

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 700**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54	(2007.01)
A61K 47/60	(2007.01)
A61P 1/16	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029372**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153163**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14770618 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 2968149**

54 Título: **Proceso para formular un agente aniónico**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361784810 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2024

73 Titular/es:

**DICERNA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
75 Hayden Avenue
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, BOB, DALE y
YING, BO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 981 700 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

Proceso para formular un agente aniónico

5 **Antecedentes de la invención**

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

Aunque recientemente se demostró que una serie de formulaciones basadas en lípidos efectúan el suministro intracelular de cargas útiles de ácidos nucleicos a al menos determinados tipos de células de mamíferos (por ejemplo, células hepáticas de mamíferos), las proporciones y métodos precisos para combinar lípidos, cargas útiles y otros componentes de tales formulaciones pueden influir en gran medida en la medida en que se logra el suministro satisfactorio de cargas útiles de ácidos nucleicos. En consecuencia, los cambios modestos en los procesos empleados para obtener tales formulaciones basadas en lípidos tienen el potencial de producir diferencias dramáticas y sorprendentes en la eficacia del suministro. Como tal, existe la necesidad de optimizar el proceso mediante el cual se obtienen formulaciones basadas en lípidos de cargas útiles de ácidos nucleicos (y, por extensión, agentes aniónicos más generalmente), lo que mejora de esta manera el suministro de tales agentes aniónicos terapéuticos a las células.

Resumen de la invención

La invención se refiere, al menos en parte, a métodos para formular agentes aniónicos, por ejemplo, agentes terapéuticos aniónicos tales como ácidos nucleicos. En aspectos particulares de la invención, se identificó un proceso para preparar una partícula que contiene lípidos que comprende un agente aniónico (por ejemplo, una carga útil de ácido nucleico), que implica combinar un complejo lipídico con el agente aniónico en condiciones en las que, debido al orden de adición de tales componentes, la concentración total de solvente lipídico de la solución mezclada aumenta o se mantiene estable con el tiempo, en lugar de disminuir, lo que resulta en una partícula formulada que posee homogeneidad estructural mejorada y eficacia mejorada del suministro intracelular del agente aniónico. (Aunque no se desea limitarse a la teoría, la homogeneidad estructural mejorada parece resultar de una reducción en la disolución del complejo lipídico durante el proceso de mezcla, en comparación con los procesos que producen una disminución en la concentración de solvente lipídico durante el proceso de mezcla del complejo lipídico y el agente aniónico). Sin desear limitarse a la teoría, al menos una ventaja de los métodos de la presente invención es que son más escalables que otros procesos, lo que permite la formulación/formación mejorada de partículas en cantidades suficientes para, por ejemplo, la realización de ensayos clínicos y/o venta comercial.

En otros aspectos de la invención, se proporcionan procesos que se basan en la observación sorprendente de que un límite de solubilidad relativamente bajo de un lípido o esteroles individual en un solvente (por ejemplo, etanol o alcohol o solución orgánica o mezcla de estos) puede elevarse efectivamente a temperatura ambiente mediante la mezcla de otro(s) lípido(s) y/o esteroles(es) juntos en un solvente (u, opcionalmente, simplemente en un aceite lipídico puro o una mezcla de aceites lipídicos) antes de adicionar esta mezcla de otro(s) lípido(s) y/o esteroles(es) en aceite o solvente al lípido o esteroles de solubilidad relativamente baja, opcionalmente, mediante la mezcla adicional de tal suspensión de lípido y/o esteroles en el solvente. Por ejemplo, mientras que el límite de solubilidad del colesterol en etanol a temperatura ambiente se observó que era de aproximadamente 10-11 mg/ml en ausencia de otros lípidos y/o esteroles, se descubrió inesperadamente que una mezcla previa de lípidos adicionales como se describió en la presente descripción en etanol antes de la adición de tal suspensión lipídica en etanol al colesterol (como un polvo) a temperatura ambiente permitió que se lograran niveles de colesterol de 20 mg/ml o más en la solución, mientras que el contenido total de lípidos de tales soluciones también podía elevarse a 37 mg/ml, 74 mg/ml, o niveles aún más alto. Por lo tanto, se proporciona un proceso para aumentar la cantidad de un lípido original, esteroles y/o mezcla de lípido(s) y/o esteroles(es) que pueden solubilizarse en un solvente (por ejemplo, un solvente alcohólico, por ejemplo, etanol) mediante la mezcla previa de otro lípido(s), esteroles(es) y/o mezcla de lípido(s) y/o esteroles(es), como aceites, polvos y/o en solvente(s), antes de adicionar tal premezcla al lípido, esteroles y/o mezcla de lípido(s) original de solubilidad limitada, lo que eleva de esta manera efectivamente el límite de solubilidad del lípido original en el solvente. En determinadas modalidades relacionadas, la invención proporciona un proceso para fabricar una partícula que implica mezclar previamente concentraciones elevadas de componentes lipídicos y/o esteroles como aceites, polvos y/o en solvente (por ejemplo, etanol), adicionar esta mezcla a un lípido y/o esteroles que posee una solubilidad relativamente baja en el solvente en ausencia de tal(es) lípido(s) y/o esteroles(es) premezclados, y combinar esta mezcla con soluciones acuosas o suspensiones que contienen agentes aniónicos (opcionalmente, tales agentes aniónicos forman complejos con el lípido antes de tal adición de lípidos suspendidos en solvente). Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la capacidad recién descubierta para proporcionar soluciones de alta concentración de lípidos/esteroles a tales concentraciones

elevadas mejora la homogeneidad de una población de partículas de agente lipídico-aniónico, en comparación con las concentraciones a las que tales lípidos/esteroles se usan rutinariamente dentro del proceso de formulación de partículas.

5 En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una partícula que porta un agente aniónico que implica (a) combinar un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico con un lípido catiónico en una solución acuosa ácida, en una cantidad suficiente para que se forme un complejo en donde el lípido modificado es un polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida, o gangliósido-lípido modificado; (b) combinar este complejo con un agente aniónico; (c) combinar el complejo-agente aniónico con una
10 solución acuosa neutra para formar una suspensión acuosa de complejo-agente aniónico, en donde la solución acuosa neutra es agua; (d) formar una solución o suspensión que incluye al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en un lípido neutro, un esteroles, un lípido catiónico y un lípido modificado como se definió anteriormente que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico; y (e) combinar esta
15 solución o suspensión con la solución acuosa de complejo-agente aniónico de la etapa anterior mediante un método que implica adicionar la solución o suspensión a la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico o mezclar en línea la solución o suspensión y la solución acuosa de complejo-agente aniónico.

En determinadas modalidades, la solución acuosa ácida incluye HCl. Opcionalmente, la solución acuosa ácida posee un pH de menos de 4, por ejemplo, 2,3. En modalidades relacionadas, la solución acuosa ácida es de HCl a aproximadamente 60 mM.

En una modalidad, el lípido catiónico que está presente en la solución acuosa ácida posee un grupo protonable. Opcionalmente, este lípido catiónico tiene una pKa de 4 a 11. En determinadas modalidades, este lípido catiónico es DODMA, DOTMA, o un lípido catiónico de la Tabla 1.

En determinadas modalidades, el lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico es un lípido-PEG, opcionalmente DMPE-PEG, DSPE-PEG o DSG-PEG. En modalidades relacionadas, el PEG es PEG2k.

30 En algunas modalidades, el complejo lípido catiónico-lípido modificado tiene entre 60 y 75 nm de diámetro.

En determinadas modalidades, el agente aniónico es un agente polianiónico. En modalidades relacionadas, el agente aniónico es un ácido nucleico. Opcionalmente, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico de doble hebra. En determinadas modalidades, el ácido nucleico de doble hebra es un ARN en horquilla pequeño (ARNhp) o un ARNip. En una modalidad relacionada, el ácido nucleico de doble hebra es un sustrato para Dicer humano y es opcionalmente un ARNipD.

En determinadas modalidades, la formación de una solución o suspensión que incluye al menos un lípido neutro, esteroles, lípido catiónico o lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico implica la disolución en etanol del al menos un lípido. Opcionalmente, esta formación de una solución o suspensión implica disolver el lípido o esteroles en etanol al 100 %. En modalidades relacionadas el lípido neutro es DSPC, DPPC o DOPC. En determinadas modalidades, el esteroles es colesterol. Opcionalmente, el lípido catiónico se selecciona de la Tabla 1.

45 En determinadas modalidades, la partícula que porta un agente aniónico tiene entre 90 y 110 nm de diámetro.

En una modalidad, la partícula que porta un agente aniónico se fabrica a una escala de 10 mg o más de agente aniónico, 50 mg o más de agente aniónico, 100 mg o más de agente aniónico, 250 mg o más de agente aniónico, 500 mg o más de agente aniónico, 1 g o más de agente aniónico, 2 g o más de agente aniónico, 3 g o más de agente aniónico, 4 g o más de agente aniónico, 5 g o más de agente aniónico, 7,5 g o más de agente aniónico, 10 g o más de agente aniónico, 20 g o más de agente aniónico, 40 g o más de agente aniónico, 50 g o más de agente aniónico, 100 g o más de agente aniónico, 200 g o más de agente aniónico, 300 g o más de agente aniónico, 400 g o más de agente aniónico, 500 g o más de agente aniónico, 1 kg o más de agente aniónico, 2 kg o más de agente aniónico, 3 kg o más de agente aniónico, 4 kg o más de agente aniónico, 5 kg o más de agente aniónico o 10 kg o más de agente aniónico.

En otra modalidad, la partícula que porta un agente aniónico posee una o más de las siguientes propiedades: PDI y/o tamaño mejorado, eficacia mejorada en un sujeto al que se le administró la partícula o tolerabilidad mejorada en un sujeto al que se administró la partícula, en comparación con una partícula de control apropiada formada por un proceso de control apropiado que implica adicionar la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico a la suspensión o solución a base de solvente.

En una modalidad adicional, el método implica, además, combinar la partícula que porta un agente aniónico con un volumen de agua suficiente para reducir la concentración de etanol dentro de la solución combinada al 10 % o menos.

65

En otra modalidad, el método también implica realizar uno de los siguientes procesos: filtración de flujo tangencial (TFF) o diálisis a la solución combinada. Opcionalmente, la solución combinada se dializa contra PBS.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir una partícula que porta un agente aniónico que implica combinar en una solución acuosa ácida un lípido modificado como se definió anteriormente lo que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico con un lípido catiónico, en una cantidad suficiente para que se forme un complejo; combinar este complejo con un agente aniónico; combinar este complejo-agente aniónico con una solución acuosa neutra que es agua para formar una suspensión acuosa de complejo-agente aniónico; formar una solución o suspensión que tiene al menos uno de un lípido neutro, un esteroil, un lípido catiónico o un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico; y adicionar esta solución o suspensión a la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico.

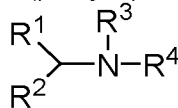
Como se indicó anteriormente, se descubrió que una mezcla previa de lípidos en etanol antes de la adición de tal suspensión lipídica en etanol al colesterol (como un polvo) a temperatura ambiente puede permitir que se logre un nivel de esteroil más alto. Tal protocolo puede por lo tanto preferirse para preparar la solución o suspensión adicionada a la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico como se describe adicionalmente en el Ejemplo 3.

Otros esteroides que pueden emplearse de esta manera incluyen colestanoil, colestenoil, coprostanol, 3β -[(N-(N', N'-dimetilamino)etano)-carbamoil] colesterol (DC-colesterol) o bis-guanidilo-tren-colesterol (BGTC).

La mezcla previa de lípidos en etanol (la segunda solución lipídica en el solvente elegido) puede incluir uno o más lípidos de las Tablas 1-4.

En otra modalidad, la partícula posee al menos una de las siguientes propiedades: PDI y/o tamaño mejorado, eficacia mejorada en un sujeto al que se le administró la partícula o tolerabilidad mejorada y/o toxicidad reducida en un sujeto al que se administró la partícula, en comparación con una partícula de control apropiada formada por un proceso de control apropiado que implica exponer el primer lípido o esteroil al solvente antes de que el segundo lípido o esteroil se exponga al solvente.

