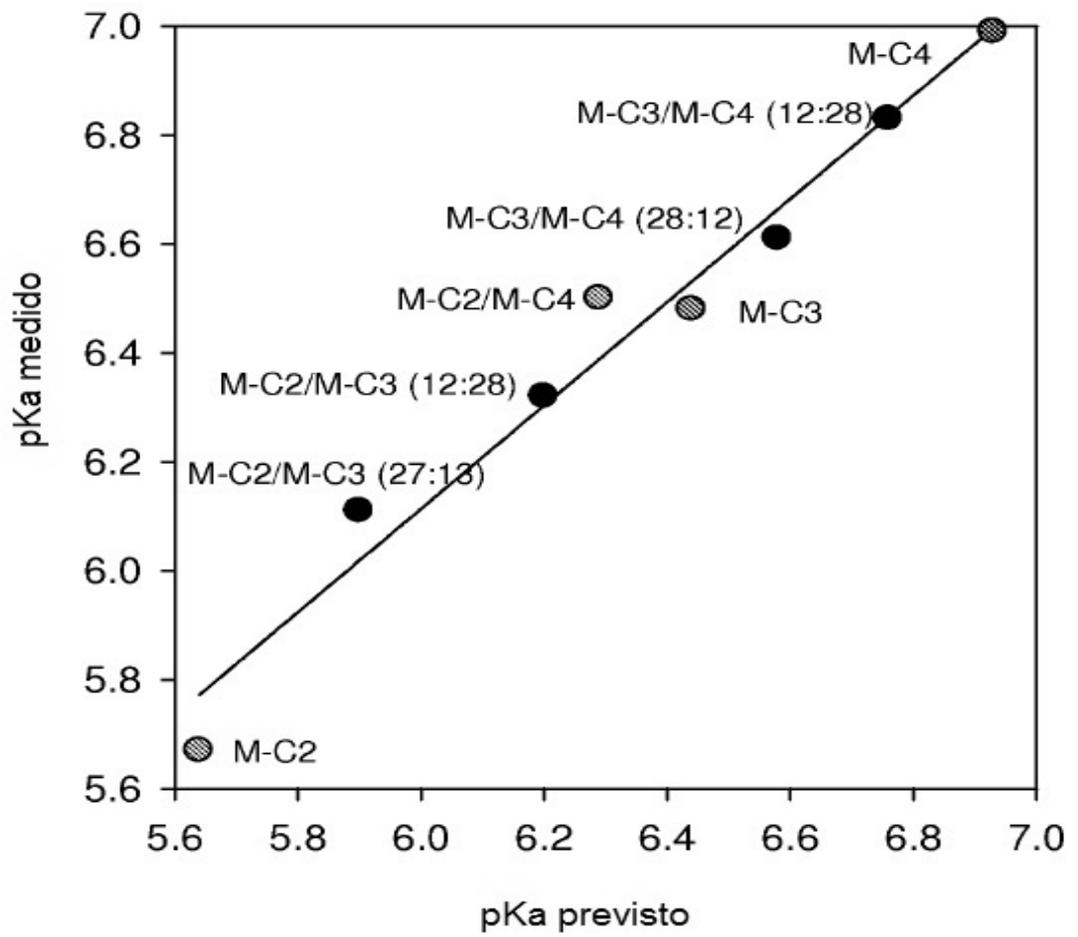


FIG. 3A

**FIG. 3B**

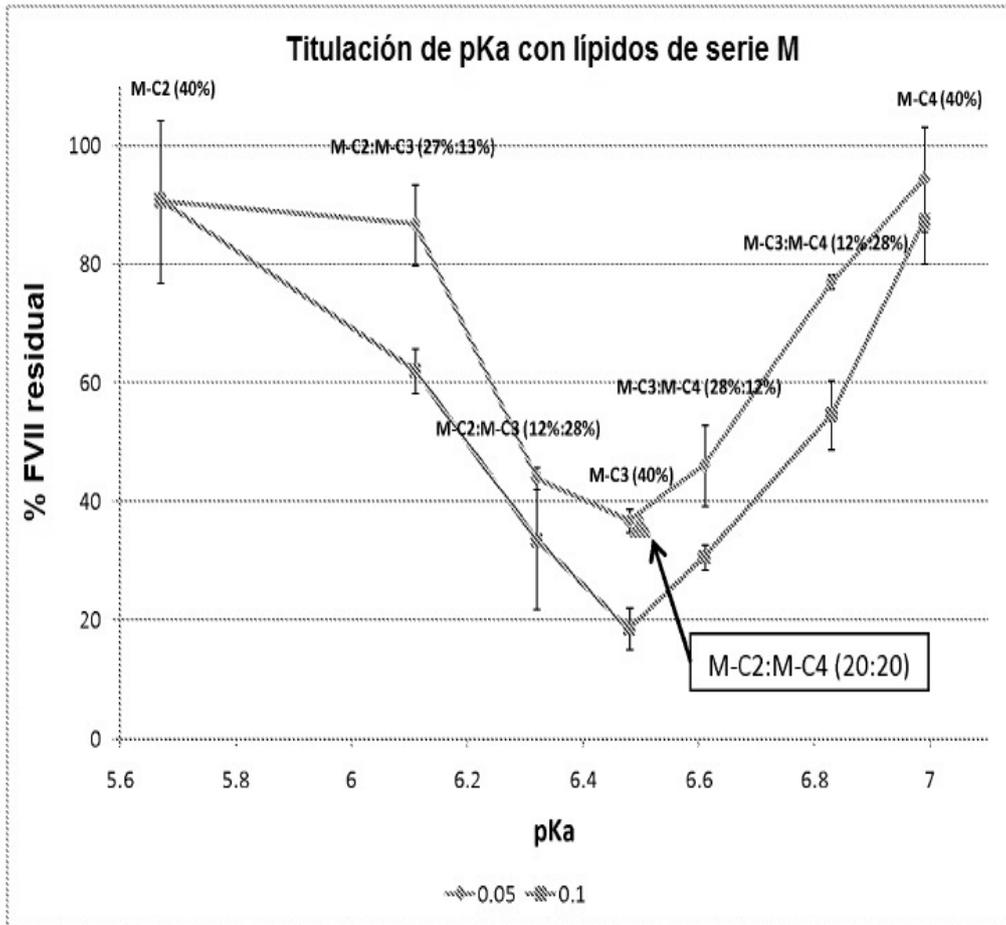


FIG. 4