En un aspecto, la invención presenta un compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) que tiene la fórmula:



(I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R^1 y R^2 es, independientemente, alquilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, alquenoil C_{11-24} opcionalmente sustituido, alquinoil C_{11-24} opcionalmente sustituido, heteroalquilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenoil C_{11-24} opcionalmente sustituido, o heteroalquinoil C_{11-24} opcionalmente sustituido, donde R^1 y R^2 no se sustituyen con un oxo en el carbono adyacente a $>CHNR^3R^4$; R^3 es H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido; y R^4 es alquilo C_{1-6} no sustituido que se sustituye con $-NR^{4a}R^{4b}$, alquilo C_{1-6} sustituido que se sustituye, además, con $-NR^{4a}R^{4b}$, o heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido, donde cada R^{4a} y R^{4b} es, independientemente, H, $C(=NH)NH_2$, o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, o donde R^{4a} y R^{4b} se combinan juntos para formar heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido; y donde R^3 y R^4 pueden combinarse juntos para formar un heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido; donde R^3 y R^4 no se combinan juntos para formar imidazolilo opcionalmente sustituido u bencimidazolilo opcionalmente sustituido o succinimidilo opcionalmente sustituido; donde una, y solo una, amina primaria puede estar presente ya sea en R^3 o R^4 o ninguna amina primaria está presente ya sea en R^3 o R^4 ; y donde ni R^3 ni R^4 es una amida opcionalmente sustituida; y donde cuando R^1 o R^2 es alquilo C_{11} saturado o alquilo C_{15} saturado, R^3 no es H; donde cuando R^1 o R^2 es alquilo C_{16} saturado o alquilo C_{17} saturado, R^1 y R^2 no se sustituyen por hidroxilo; donde cuando R^1 o R^2 es alquilo C_{17} saturado, R^3 o R^4 no se sustituye por hidroxilo; y donde cuando R^1 o R^2 es alquilo C_{18} saturado, R^4 no se sustituye por imidazolilo opcionalmente sustituido.

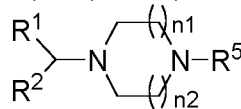
En algunas modalidades, R^3 es alquilo C_{1-6} sustituido con $-NR^{3a}R^{3b}$ y donde cada R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido. En modalidades particulares, cada R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H o alquilo C_{1-6} .

En algunas modalidades, R^4 es alquilo C_{1-6} no sustituido que se sustituye con $-NR^{4a}R^{4b}$. En modalidades particulares, R^4 es alquilo C_{1-6} sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-3} sustituido, alquilo C_{1-2} sustituido, alquilo C_1 sustituido, alquilo C_2 sustituido o alquilo C_3 sustituido) o aminoalquilo C_{1-6} que se sustituye, además, con $-NR^{4a}R^{4b}$. En algunas modalidades, R^4 es alquilo C_{1-6} sustituido con un oxo y se sustituye, además, con $-NR^{4a}R^{4b}$. En algunas modalidades, R^{4a} y R^{4b} se combinan juntos para formar un heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido (por ejemplo, pirrolidinilo opcionalmente sustituido, imidazolidinilo opcionalmente sustituido, pirazolidinilo opcionalmente sustituido, piperidinilo opcionalmente sustituido, piperazinilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido, pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, o pirazolilo opcionalmente sustituido). En algunas modalidades, cada R^{4a} y R^{4b} es, independientemente, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido. En algunas modalidades, R^4 es alquilo C_{1-6} no sustituido que se sustituye con heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido (por ejemplo, cualquiera descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, R^4 es alquilo C_{1-6} sustituido (por ejemplo, con un oxo) o un aminoalquilo C_{1-6} que se sustituye, además, con heterociclilo C_{3-7} opcionalmente sustituido (por ejemplo, pirrolidinilo opcionalmente

sustituido, imidazolidinilo opcionalmente sustituido, pirazolidinilo opcionalmente sustituido, piperidinilo opcionalmente sustituido, piperazinilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido, pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido, o piridazinilo opcionalmente sustituido).

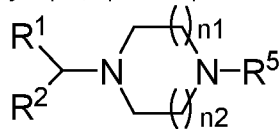
5 En algunas modalidades, R³ y R⁴ se combinan juntos para formar un heterociclilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido (por ejemplo, pirrolidinilo opcionalmente sustituido, imidazolidinilo opcionalmente sustituido, pirazolidinilo opcionalmente sustituido, piperidinilo opcionalmente sustituido, piperazinilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido, pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido, o piridazinilo opcionalmente sustituido).

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



15 (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; cada n₁ y n₂ es, independientemente, un número entero de 0 a 2 (por ejemplo, n₁ y n₂ ambos son 1 o n₁ es 1 y n₂ es 2); y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆ no sustituido o alquilo C₁₋₆ sustituido con pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido, o piridazinilo opcionalmente sustituido). En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-2, L-5, L-6, L-22, L-23, L-24, L-25, L-26, L-28, L-29, L-45, y L-48, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

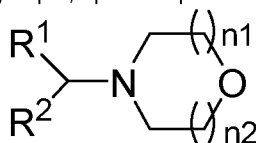
En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



30 (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; cada n₁ y n₂ es, independientemente, un número entero de 0 a 2 (por ejemplo, n₁ y n₂ ambos son 1 o n₁ es 1 y n₂ es 2); y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆ no sustituido o alquilo C₁₋₆ sustituido con pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido, o piridazinilo opcionalmente sustituido). En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-27 y L-47, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

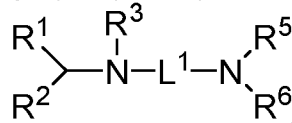
40 En algunas modalidades para cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, las fórmulas (I), (IIa), y (IIb)), R⁵ es alquilo C₁₋₆ sustituido con NR^{5a}R^{5b}, donde cada R^{5a} y R^{5b} es, independientemente, H, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido), y donde R^{5a} y R^{5b} pueden combinarse juntos para formar heterociclilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido. En algunas modalidades, R⁵ es heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, pirrolidinilo opcionalmente sustituido, imidazolidinilo opcionalmente sustituido, pirazolidinilo opcionalmente sustituido, piperidinilo opcionalmente sustituido, piperazinilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido, pirrolilo opcionalmente sustituido, imidazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido, o piridazinilo opcionalmente sustituido).

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



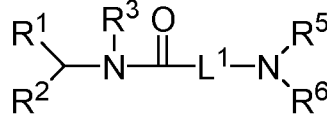
50 (IIc), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; y cada n₁ y n₂ es, independientemente, un entero de 0 a 2 (por ejemplo, n₁ y n₂ son ambos 1 o n₁ es 1 y n₂ es 2). En algunas modalidades, el compuesto es L-46, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



(IId), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, u heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; L¹ es alquileo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y cada R⁵ y R⁶ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o donde R⁵ y R⁶ se combinan para formar un heterociclilo de C₃₋₇ opcionalmente sustituido.

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:

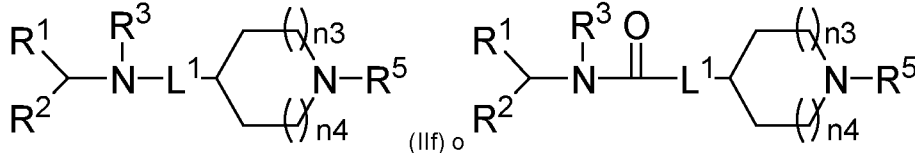


(IIe), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; L¹ es alquileo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y cada R⁵ y R⁶ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o donde R⁵ y R⁶ se combinan para formar un heterociclilo de C₃₋₇ opcionalmente sustituido.

En algunas modalidades de fórmulas (IIe) o (IIe), R⁵ y R⁶ se combinan para formar pirrolidinilo opcionalmente sustituido, imidazolidinilo opcionalmente sustituido, pirazolidinilo opcionalmente sustituido, piperidinilo opcionalmente sustituido, piperazinilo opcionalmente sustituido, o azepanilo opcionalmente sustituido.

En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-1, L-3, L-4, L-7, L-9, L-10, L-11, L-12, L-15, L-16, L-17, L-18, L-19, L-30, L-31, L-32, L-33, L-34, L-42, L-43, y L-49, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



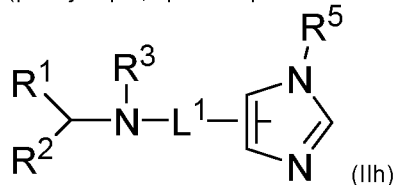
(IIg), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; L¹ es alquileo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; cada n₃ y n₄ es, independientemente, un número entero de 0 a 2; y R⁵ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-14, L-21, y L-36, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (IIe)-(IIj)), por ejemplo, fórmulas (IIe)-(IIg)), R³ es alquilo C₁₋₆ sustituido con -NR^{3a}R^{3b} y donde cada R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido. En algunas modalidades, R³ es alquilo C₁₋₆ no sustituido.

En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (IIe)-(IIj)), por ejemplo, fórmulas (IIe)-(IIg)), L¹ es alquileo C₁₋₆ sustituido con metilo, etilo, propilo, o -NR^{La}R^{Lb}, donde cada R^{La} y R^{Lb} es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



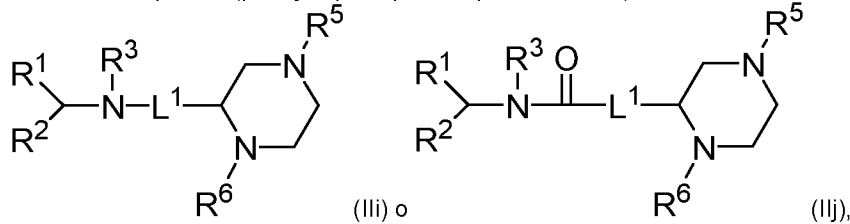
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido,

heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalqueno C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, u heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; L¹ es alqueno C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y R⁵ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

5 En algunas modalidades, L¹ se enlaza al grupo imidazolilo en la posición 4.

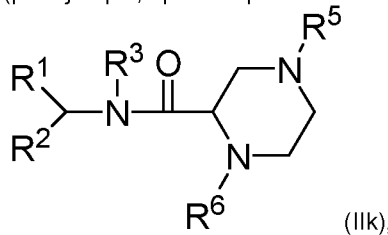
En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-8, L-13, L-20, L-35, y L-44, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

10 En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalqueno C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, u heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; L¹ es alqueno C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y cada R⁵ y R⁶ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

15 En algunas modalidades, el compuesto (por ejemplo, lípido o lípido catiónico) tiene la fórmula:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, heteroalqueno C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido, u heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido; R³ es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y cada R⁵ y R⁶ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

25 En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (Iid)-(Iik), por ejemplo, fórmulas (Iii)-(Iik)), cada R⁵ y R⁶ es, independientemente, alquilo C₁₋₆ sustituido con -NR^{5a}R^{5b} y donde cada R^{5a} y R^{5b} es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente.

30 En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-37, L-38, L-39, L-40, y L-41, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (Iid)-(Iik)), L¹ es alqueno C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

35 En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (I) o (IIa)-(Iik)), R³ es alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido. En algunas modalidades, cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₁₋₂₄ no sustituido o heteroalqueno C₁₁₋₂₄ no sustituido, que incluye formas lineales y ramificadas (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₁₋₂₄ no sustituido o heteroalqueno C₁₁₋₂₄ no sustituido que contiene uno o más dobles enlaces). En algunas modalidades, uno de R¹ o R² no es alquilo C₁₁₋₂₄ saturado. En algunas modalidades, tanto R¹ como R² no son alquilo C₁₁₋₂₄ saturado. En algunas modalidades, cada R¹ y R², independientemente, se selecciona del grupo que consiste en linolenilo (C18:3), linoleniloxi (C18:3), linoleoilo (C18:3), linoleilo (C18:2), linoleiloxi (C18:2), linoleoilo (C18:2), oleilo (C18:1), oleiloxi (18:1), oleiloximetileno (18:1), oleoilo (C18:1), oleoilmetileno (C18:1), estearilo (C18:0), esteariloxi (C18:0), estearoilo (C18:0), palmitilo (C16:0), palmitiloxi (C16:0), palmitoilo (C16:0), palmitoilmetileno (C16:0), miristilo (C14:0), miristiloxi (C14:0), miristoilo (C14:0), laurilo (C12:0), lauriloxi (C12:0), y lauroilo (C12:0), por ejemplo, linoleilo (C18:2) u oleilo (C18:1). En algunas modalidades, R¹ y R² son iguales o diferentes.

50 En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, fórmulas (I) o (IIa)-(Iik)), R³ o R⁴, pero no ambos R³ y R⁴, se sustituye con una amina primaria. En algunas modalidades, tanto R³ como R⁴ no se sustituyen con una amina primaria.

- 5 En algunas modalidades de cualquier fórmula descrita en la presente descripción (por ejemplo, las fórmulas (I) o (IIa)-(IIk)), R^3 y R^4 , junto con el N al que se unen, incluyen un grupo cabeza de uno de H-1 a H-52 de las Tablas 2 y 3. En algunas modalidades, cada R^1 y R^2 , independientemente, se selecciona del grupo que consiste en linolenilo (C18:3), linoleniloxi (C18:3), linolenoilo (C18:3), linoleilo (C18:2), linoleiloxi (C18:2), linoleoilo (C18:2), oleilo (C18:1), oleiloxi (18:1), oleiloximetileno (18:1), oleoilo (C18:1), oleoilmetileno (C18:1), estearilo (C18:0), esteariloxi (C18:0), estearoilo (C18:0), palmitilo (C16:0), palmitiloxi (C16:0), palmitoilo (C16:0), palmitoilmetileno (C16:0), miristilo (C14:0), miristiloxi (C14:0), miristoilo (C14:0), laurilo (C12:0), lauriloxi (C12:0), y lauroilo (C12:0), por ejemplo, cada R^1 y R^2 es, independientemente, linoleilo (C18:2) u oleilo (C18:1).
- 10 En otro aspecto, el compuesto de la invención incluye R^1R^2 -CH-A, donde R^1 y R^2 son un grupo cola (por ejemplo, cualquiera descrito en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 4) y A es un grupo cabeza (por ejemplo, cualquiera descrito en la presente descripción, por ejemplo, en las Tablas 2 y 3). En algunas modalidades, el grupo cabeza es uno de H-1 a H-52, por ejemplo, H-2, H-5, H-6, H-19, H-26, o H-43 (por ejemplo, H-5 o H-43).
- 15 En otro aspecto, el compuesto de la invención es cualquier compuesto proporcionado en la Tabla 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
- 20 En un aspecto, la invención presenta una formulación que incluye cualquier compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
- 25 En algunas modalidades, la formulación incluye dos o más de los compuestos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más de los compuestos.
- 30 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen dos grupos cola lipídicos insaturados (por ejemplo, cada R^1 y R^2 es, independientemente, alquenilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, u heteroalquinilo C_{11-24} opcionalmente sustituido).
- 35 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen grupos cola lipídicos, donde estos grupos no incluyen un oxígeno adyacente a $-CHR^3R^4$ (por ejemplo, cada R^1 y R^2 son, independientemente, alquilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{11-24} opcionalmente sustituido, o alquinilo C_{11-24} opcionalmente sustituido).
- 40 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen dos grupos cola lipídicos que tienen más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 18 carbonos (por ejemplo, cada R^1 y R^2 son, independientemente, alquenilo C_{17-24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{15-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C_{15-24} opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C_{15-24} opcionalmente sustituido; cada R^1 y R^2 son, independientemente, alquenilo C_{16-24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{16-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C_{16-24} opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C_{16-24} opcionalmente sustituido; cada R^1 y R^2 son, independientemente, alquenilo C_{17-24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{17-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C_{17-24} opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C_{17-24} opcionalmente sustituido; o cada R^1 y R^2 son, independientemente, alquenilo C_{18-24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{18-24} opcionalmente sustituido, heteroalquenilo C_{18-24} opcionalmente sustituido, o heteroalquinilo C_{18-24} opcionalmente sustituido).
- 45 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención no contienen un grupo urea (por ejemplo, ni R^3 ni R^4 son una amida opcionalmente sustituida). En algunas modalidades, los compuestos no contienen un grupo carbamilo. En algunas modalidades, los compuestos no contienen más de un grupo de amina primaria (por ejemplo, no contienen dos grupos de amina primarias o no contienen ningún grupo de amina primaria en uno o más de R^1 - R^6 , por ejemplo, en R^3 o R^4). En modalidades particulares, los compuestos incluyen solo una amina primaria o ninguna amina primaria (por ejemplo, solo una amina primaria o ninguna amina primaria están presentes en uno o más de R^1 - R^6 , por ejemplo, ya sea R^3 o R^4).
- 50 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención no contienen un grupo hidroxilo (por ejemplo, ni R^1 ni R^2 se sustituyen con uno, dos, o tres grupos hidroxilo; o ni R^3 ni R^4 se sustituyen con uno, dos, o tres grupos hidroxilo). En algunas modalidades, cuando R^1 o R^2 es un grupo alquilo C_{11-24} saturado (por ejemplo, un alquilo C_{15} saturado, un alquilo C_{16} saturado, un alquilo C_{17} saturado, o un alquilo C_{18} saturado), R^1 y/o R^2 no se sustituye con uno, dos, o tres grupos hidroxilo. En algunas modalidades, cuando R^1 o R^2 es un grupo alquilo C_{11-24} saturado (por ejemplo, un alquilo C_{15} saturado, un alquilo C_{16} saturado, un alquilo C_{17} saturado, o un alquilo C_{18} saturado), R^3 y/o R^4 no se sustituye con uno, dos, o tres grupos hidroxilo.
- 55 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen no más de dos grupos amida (por ejemplo, no más de dos o un grupo amida en el grupo cabeza del compuesto). En otras modalidades, los compuestos

incluyen cero, uno, o dos grupos amida en uno o más de R¹-R⁶ (por ejemplo, cero, uno, o dos grupos amida en R³ o R⁴). Aún en otras modalidades, los compuestos pueden incluir uno, y solo uno, grupo amida (por ejemplo, puede incluir uno, y solo uno, grupos amida en R³ o R⁴). En modalidades adicionales, los compuestos incluyen uno, y solo uno, grupo amida o ningún grupo amida (por ejemplo, incluyen uno, y solo uno, grupo amida o ningún grupo amida en R³ o R⁴).

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

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

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

En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención tienen un valor de pKa menor que 6,2 y más de 6,5 (por ejemplo, un valor de pKa entre 4,0 y 6,2, tal como entre 4,0 y 5,2, entre 4,0 y 5,6, o entre 4,0 y 5,8; o entre 6,5 y 8,5, por ejemplo, entre 6,5 y 7,0, entre 6,5 y 7,5, o entre 6,5 y 8,0). En modalidades particulares, el valor de pKa está entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0 (por ejemplo, entre 5,0 y 5,5, entre 5,0 y 5,6, entre 5,0 y 5,7, entre 5,0 y 5,8, entre 5,0 y 5,9, entre 5,0 y 6,0, entre 5,2 y 5,5, entre 5,2 y 5,6, entre 5,2 y 5,7, entre 5,2 y 5,8, entre 5,2 y 5,9, entre 5,2 y 6,0, entre 5,4 y 5,5, entre 5,4 y 5,6, entre 5,4 y 5,7, entre 5,4 y 5,8, entre 5,4 y 5,9, entre 5,4 y 6,0, entre 5,6 y 5,7, entre 5,6 y 5,8, entre 5,6 y 5,9, o entre 5,6 y 6,0). El valor de pKa puede determinarse mediante cualquier método útil, por ejemplo, mediante la medición de fluorescencia del ácido 2-(*p*-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS), mediciones de potencial zeta, etc. En modalidades particulares, el valor de pKa es la relación de la concentración del lípido catiónico cargado y la concentración del lípido no cargado (por ejemplo, medido mediante titulación de fluorescencia de TNS in situ, donde la pKa se define como el pH a intensidad de fluorescencia media máxima).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra un proceso de fabricación ilustrativo para una partícula que comprende un agente aniónico de la presente invención. El rendimiento del proceso implica combinar inicialmente un complejo lipídico suspendido en una solución acuosa ácida (aquí, HCl 60 mM a pH 2,3) y un agente aniónico (aquí, ARN disuelto en agua), diluir tal solución con agua, después adicionar una solución lipídica disuelta en un solvente (aquí, etanol) a la mezcla de complejo-agente aniónico, para producir de esta manera partículas que comprenden el agente aniónico. Las partículas así formadas se diluyen entonces en un volumen adicional de agua y se someten opcionalmente después a filtración (en la presente, filtración de flujo tangencial (TFF)) para eliminar el solvente y concentrar las partículas antes del uso.

La Figura 2 muestra los resultados de dimensionamiento para las partículas formuladas mediante tres métodos distintos: partículas formuladas mediante un proceso que implicó adicionar complejos acuosos de lípido-ARNipD en lípidos adicionales disueltos en etanol ("proceso 2072", variación 1, panel superior); partículas formuladas mediante un proceso que implicó adicionar lípidos adicionales disueltos en etanol en complejos acuosos de lípido-ARNipD ("proceso 2072", variación 2, panel central); y partículas formuladas mediante un proceso que incorporó cantidades y proporciones totales idénticas de componentes como "2072" pero que incluyó una etapa que permitió la concentración de lípidos dentro del etanol, específicamente al disolver un número de lípidos en etanol antes de la disolución del colesterol en la solución de etanol que contiene lípidos – tal proceso permitió una concentración notable de tales lípidos dentro de tal solución de etanol ("proceso 2141", panel inferior).

La Figura 3 muestra el resultado de los experimentos de dimensionamiento de partículas realizados sobre poblaciones de partículas "2072" (parte superior) y "2141" después del rendimiento inicial de la cromatografía de exclusión por tamaño ("SEC") y la selección de las fracciones 2-5.

La Figura 4 muestra los resultados del ensayo de tamaño de partícula de volumen en por ciento para las partículas producidas por los procesos "2072" (parte superior) y "2141" (parte inferior).

La Figura 5 muestra los resultados de inactivación específica del objetivo *in vivo* observados para las partículas que portan un ARNipD dirigido a HPRT1 que se formularon mediante diversos procesos indicados, que incluyen los procesos relacionados con "2072" y "2141", "2141", "2137" y "2144". Los datos sin procesar de HPRT1 se normalizaron a niveles de hSFRS9 y después se representaron gráficamente.

La Figura 6 muestra los perfiles de eficacia y tolerabilidad *in vivo* de las partículas producidas por "2072" y las partículas producidas por "2141", cada una de las cuales porta una carga útil de ARNipD dirigido a MYC como se indica.

La Figura 7 muestra las tolerabilidades generales *in vivo* (pesos corporales y pesos hepáticos) de partículas producidas por "2072" y partículas producidas por "2141".

La Figura 8 muestra los resultados de las evaluaciones de los marcadores de toxicidad tanto para las partículas producidas por "2072" como para las partículas producidas por "2141".

La Figura 9 muestra los resultados de las pruebas de eficacia para el Ejemplo 6.

Descripción detallada

La presente invención se dirige a procesos para la formulación de agentes aniónicos, cuyo rendimiento mejora la probabilidad de que tales agentes aniónicos alcancen la localización intracelular tras la administración a células de mamíferos y/o mamíferos.

Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen los significados que se entienden comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton y otros, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5a ed., R. Rieger y otros (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en la presente descripción, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen más abajo, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" significa $\pm 10\%$ del valor informado.

Como se usa en la presente descripción, el término "solución acuosa ácida" pretende significar una solución acuosa de pH 1,0 a pH 6,9, preferentemente, de pH 2,0 a pH 4,0, que tiene una molaridad de 5 a 200 mM, opcionalmente 20 a 100 mM o 40 a 80 mM. La solución acuosa ácida puede seleccionarse de soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido acético y otros ácidos. El tipo y pH de la solución acuosa ácida variarán en dependencia del tipo de lípido y/o agente aniónico a suspenderse o disolverse en tal solución.

Por "alqueniilo" se entiende un grupo monovalente de cadena lineal o ramificada de, a menos que se especifique de cualquier otra manera, de 2 a 24 átomos de carbono que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los grupos alqueniilo se ilustran por etenilo, 1-propeniilo, 2-propeniilo, 2-metil-1-propeniilo, 1-butenilo, 2-butenilo, oleilo, linoleilo, linolenilo, y similares. El término "alqueniilo C_{x-y}" representa grupos alqueniilo que tienen entre x y y carbonos. Los valores ilustrativos para x son 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, o 18 a 20. En algunas modalidades, el alqueniilo puede sustituirse, además, con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente descripción para un grupo alquilo.

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

El término "alquilenilo" y el prefijo "alq-", como se usa en la presente descripción, representan un grupo de hidrocarburos polivalentes (por ejemplo, divalentes) derivados de un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquilenilos se ilustran por metileno, etileno, isopropileno, y similares. El término "alquilenilo C_{x-y}" representa grupos alquilenilo que tienen entre x y y carbonos. Los valores

ilustrativos para x son 1, 2, 3, 4, y 5, y los valores ilustrativos para y son 2, 3, 4, 5, y 6. En algunas modalidades, el alquileo puede sustituirse, además, con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente descripción para un grupo alquilo.

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

15 Por "amida" se entiende un grupo amina, como se define en la presente descripción, unido al grupo molecular parental a través de un grupo carbonilo.

20 Por "amino", como se usa en la presente descripción, se entiende $-N(R^{N1})_2$, en donde cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de N, alquilo, alqueno, alquinilo, alcoxi, arilo, alcarilo, cicloalquilo, alqúicicloalquilo, heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), alqheterociclilo (por ejemplo, alqheteroarilo), o dos R^{N1} se combinan para formar un heterociclilo o un grupo de protección de N, y en donde cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo, o arilo. En una modalidad preferida, amino es $-NH_2$, o $-NHR^{N1}$, en donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo, o arilo, y cada R^{N2} puede ser H, alquilo, o arilo. Por "amina primaria" se entiende un grupo que tiene la estructura $-NH_2$.

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

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

35 El término "lípidos anfipáticos" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en donde la porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas derivan de la presencia de grupos polares o cargados tales como carbohidratos, fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo, y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede conferirse mediante la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos. Los ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos, y esfingolípidos. Los ejemplos de fosfolípidos representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoileoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoileoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípido, familias de glicoesfingolípido, diacilgliceroles, y β-aciloxiácidos, también están dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. Adicionalmente, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos que incluyen triglicéridos y esteroides.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "agente aniónico" se refiere a una porción química que comprende al menos un átomo cargado negativamente, que opcionalmente puede incorporarse en una formulación (por ejemplo, como una carga útil). Por "carga útil polianiónica" se entiende una porción química que comprende múltiples átomos cargados negativamente que pueden incorporarse en una formulación. Los ejemplos de una carga útil polianiónica incluyen ácidos nucleicos, agentes de iARN, ARNip, ARNd, miARN, ARNh, ARNipD, y cargas útiles antisentido.

60 Por "lípidos aniónicos" se entiende cualquier molécula lipídica que tenga una carga negativa neta a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilgliceroles, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoilfosfatidiletanolaminas, N-succinilfosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilgliceroles, palmitoileoilfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

65 Como se usa en la presente descripción, el término "compuesto antisentido" o "carga útil antisentido" abarca, entre otros, oligonucleótidos antisentido de simple hebra (ADN, similar a ADN, similar a ARN) o determinadas construcciones de doble hebra o autohíbridos que comprenden un oligonucleótido de orientación antisentido, PNA antisentido, ribozimas y secuencias guías externas (secuencias que reclutan RNasa P, como se describió, por ejemplo,

en Guerrier-Takada y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8468, 1997). Los compuestos antisentido pueden ejercer su efecto por una diversidad de medios. Uno de tales medios es la dirección mediada por antisentido de una nucleasa endógena, tal como RNasa H en eucariotas o RNasa P en procariotas (Chiang y otros, *J. Biol. Chem.* 1266:18162, 1991; Forster y otros, *Science*, 249:783, 1990).

5 Como se usa en la presente descripción, el término "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, agua.

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

25 Por "lípidio catiónico" se entiende cualquier molécula lipídica que tenga una carga positiva neta a pH fisiológico. Los lípidos catiónicos ilustrativos incluyen cualquiera descrito en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 1. En determinadas modalidades, el lípidio catiónico puede comprender de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 50 % mol o aproximadamente 40 % mol del lípidio total presente en la partícula.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "carbamilo" se refiere a un grupo carbamato que tiene la estructura $-NR^{N1}C(=O)OR$ o $-OC(=O)N(R^{N1})_2$, donde el significado de cada R^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada en la presente descripción, y R es alquilo, cicloalquilo, alquiloalquilo, arilo, alcarilo, heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), o alheterociclilo (por ejemplo, alheteroarilo), como se define en la presente descripción.

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

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

40 Por "ARN de sustrato de Dicer" o "ARNipD" se entiende una clase de moléculas de doble hebra de nucleótidos 25+, por ejemplo, 25-35 (por ejemplo, 25-27, tales como regiones de doble hebra de 25 nucleótidos de longitud) que son capaces de silenciar genes. Debido a su mayor longitud en comparación con otros agentes de iARN, es probable que los ARNipD sean sustrato de Dicer.

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

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

60 El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de una partícula lipídica, tal como las descritas en la presente descripción, para fusionarse con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana plasmática o membranas que rodean los orgánulos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

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

65

Por "heteroalqueno" se entiende un grupo alqueno, como se define en la presente descripción, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes se reemplazaron cada uno por O, N, o S. Los grupos heteroalqueno ilustrativos incluyen grupos alqueno, como se describe en la presente descripción, sustituidos con un grupo oxo y/o unidos al grupo molecular parental a través de un átomo de oxígeno. En algunas modalidades, el grupo heteroalqueno puede sustituirse, además, con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente descripción para grupos alqueno.

Por "heteroalquilo" se entiende un grupo alquilo, como se define en la presente descripción, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes se reemplazaron cada uno por O, N, o S. Los grupos heteroalquilo ilustrativos incluyen grupos alquilo, como se describe en la presente descripción, sustituidos con un grupo oxo y/o unidos al grupo molecular parental a través de un átomo de oxígeno. En algunas modalidades, el grupo heteroalquilo puede sustituirse, además, con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente descripción para grupos alquilo.

El término "heteroalquileo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo alquileo, como se define en la presente descripción, en el que 1 o 2 de los átomos de carbono constituyentes se reemplazaron cada uno por O, N, o S. En algunas modalidades, el grupo heteroalquileo puede sustituirse, además, por 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente descripción para grupos alquileos. El término "heteroalquileo C_{x-y}" representa grupos heteroalquileo que tienen entre x y y carbonos. Los valores ilustrativos para x son 1, 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 2, 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, o 18 a 20.

Por "heteroalquino" se entiende un grupo alquino, como se define en la presente descripción, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes se reemplazaron cada uno por O, N, o S. Los grupos heteroalquino ilustrativos incluyen grupos alquino, como se describe en la presente descripción, sustituidos con un grupo oxo y/o unidos al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunas modalidades, el grupo heteroalquino puede sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente descripción para grupos alquilo.

El término "heteroarilo", como se usa en la presente descripción, representa ese subconjunto de heterociclos, como se define en la presente descripción, que son aromáticos: es decir, contienen electrones pi $4n+2$ dentro del sistema de anillo monocíclico o multicíclico. En algunas modalidades, el heteroarilo se sustituye con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes según se define para un grupo heterociclo.

El término "heterociclo", como se usa en la presente descripción, representa un anillo de 3, 4, 5, 6, 7, u 8 miembros, a menos que se especifique de cualquier otra manera, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, y azufre. El heterociclo puede ser saturado o insaturado y contener entre 0 y 3 enlaces insaturados. Por ejemplo, el anillo de 5 miembros tiene de cero a dos dobles enlaces, y los anillos de 6 y 7 miembros tienen de cero a tres dobles enlaces. Determinados grupos heterociclo incluyen de 2 a 9 átomos de carbono, por ejemplo, de 3 a 7 átomos de carbono. Otros de tales grupos pueden incluir hasta 12 átomos de carbono. El término "heterociclo" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica enlazada en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos enlazan dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, por ejemplo, un grupo quinuclidinilo. Los ejemplos de grupos heterociclos incluyen aziridinilo, azetidino, pirrolinilo, pirrolilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, piridilo, pirimidinilo, piperidinilo, azepanilo, pirazinilo, piperazinilo, diazepanilo, morfolinilo, tetrahidrofurano, dihidrofurano, y similares.

El término "(heterocicli)oxi", como se usa en la presente descripción, representa un grupo heterociclo, como se define en la presente descripción, unido al grupo molecular parental a través de un átomo de oxígeno. En algunas modalidades, el grupo heterociclo puede sustituirse con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente descripción.

El término "(heterocicli)oil", como se usa en la presente descripción, representa un grupo heterociclo, como se define en la presente descripción, unido al grupo molecular parental a través de un grupo carbonilo. En algunas modalidades, el grupo heterociclo puede sustituirse con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente descripción.

Por "hibridar" se entiende emparejar para formar una molécula de doble hebra entre polinucleótidos suficientemente complementarios, como se define en la presente descripción, o porciones de estos, en diversas condiciones de rigurosidad. (Ver, por ejemplo, Wahl y otros, *Methods Enzymol.* 152:399 (1987); Kimmel, *Methods Enzymol.* 152:507 (1987)). Por ejemplo, la concentración de sal de alta rigurosidad será normalmente menos de aproximadamente 750 mM de NaCl y citrato de trisódico 75 mM, menos de aproximadamente 500 mM de NaCl y citrato de trisódico 50 mM, o menos de aproximadamente 250 mM de NaCl y citrato de trisódico 25 mM. La hibridación de baja rigurosidad puede obtenerse en ausencia de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de alta rigurosidad puede obtenerse en presencia de al menos aproximadamente 35 % de formamida o al menos aproximadamente 50 % de formamida. Las condiciones de temperatura de alta rigurosidad incluirán normalmente temperaturas de al menos

aproximadamente 30 °C, 37 °C, o 42 °C. Diversos parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión del ADN portador, se conocen bien por los expertos en la técnica. Diversos niveles de rigurosidad se logran mediante la combinación de estas diversas condiciones según sea necesario. En una modalidad, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato de trisódico 75 mM, y SDS al 1 %. En una modalidad alternativa, la hibridación se producirá a 50 °C o 70 °C en NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, y EDTA 1 mM, a pH 6,4, después de la hibridación durante 12-16 horas, seguido de lavado. Las condiciones de hibridación preferidas adicionales incluyen hibridación a 70 °C en 1xSSC o 50 °C en 1xSSC, formamida al 50 % seguido de lavado a 70 °C en 0,3xSSC o hibridación a 70 °C en 4xSSC o 50 °C en 4xSSC, formamida al 50 % seguido de lavado a 67 °C en 1xSSC. Las variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Una de tales variaciones ilustrativas incluye la evaluación de la hibridación en condiciones diseñadas para imitar las condiciones intracelulares fisiológicas, en donde los cationes y los aniones se distribuyen en las siguientes proporciones: para cationes, sodio: Potasio: Calcio: Magnesio a 10:160:2:26; y para aniones, Cloruro: Bicarbonato: Fosfato: Sulfato: Gluconato a 3:10:100:20:65.

El término "lípidos hidrófobos" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos se sustituyen opcionalmente por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, diacilglicerol, dialquilglicerol, N—N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano, y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

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

El término "lípidos" se refiere a cualquier derivado de ácido graso que sea capaz de formar una micela de manera que una porción hidrófoba del material lipídico se protege de una fase/solución acuosa mediante una porción hidrófila que se orienta hacia la fase acuosa, o es capaz de formar una bicapa de manera que una porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia la bicapa mientras que una porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas derivan de la presencia de fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, y otros grupos similares. La hidrofobicidad podría conferirse mediante la inclusión de grupos que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos. Los lípidos preferidos son fosfoglicéridos y esfingolípidos, cuyos ejemplos representativos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina pueden usarse. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como las familias de esfingolípidos y glucoesfingolípidos, también están dentro del grupo designado como lípidos. Adicionalmente, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos que incluyen triglicéridos y esteroides.

El término "conjugado lipídico" se refiere a un lípidos conjugado, opcionalmente uno que inhibe la agregación de partículas lipídicas. Tales conjugados lipídicos incluyen, pero no se limitan a, conjugados PEG-lípidos tales como, por ejemplo, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (por ejemplo, conjugados de PEG-DAA), PEG acoplado a diacilgliceroles (por ejemplo, conjugados de PEG-DAG), PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, y PEG conjugado a ceramidas (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,885,613), lípidos catiónicos PEG, conjugados lípidos-polioxazolina (POZ) (por ejemplo, conjugados POZ-DAA; ver, por ejemplo, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/294,828, presentada el 13 de enero de 2010, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/295,140, presentada el 14 de enero de 2010), oligómeros de poliamida (por ejemplo, conjugados lípidos-ATTA) y mezclas de estos. Ejemplos de conjugados lípidos-POZ adicionales se describen en la publicación PCT núm. WO 2010/006282. El PEG o POZ puede conjugarse directamente al lípidos o puede unirse al lípidos mediante una porción enlazadora. Cualquier porción enlazadora adecuada para acoplar el PEG o POZ a un lípidos puede usarse lo que incluye, por ejemplo, porciones enlazadoras que no contienen éster y porciones enlazadoras que contienen éster. En determinadas modalidades, se usan porciones enlazadoras que no contienen éster, tales como amidas o carbamatos. Un lípidos conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un lípidos-polietilenglicol (PEG) que incluye, sin limitación, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloxypropilo (DAA), un PEG-fosfolípidos, un PEG-ceramida (Cer), o una mezcla de estos. El conjugado de PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloxypropilo (Ci2), un PEG-dimiristiloxypropilo (Ci4), un PEG-dipalmitiloxypropilo (Ci6), o un PEG-diesteariloxypropilo (Ci8). En determinadas modalidades, un lípidos conjugado que evita la agregación de partículas puede ser de 0 % mol a aproximadamente 20 % mol o aproximadamente 2 % mol del lípidos total presente en la partícula.

Por "vector lipídico" se entiende un liposoma, lipoplejo, micela, nanopartícula lipídica, partícula basada en núcleo, partícula que comprende un agregado agente de unión a ARN-ARN que se combina con lípidos de transfección o partícula basada en vesícula producida mediante un proceso de la invención.

Por "enlazador" se entiende un grupo polivalente (por ejemplo, divalente) opcionalmente sustituido que contiene uno o más átomos. Los ejemplos de enlazadores incluyen grupos de alquileo y heteroalquileo sustituidos opcionalmente, como se describe en la presente descripción.

“Suministro local”, como se usa en la presente descripción, se refiere al suministro de un agente activo tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNiP) directamente a un sitio objetivo dentro de un organismo. Por ejemplo, un agente puede suministrarse localmente mediante inyección directa en un sitio de la enfermedad tal como un tumor u otro sitio objetivo tal como un sitio de inflamación o un órgano objetivo tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón, y similares.

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

Por “microARN” (miARN) se entiende una molécula de ARN de simple hebra que puede usarse para silenciar un producto génico a través de la interferencia de ARN.

El término “lípidos modificados” se refiere a lípidos modificados para ayudar, por ejemplo, a inhibir la agregación y/o precipitación, inhibir la respuesta inmunitaria y/o mejorar la vida en circulación in vivo. En determinados aspectos de la presente invención, los lípidos modificados son lípidos neutros. Los lípidos neutros modificados incluyen, pero no se limitan a, lípidos pegilados, tales como diestearoilfosfatidiletanolamina de polietilenglicol 2000 (PEG(2000) DSPE); PEG-DMG; PEG-DMPE; PEG-DPPE; PEG-DPG; PEG-DOPE; o PEG-DOG.

Como se usa en la presente descripción, un “lípidos modificados que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípidos-agente aniónico” es cualquier lípidos modificados que proporcione un medio para aumentar la vida útil en la circulación y/o aumentar el suministro de las partículas de agente aniónico-lípidos a un tejido objetivo. Tales lípidos modificados ilustrativos incluyen polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida, o gangliósidos-lípidos modificados (por ejemplo, GM1). Típicamente, la concentración de los lípidos modificados-gangliósidos, PEG o PEG-ceramida en la partícula será de aproximadamente 1-15 %.

Por “modular” se entiende que la expresión de un gen, o nivel de una molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas se regula positivamente o se regula negativamente, de manera que la expresión, nivel, o actividad es mayor o menor que la observada en ausencia del modulador. Por ejemplo, el término modulación puede incluir inhibición o silenciamiento génico, y el nivel de expresión de un gen o el nivel de una molécula de ARN, o un equivalente de estos, se reduce en al menos 10 % (por ejemplo, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %), en comparación con un control.

El término “grupo de protección de N”, como se usa en la presente descripción, representa aquellos grupos destinados a proteger a un grupo amino contra reacciones no deseadas durante procedimientos sintéticos. Los grupos de protección de N usados comúnmente se describen en Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis”, 3ª edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999). Los grupos de protección de N incluyen acilo, ariloilo, o grupos carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo, y auxiliares quirales tales como D, L o D, L-aminoácidos protegidos o desprotegidos tales como alanina, leucina, fenilalanina, y similares; grupos que contienen sulfonilo tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, y similares; grupos formadores de carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo, y similares, grupos alcarilos tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, y similares y grupos sililo tales como trimetilsililo, y similares. Los grupos de protección de N preferidos son formilo, acetilo, benzoilo, pivaloilo, t-butilacetilo, alanilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxicarbonilo (Boc), y benciloxicarbonilo (Cbz).

Como se usa en la presente descripción, el término “solución lipídica orgánica” se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un solvente orgánico que tiene un lípidos.

El término “oxo” como se usa en la presente descripción, representa =O.

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

Por “lípidos neutros” se entiende cualquiera de un número de especies lipídicas que existen ya sea en una forma zwitteriónica neutra o sin carga a un pH seleccionado. A pH fisiológico, tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélna, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilgliceroles.

El término "lípidos no catiónicos" se refiere a cualquier lípido anfipático así como también a cualquier otro lípido neutro o lípido aniónico. El lípido no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro que incluye, pero no se limita a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de estos. En determinadas modalidades, el lípido no catiónico puede ser de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 90 % mol, aproximadamente 10 % mol, o aproximadamente 58 % mol si se incluye colesterol, del lípido total presente en la partícula. En algunas modalidades, la partícula de ácido nucleico-lípido incluye, además, colesterol a, por ejemplo, aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 60 % mol o aproximadamente 48 % mol del lípido total presente en la partícula.

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

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

Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entienden aquellas sales que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares y son proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se describen en: Berge y otros, *J. Pharm. Sci.* 66(1):1, 1977 y en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl y C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención o por separado mediante la reacción del grupo de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenesulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenesulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como también cationes de amonio no tóxico, amonio cuaternario, y amina, que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, y similares.

Por "agente de unión a ARN" se entiende cualquier agente o combinación de agentes capaces de unirse o hibridar un ácido nucleico, por ejemplo, una carga útil de ácido nucleico de una formulación terapéutica. Los agentes de unión al ARN incluyen cualquier lípido descrito en la presente descripción (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos, combinaciones de uno o más lípidos catiónicos, tales como los descritos en la presente descripción o en la Tabla 1, así como también combinaciones de uno o más lípidos catiónicos y cualquier otro lípido, tales como lípidos neutros o conjugados PEG-lípido). El agente de unión al ARN puede formar cualquier estructura útil dentro de una formulación, tal como un agregado interno.

Por "agente de iARN" se entiende cualquier agente o compuesto que ejerce un efecto de silenciamiento génico mediante la hibridación de un ácido nucleico objetivo. Los agentes de iARN incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que sea capaz de mediar la iARN específica de secuencia (por ejemplo, en condiciones rigurosas), por

ejemplo, un ARN de interferencia corto (ARNip), ARN de doble hebra (ARNdh), microARN (miARN), ARN en horquilla corto (ARNhc), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNip modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt), y ARN de sustrato de Dicer (ARNipD).

5 Por "ARN en horquilla corto" o "ARNhc" se entiende una secuencia de ARN que hace un giro ajustado en horquilla y es capaz de silenciar los genes.

10 Por "región sentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de la invención que tiene suficiente complementariedad con una región antisentido de otro ácido nucleico. En adición, la región sentido de un ácido nucleico de la invención puede incluir una secuencia de nucleótidos que tiene homología con una secuencia de nucleótidos del gen objetivo. Por "región antisentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de la invención que tiene suficiente complementariedad con una secuencia de nucleótidos del gen objetivo.

15 "Estable en suero" en relación con partículas de ácido nucleico-lípido tales como las descritas en la presente descripción significa que la partícula no se degrada significativamente después de la exposición a un ensayo con suero o nucleasas que degradarían significativamente el ADN o ARN libre. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo con suero estándar, un ensayo con ADNasa o un ensayo con ARNasa.

20 Por "silenciamiento" o "silenciamiento génico" se entiende que la expresión de un gen o el nivel de una molécula de ARN que codifica una o más proteínas se reduce en presencia de un agente de iARN por debajo del observado en condiciones de control (por ejemplo, en ausencia del agente de iARN o en presencia de una molécula inactiva o atenuada tal como una molécula de iARN con una secuencia alterada o con errores de apareamiento). El silenciamiento génico puede disminuir la expresión del producto génico en un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8
25 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % (es decir, inhibición completa).

30 Por "ARN inhibidor pequeño", "ARN de interferencia corto" o "ARNip" se entiende una clase de moléculas de doble hebra de 10-40 (por ejemplo, 15-25, tales como 21 o 25-35 y/o 25-30, tales como 25, 26 o 27) nucleótidos que son capaces de silenciar genes. Más notablemente, el ARNip se involucra típicamente en la vía de interferencia de ARN (iARN) mediante la cual el ARNip interfiere con la expresión de un producto génico específico.

35 El término "solubilidad" se refiere a la cantidad de un compuesto (el soluto) que se disuelve en una cantidad dada de solvente para formar una solución saturada. Una "solución" se refiere a una mezcla homogénea de un líquido (el solvente) con un gas o sólido (el soluto). En una solución, las moléculas del soluto son discretas y se mezclan con las moléculas del solvente. La solubilidad de una sustancia depende de la temperatura. La "solubilidad en agua" se refiere a la solubilidad de un soluto en el agua solvente.

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

45 Por "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntica" se entiende una secuencia de polipéptido o polinucleótido que tiene la misma secuencia de polipéptido o polinucleótido, respectivamente, que una secuencia de referencia, o tiene un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, que son los mismos en la ubicación correspondiente dentro de una secuencia de referencia cuando las dos secuencias se alinean de manera óptima. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia de referencia tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos contiguos, con mayor preferencia al menos 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300, o 350 aminoácidos contiguos, y con la máxima preferencia la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente al menos 5 nucleótidos contiguos, preferentemente, al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos contiguos, y con la máxima preferencia la secuencia de nucleótidos de longitud completa. La identidad de secuencia puede medirse mediante el uso de software de análisis de secuencias en el ajuste predeterminado (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software puede emparejar secuencias similares mediante la asignación de grados de homología a varias sustituciones, deleciones, y otras modificaciones.

60 Por "suficientemente complementaria" se entiende una secuencia de polinucleótidos que tiene la secuencia de polinucleótidos complementaria exacta, como un ácido nucleico objetivo, o tiene un porcentaje o nucleótidos especificados que son el complemento exacto en la ubicación correspondiente dentro del ácido nucleico objetivo cuando las dos secuencias se alinean óptimamente. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que es "sustancialmente complementaria" a una secuencia de ácido nucleico objetivo tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de complementariedad con la secuencia de ácido
65 nucleico objetivo. Para los agentes de iARN que tienen una longitud entre 10 y 40 nucleótidos, las secuencias suficientemente complementarias incluyen las que tienen uno, dos, tres, cuatro, o cinco nucleótidos no

complementarios. De hecho, en determinadas modalidades que incluyen, por ejemplo, agentes de ARNip, un agente de iARN activo de doble hebra puede poseer tan solo de 15 a 19 nucleótidos consecutivos de la hebra guía que son suficientemente complementarios a un ácido nucleico objetivo, mientras que no hay ningún requisito para que el resto de la cadena guía posea cualquier grado de complementariedad con el ácido nucleico objetivo (aunque en determinadas modalidades, el resto de la cadena guía puede complementarse parcial o completamente con el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) al que se dirige).

“Suministro sistémico”, como se usa en la presente descripción, se refiere al suministro de partículas lipídicas que conducen a una amplia biodistribución de un agente activo tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNipD) dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir al suministro sistémico de determinados agentes, pero no de otros. El suministro sistémico significa que una cantidad útil, preferentemente, terapéutica, de un agente se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener una biodistribución amplia generalmente se requiere una vida útil en la sangre de manera que el agente no se degrade o elimine rápidamente (tal como mediante el paso primero a órganos (hígado, pulmón, etc.) o mediante una unión celular rápida, inespecífica) antes de alcanzar un sitio de la enfermedad distal al sitio de administración. El suministro sistémico de partículas lipídicas puede ser por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, e intraperitoneal. En una modalidad preferida, el suministro sistémico de partículas lipídicas se realiza mediante suministro intravenoso.

Por “ácido nucleico objetivo” se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico cuya expresión o actividad quiera modularse. El ácido nucleico objetivo puede ser ADN o ARN. En determinadas modalidades, el ácido nucleico objetivo es un ARNm objetivo.

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

Como se usa en la presente descripción, y también se entiende bien en la técnica, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, tales como resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones; disminución del alcance de la enfermedad, trastorno, o condición; estabilización (es decir, no empeoramiento) de un estado de la enfermedad, trastorno, o condición; prevención de la propagación de la enfermedad, trastorno, o condición; demora o ralentización del progreso de la enfermedad, trastorno, o condición; mejora o paliación de la enfermedad, trastorno, o condición; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Paliar” una enfermedad, trastorno o afección significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas no deseadas de la enfermedad, trastorno o afección se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o alarga, en comparación con la extensión o el curso temporal en ausencia de tratamiento. Por “tratar el cáncer”, “prevenir el cáncer”, o “inhibir el cáncer” se entiende que provoca una reducción del tamaño de un tumor o del número de células cancerosas, ralentiza o inhibe un aumento en el tamaño de una proliferación de células tumorales o cancerosas, aumenta el tiempo de supervivencia sin enfermedad entre la desaparición de un tumor u otro cáncer y su reaparición, previene o reduce la posibilidad de una ocurrencia inicial o posterior de un tumor u otro cáncer, o reduce un síntoma adverso asociado a un tumor u otro cáncer. En una modalidad deseada, el por ciento de células tumorales o cancerosas que sobreviven al tratamiento es al menos 20, 40, 60, 80, o 100 % menor que el número inicial de células tumorales o cancerosas, medido mediante el uso de cualquier ensayo estándar. Convenientemente, la disminución en el número de células tumorales o cancerosas inducida por la administración de un compuesto de la invención es al menos 2, 5, 10, 20, o 50 veces mayor que la disminución en el número de células no tumorales o no cancerosas. Convenientemente, los métodos de la presente invención resultan en una disminución de 20, 40, 60, 80, o 100 % en el tamaño de un tumor o número de células cancerosas, como se determina mediante el uso de métodos estándar. Convenientemente, al menos 20, 40, 60, 80, 90, o 95 % de los sujetos tratados tienen una remisión completa en la que todas las evidencias de tumor o cáncer desaparecen. Convenientemente, el tumor o el cáncer no reaparecen ni reaparecen después de no menos de 5, 10, 15, o 20 años. Por “tratar profilácticamente” una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) en un sujeto se entiende reducir el riesgo de desarrollar (es decir, la incidencia) o reducir la gravedad de la enfermedad o afección antes de la aparición de síntomas de la enfermedad. El tratamiento profiláctico puede prevenir o reducir completamente la aparición de la enfermedad o un síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento profiláctico puede incluir reducir o prevenir una enfermedad o afección (por ejemplo, prevenir el cáncer) que se produzca en una persona que puede predisponerse a la enfermedad pero que aún no se diagnostica que la padece.

Composición de partículas que comprenden agentes aniónicos

En algunas modalidades, una partícula de la invención incluye un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, DPePC, DODAP, o DOTAP), un lípido neutro (por ejemplo, DSPC, POPC, DOPE, o SM), y, opcionalmente, un derivado

de esteroles (por ejemplo, colesterol; colestano; colesteno; coprostanol; 3β -[-(*N,N,N'*-dimetilaminoetano)-
 carbamoil]colesterol (DC-colesterol); bis-guanidino-tren-colesterol (BGTC); 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato de (2*S*,3*S*)-2-
 (((3*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-
 5 ciclo-penta[*a*]fenantren-3-iloxi)carbonilamino)etilo (DPC-1); 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato de (2*S*,3*S*)-
 (((3*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-
 ciclo-penta[*a*]fenantren-3-ilo) (DPC-2); 2,3,4-trihidroxipentanodioato de bis((3*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-
 metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclo-penta[*a*]fenantren-3-ilo) (DPC-3); o 6-
 10 (((3*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptán-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-
 ciclo-penta[*a*]fenantren-3-iloxi)oxidofosforiloxi)-2,3,4,5-tetrahidroxihexanoato (DPC-4)). En algunas modalidades, la
 partícula incluye, además, un conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DMG, PEG-DMPE, PEG-DPPE, PEG-DPG,
 PEG-DOPE, o PEG-DOG).

En algunas modalidades, la partícula incluye de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o
 15 más compuestos de la invención (por ejemplo, uno o más de cualquiera de los compuestos descritos en la presente
 descripción, por ejemplo, en la Tabla 1), de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más
 lípidos catiónicos o uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, uno o más de cualquiera de los compuestos
 descritos en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 1), de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente
 20 % mol de uno o más conjugados PEG-lípido, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno
 20 o más lípidos neutros, y de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más derivados de
 esteroles.

En modalidades particulares, la partícula incluye de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 80 % mol (por
 ejemplo, de aproximadamente 40 % mol a aproximadamente 55 % mol, tal como aproximadamente 48 % mol) de uno
 25 o más lípidos catiónicos (por ejemplo, compuestos de la invención y/u otros lípidos catiónicos, como se describe en la
 presente descripción), de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más conjugados lípido-
 PEG, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más lípidos neutros, y de
 aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más derivados de esteroles. En algunas
 modalidades, la partícula incluye de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % mol (por ejemplo,
 30 aproximadamente 22 % mol) de uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, L-6, L-30, y/o cualquiera descrito
 en la presente descripción), de aproximadamente 15 % mol a aproximadamente 35 % mol (por ejemplo,
 aproximadamente 26 % mol) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA o cualquiera de los descritos en
 la presente descripción), de aproximadamente 3 % mol a aproximadamente 9 % mol (por ejemplo, aproximadamente
 6 % mol) de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, PEG-DMPE, y/o cualquiera descrito en la
 presente descripción), de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 20 % mol (por ejemplo, aproximadamente
 35 14 % mol) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC o cualquiera de los descritos en la presente descripción),
 y de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 29 % mol a
 aproximadamente 33 % mol, tal como aproximadamente 33 % mol) de uno o más derivados de esteroles (por ejemplo,
 colesterol, un derivado de este, o cualquiera descrito en la presente descripción).

En algunas modalidades, uno o más compuestos de la Tabla 1 están presentes en una cantidad de aproximadamente
 40 10 % mol a aproximadamente 40 % mol, por ejemplo, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 15 %
 mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y
 aproximadamente 25 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente
 45 10 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre
 aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 25 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 30
 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y
 aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 25 % mol, entre aproximadamente
 50 20 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre
 aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y aproximadamente 30
 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y
 aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente 30 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente
 55 30 % mol y aproximadamente 40 % mol, o entre aproximadamente 35 % mol y aproximadamente 40 % mol (por
 ejemplo, aproximadamente 21,0 % mol, 21,2 % mol, 21,4 % mol, 21,6 % mol, 21,8 % mol, 22 % mol, 25 % mol, 26 %
 mol, 26 % mol, 30 % mol, 35 % mol, o 40 % mol) de uno o más compuestos de la Tabla 1. En algunas modalidades,
 uno o más compuestos de la Tabla 1 están presentes en una cantidad de aproximadamente 10 % mol a
 60 aproximadamente 80 % mol, por ejemplo, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre
 aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 25
 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y
 aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente
 65 10 % mol y aproximadamente 45 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 50 % mol, entre
 aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 55 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 60
 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 65 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y
 aproximadamente 70 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 75 % mol, entre aproximadamente
 15 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 25 % mol, entre
 aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 35
 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y

15 % mol, entre aproximadamente 2 % mol y aproximadamente 5 % mol, entre aproximadamente 2 % mol y aproximadamente 10 % mol, entre aproximadamente 2 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 2 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 10 % mol, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 20 % mol (por ejemplo, aproximadamente 2,5 % mol, 2,6 % mol, 2,7 % mol, 2,8 % mol, 2,9 % mol, 3 % mol, 3,5 % mol, 4 % mol, 4,3 % mol, 4,5 % mol, 4,7 % mol, 5 % mol, 5,3 % mol, 5,5 % mol, 5,7 % mol, 6 % mol, 6,5 % mol, 6,7 % mol, 7 % mol, 7,5 % mol, 8 % mol, 8,5 % mol, o 9 % mol) de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, PEG-DMPE, y/o cualquiera descrito en la presente descripción).

En algunas modalidades, uno o más lípidos neutros están presentes en una cantidad de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol, por ejemplo, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 10 % mol, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 5 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 7 % mol y aproximadamente 10 % mol, entre aproximadamente 7 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 7 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 15 % mol, entre aproximadamente 10 % mol y aproximadamente 20 % mol, entre aproximadamente 15 % mol y aproximadamente 20 % mol (por ejemplo, aproximadamente 13,0 % mol, 13,2 % mol, 13,4 % mol, 13,6 % mol, 13,8 % mol, 14 % mol, 14,1 % mol, 14,3 % mol, 14,5 % mol, 14,7 % mol, o 14,9 % mol) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC o cualquiera de los descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, uno o más derivados de esteroles están presentes en una cantidad de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol, por ejemplo, entre aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 25 % mol, entre aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente 20 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y aproximadamente 30 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 25 % mol y aproximadamente 40 % mol, entre aproximadamente 30 % mol y aproximadamente 35 % mol, entre aproximadamente 30 % mol y aproximadamente 40 % mol (por ejemplo, aproximadamente 28,4 % mol, 28,6 % mol, 28,8 % mol, 29,0 % mol, 30 % mol, 31 % mol, 32 % mol, 33 % mol, 33,2 % mol, 33,4 % mol, 33,6 % mol, 33,8 % mol, 34 % mol, 34,4 % mol, 34,7 % mol, o 34,9 % mol) de uno o más derivados de esteroles (por ejemplo, colesterol o cualquiera de los descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, la partícula incluye una o más partículas lipídicas que comprenden uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección, donde el uno o más agentes de unión a ARN incluyen de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más lípidos catiónicos o uno o más compuestos de la Tabla 1 y de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol de uno o más PEG-lípidos; y donde el uno o más lípidos de transfección incluyen de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más compuestos de la Tabla 1, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más lípidos neutros, de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol de uno o más conjugados PEG-lípido, y de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más derivados de esteroles. Los porcentajes y partículas adicionales son como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la partícula incluye, además, un agente aniónico, por ejemplo, un agente polianiónico tal como un agente de iARN (por ejemplo, ARNdH, ARNiP, miARN, ARNhC, ARNsGPT, o ARNiPD, por ejemplo, ARNiPD) o un agente antisentido. En algunas modalidades, el agente de iARN tiene una longitud de 10 a 40 nucleótidos, por ejemplo, longitud de 10 a 15 nucleótidos, 10 a 20 nucleótidos, 10 a 25 nucleótidos, 10 a 30 nucleótidos, 10 a 35 nucleótidos, 15 a 20 nucleótidos, 15 a 25 nucleótidos, 15 a 30 nucleótidos, 15 a 35 nucleótidos, 15 a 40 nucleótidos, 16 a 20 nucleótidos, 16 a 25 nucleótidos, 16 a 30 nucleótidos, 16 a 35 nucleótidos, 16 a 40 nucleótidos, 20 a 25 nucleótidos, 18 a 20 nucleótidos, 18 a 25 nucleótidos, 18 a 30 nucleótidos, 18 a 35 nucleótidos, 18 a 40 nucleótidos, 19 a 20 nucleótidos, 19 a 25 nucleótidos, 19 a 30 nucleótidos, 19 a 35 nucleótidos, 19 a 40 nucleótidos, 20 a 30 nucleótidos, 20 a 35 nucleótidos, 20 a 40 nucleótidos, 25 a 30 nucleótidos, 25 a 35 nucleótidos, 25 a 40 nucleótidos, 30 a 35 nucleótidos, 30 a 40 nucleótidos, o de 35 a 40 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 25 a 35 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 16 a 30 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 19 a 29 nucleótidos. En algunas modalidades, el agente antisentido tiene una longitud de 8 a 50 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 8 a 10 nucleótidos, 8 a 15 nucleótidos, 8 a 20 nucleótidos, 8 a 25 nucleótidos, 8 a 30 nucleótidos, 8 a 35 nucleótidos, 8 a 40 nucleótidos, u 8 a 45 nucleótidos), por ejemplo, una longitud de 14 a 35 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 14 a 15 nucleótidos, 14 a 20 nucleótidos, 14 a 25 nucleótidos, o 14 a 30 nucleótidos), por ejemplo, una longitud de 17 a 24 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 17 a 20 nucleótidos.

En algunas modalidades, la partícula incluye una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p) del agente aniónico respecto al lípido total presente en la partícula, por ejemplo, una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:15 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:20 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:40 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a

aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:40 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), una relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), una relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), una relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), una relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), una relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), una relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), una relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), una relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), una relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), una relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), una relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), una relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), o una relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p) del agente aniónico respecto al lípido total presente en la partícula.

En algunas modalidades, la partícula incluye un liposoma (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), un lipoplejo, o una micela.

Un proceso de la invención puede proporcionar una composición farmacéutica que incluye cualquier compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o cualquier partícula o formulación descrita en la presente descripción; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los métodos de tratamiento como tales no forman parte de la invención reivindicada pero se discuten en la presente descripción más abajo como materia relacionada.

Por lo tanto, la descripción describe un método para tratar o tratar profilácticamente una enfermedad en un sujeto, el método incluye administrar al sujeto una partícula producida mediante un proceso descrito en la presente descripción (por ejemplo, como se establece en los Ejemplos más abajo), cualquier formulación descrita en la presente descripción, o cualquier composición descrita en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad (por ejemplo, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, colangiocarcinoma, angiosarcoma, o hemangiosarcoma), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, o neuroblastoma). La descripción describe, además, un método para tratar o tratar profilácticamente enfermedades neoplásicas y complicaciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, carcinomas (por ejemplo, de pulmón, mama, pancreático, colon, hepatocelular, renal, tracto genital femenino, próstata, células escamosas, carcinoma in situ), linfoma (por ejemplo, linfoma histiocítico, linfoma no hodgkiniano), síndromes MEN2, neurofibromatosis (que incluye neoplasia de células de Schwann), síndrome mielodisplásico, leucemia, angiogénesis tumoral, cánceres de tiroides, hígado, hueso, piel, cerebro, sistema nervioso central, páncreas, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mama, colon, vejiga, próstata, tracto gastrointestinal, endometrio, trompas de Falopio, testículos y ovario, tumores estromales gastrointestinales (GIST), tumores prostáticos, tumores de mastocitos (que incluyen tumores de mastocitos caninos), mielofibrosis mieloide aguda, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, melanoma, mastocitosis, gliomas, glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, sarcomas (por ejemplo, sarcomas de origen neuroectodérmico o leiomiocarcinoma), metástasis de tumores en otros tejidos, e hipoxia inducida por quimioterapia.

La descripción también describe un método para modular la expresión de un ácido nucleico objetivo en un sujeto, el método incluye administrar cualquier partícula producida mediante un proceso descrito en la presente descripción (por ejemplo, como se establece en los Ejemplos más abajo), cualquier formulación descrita en la presente descripción, o cualquier composición descrita en una cantidad suficiente para reducir la expresión del gen objetivo (por ejemplo, cualquiera descrito en la presente descripción, por ejemplo, uno o más genes objetivos seleccionados del grupo que consiste en ABL1, RA, β -Catenina (CTNNB1), BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA1, ERBA2, ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MET, MDM2, MLL1, MLL2, MLL3, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TAL2, TCL3, TCL5, YES, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, ApoB100, CSN5, CDK6, ITGB1, TGF β 1, Ciclina D1, hepcidina, PCSK9, TTR, PLK1, y proteína de unión a KIF1) en el sujeto (por ejemplo, donde el método incluye reducir la expresión del gen objetivo en el sujeto).

La descripción describe, además, la administración de una dosificación del agente aniónico/partículas de la invención a un sujeto una o más veces al día (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 veces al día), una o más veces a la semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 veces a la semana) o una o más veces al mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 10 veces al mes). Un sujeto puede recibir dosificaciones del agente aniónico en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, en cualquier régimen de dosificación (por ejemplo, una o más veces al día (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 veces al día), una o más veces a la semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 veces a la semana) o una o más veces al mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 10 veces al mes)).

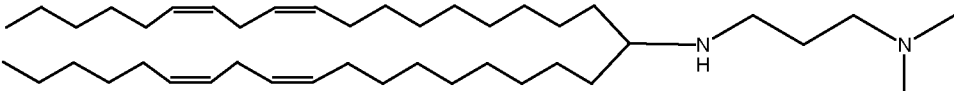
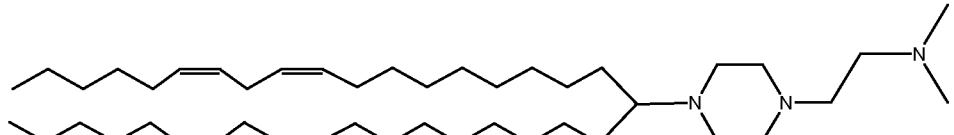
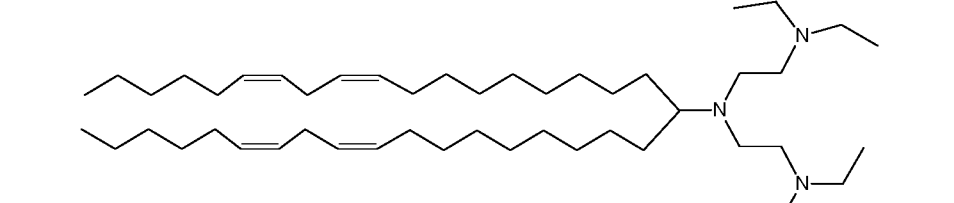
En determinadas modalidades, un sujeto puede recibir dosificaciones de una partícula producida mediante un proceso de la invención en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 200 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mg/kg, en cualquier régimen de dosificación (por ejemplo, una o más veces al día (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 veces al día), una o más veces a la semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 veces a la semana) o una o más veces al mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 10 veces al mes)).

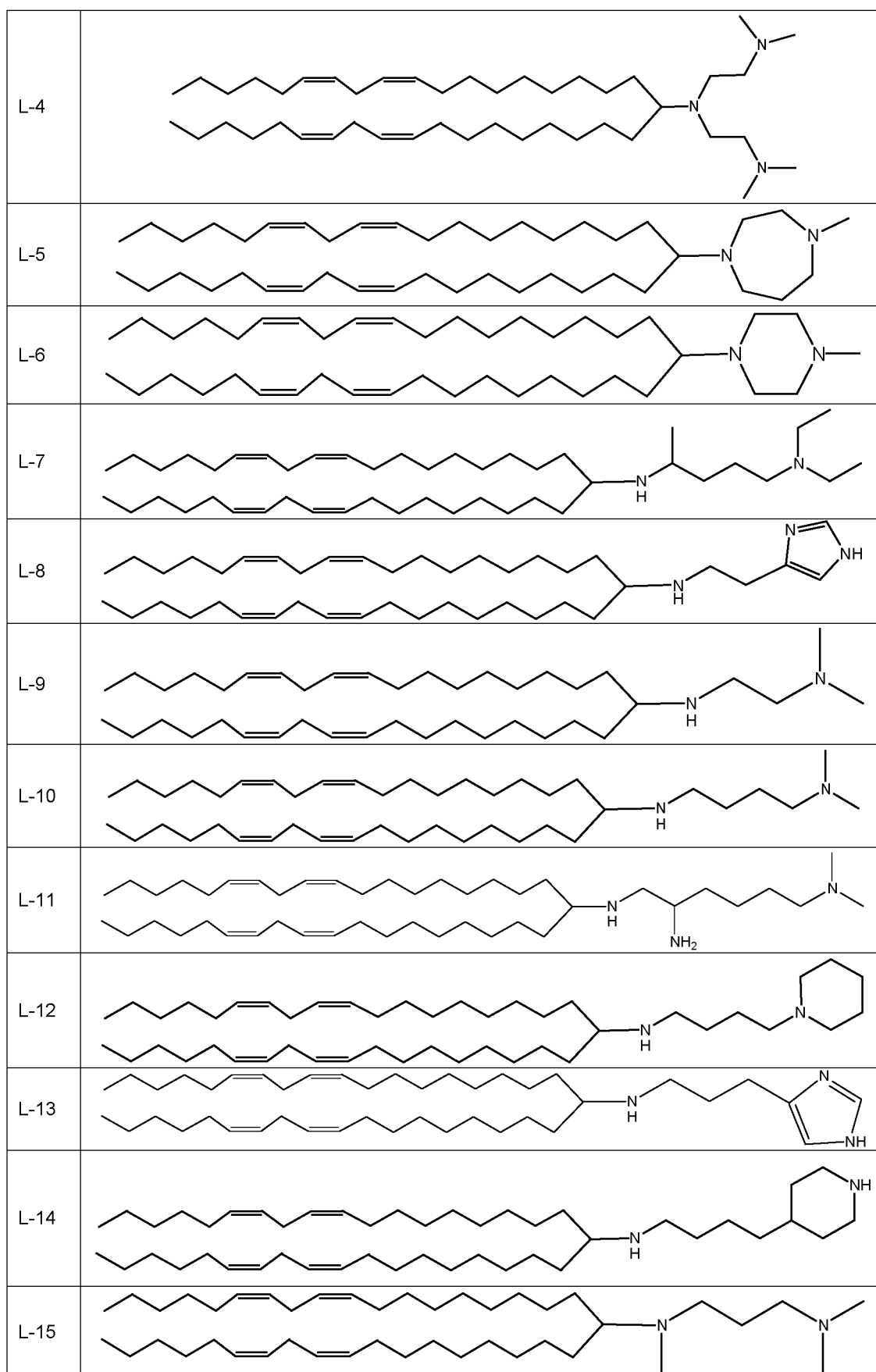
La descripción describe, además, un método para suministrar una partícula/agente fabricado mediante un proceso de la invención a un tipo específico de tejido. Ejemplos de tipos específicos de tejidos a los que puede suministrarse la partícula/agente incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, pulmón, próstata, riñón, médula ósea, bazo, timo, ganglio linfático, cerebro, médula espinal, corazón, músculo esquelético, piel, mucosa oral, esófago, estómago, íleon, intestino delgado, colon, vejiga, cuello uterino, ovario, testículos, glándulas mamarias, glándulas adrenales, tejido adiposo (blanco y/o marrón), sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34+, células CD4+), linfocitos, y otras células del linaje sanguíneo.

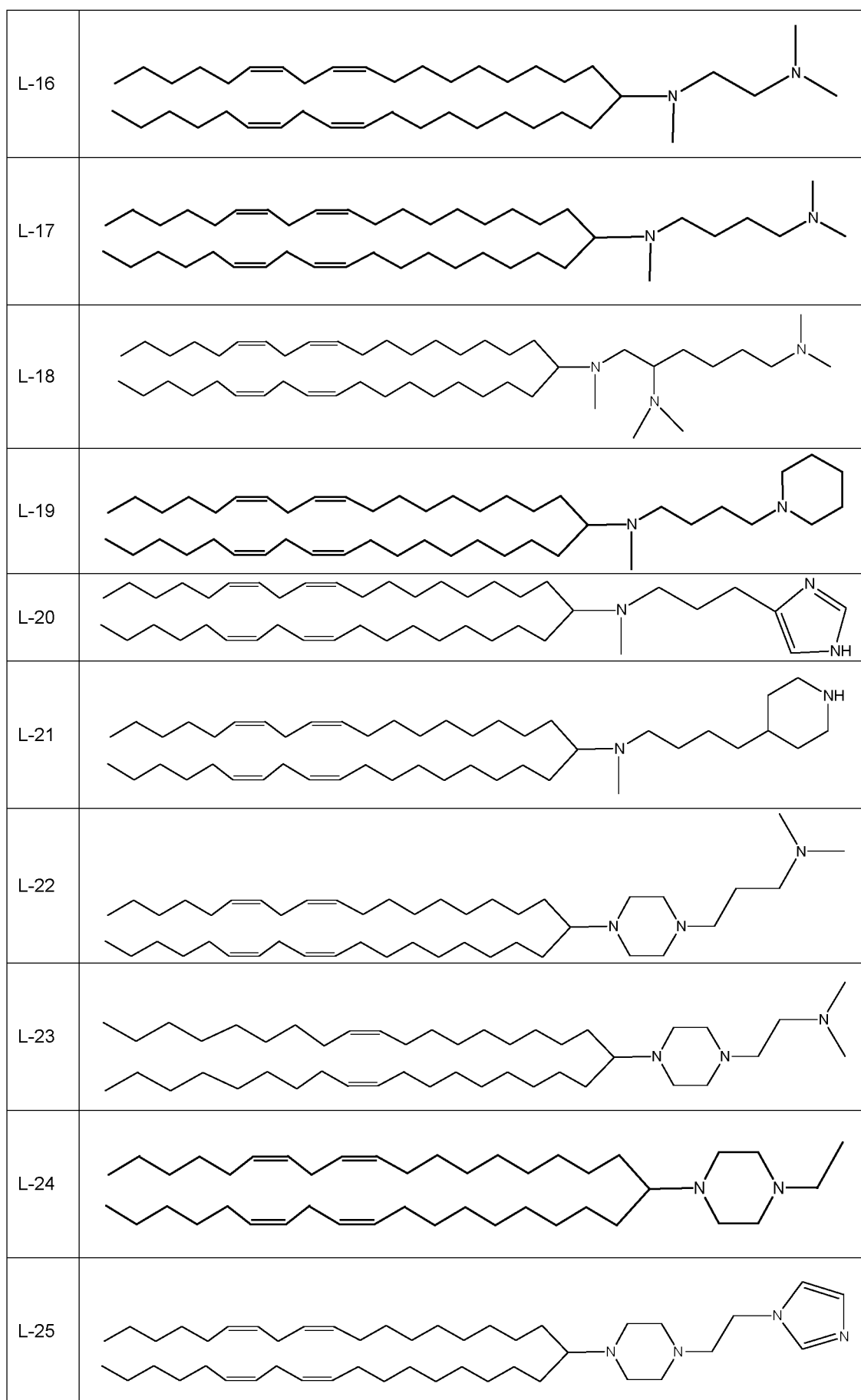
Lípidos de amino-amina y amino-amida

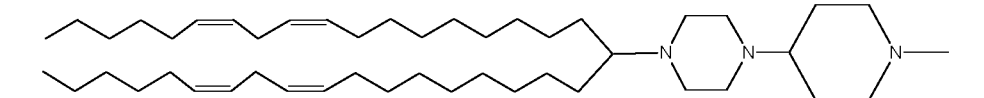
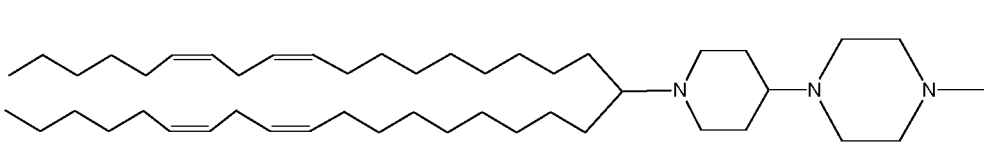
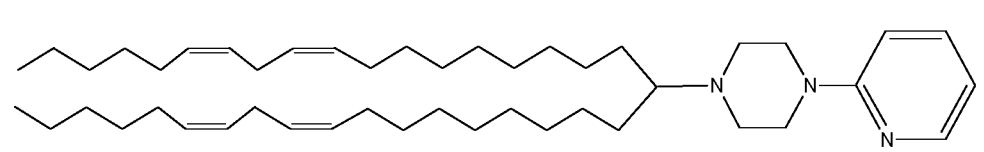
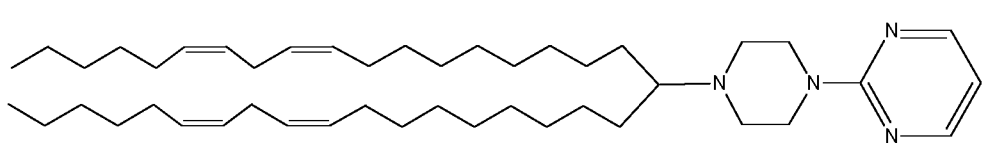
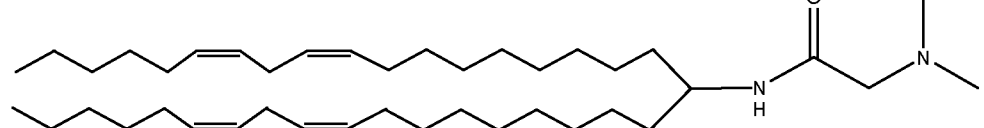
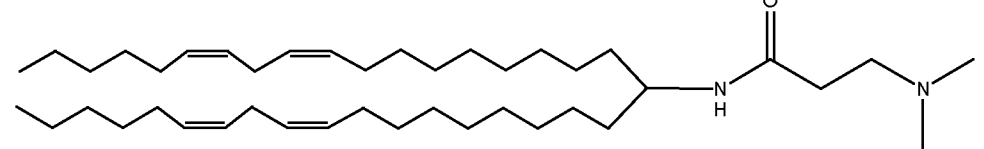
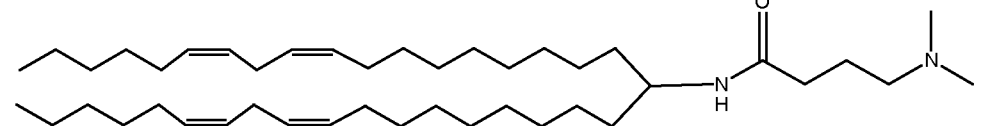
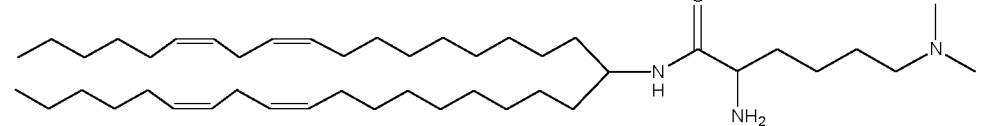
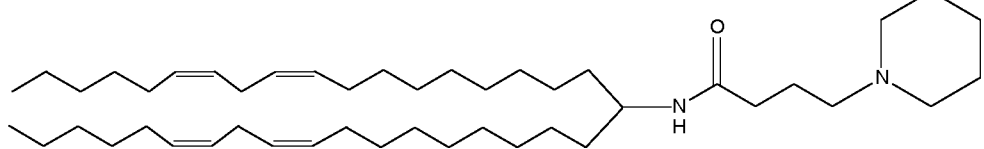
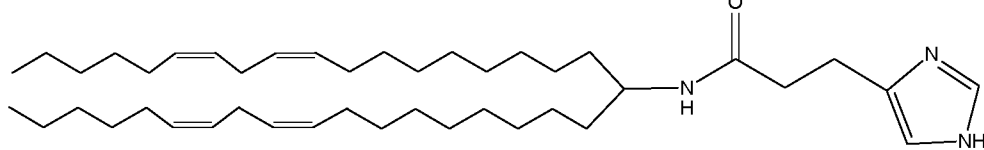
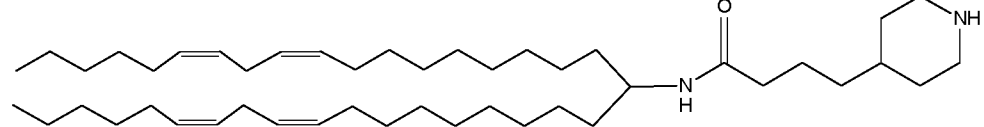
Los compuestos ilustrativos empleados en los procesos de la invención se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

L-1	
L-2	
L-3	





L-26	
L-27	
L-28	
L-29	
L-30	
L-31	
L-32	
L-33	
L-34	
L-35	
L-36	

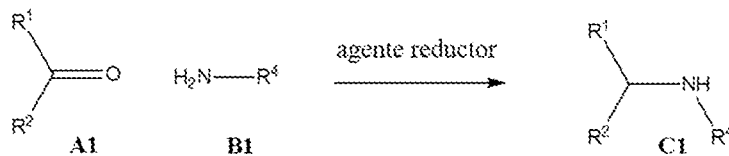
L-37	<p>Chemical structure L-37: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a piperazine ring attached via a carbonyl group. The piperazine ring is shown in its neutral form with two NH groups.</p>
L-38	<p>Chemical structure L-38: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a dimethylpiperazine ring attached via a carbonyl group. The piperazine ring has two methyl groups attached to the nitrogen atoms.</p>
L-39	<p>Chemical structure L-39: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a dimethylpiperazine ring attached via a methylene group (-CH₂-). The piperazine ring has two methyl groups attached to the nitrogen atoms.</p>
L-40	<p>Chemical structure L-40: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a bis(dimethylamino)ethylpiperazine ring attached via a carbonyl group. The piperazine ring has two ethyl groups attached to the nitrogen atoms, each of which is further substituted with a methyl group.</p>
L-41	<p>Chemical structure L-41: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a bis(dimethylamino)ethylpiperazine ring attached via a methylene group (-CH₂-). The piperazine ring has two ethyl groups attached to the nitrogen atoms, each of which is further substituted with a methyl group.</p>
L-42	<p>Chemical structure L-42: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a dimethylpiperazine ring attached via a carbonyl group and a methylene group (-CH₂-). The piperazine ring has two methyl groups attached to the nitrogen atoms.</p>
L-43	<p>Chemical structure L-43: A long-chain polyunsaturated fatty acid derivative (represented by two zigzag lines) with a dimethylpiperazine ring attached via a methylene group (-CH₂-). The piperazine ring has two methyl groups attached to the nitrogen atoms.</p>

L-44	
L-45	
L-46	
L-47	
L-48	
L-49	

Determinados compuestos de los procesos de la invención (por ejemplo, como se proporcionan en la Tabla 1) pueden prepararse mediante procesos análogos a los establecidos en la técnica, por ejemplo, mediante las secuencias de reacción mostradas en los Esquemas 1-4.

5

Esquema 1

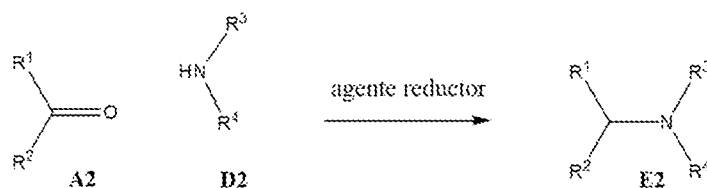


La amina secundaria de la fórmula C1 puede prepararse en condiciones de aminación reductiva al tratar la cetona A1, donde R¹ y R² son un grupo cola lipídico, como se describe en la presente descripción, con una amina B1 primaria, en donde R⁴ se describe en la presente descripción. Las condiciones para la aminación reductiva incluyen combinar la cetona A1 y la amina B1 primaria con un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio o trioacetoxiborohidruro de sodio, en un solvente apropiado. En modalidades particulares, el lípido de aminoamina de C1 se oxida, además, para formar un lípido de aminoamida correspondiente que tiene un grupo oxo en el carbono en R³ que es adyacente al nitrógeno. En otras modalidades, el lípido de aminoamina de C1 se somete, además, a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. Los compuestos ilustrativos que pueden producirse mediante el uso de este esquema se proporcionan en las Tablas 1-4.

10

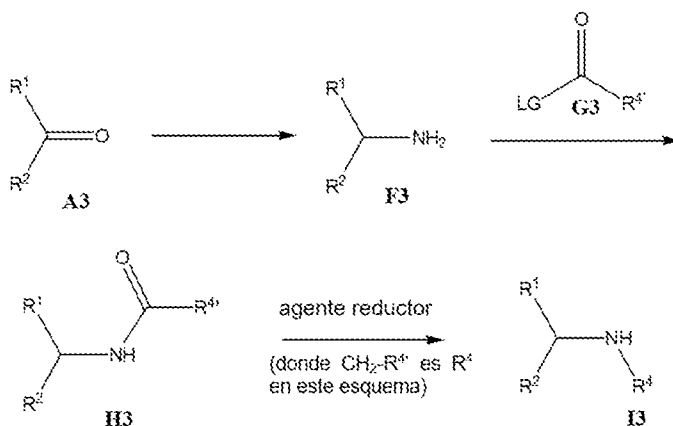
15

Esquema 2



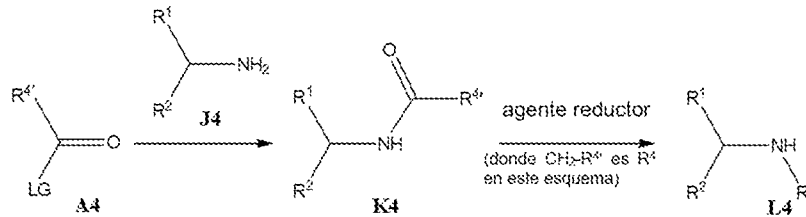
5 La amina terciaria de la fórmula E2 puede prepararse en condiciones de aminación reductiva al tratar la cetona A2, donde cada R1 y R2 es un grupo cola lipídica, como se describe en la presente descripción, con una amina secundaria D2, donde R3 y R4 se describe en la presente descripción. Las condiciones para la aminación reductiva incluyen combinar la cetona A2 y la amina secundaria D2 con un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio, en un solvente apropiado. En algunas modalidades de D2, R3 y R4 se unen para formar un anillo heterocíclico que contiene uno o más heteroátomos, y la amina terciaria E2 resultante incluye tales grupos R³ y R⁴. En modalidades particulares, el lípido de aminoamina de E2 se oxida, además, para formar un lípido de aminoamida correspondiente que tiene un grupo oxo en un carbono en R³ o R⁴ que es adyacente al nitrógeno. En otras modalidades, el lípido de aminoamina de E2 se somete, además, a alquilación en cualquier carbono en R³ y/o R⁴.

Esquema 3



15 La amina de la fórmula F3 puede prepararse mediante la combinación de la cetona A3, amoníaco, dihidrógeno, y un catalizador en un solvente apropiado, opcionalmente, bajo alta presión. El lípido de amino-amida de la fórmula H3 puede prepararse mediante la combinación de la amina F3 con un ácido carboxílico activado G3 en un solvente apropiado, donde LG es un grupo saliente y R⁴ se describe en la presente descripción. Los LG ilustrativos incluyen halo (por ejemplo, cloruro, bromo o yodo), tosilato y triflato. El lípido de aminoamina de I3 puede prepararse mediante la combinación de la amida H3 con un agente reductor (por ejemplo, hidruro de litio aluminio, borano-tetrahidrofurano o borano-dimetilsulfuro). En modalidades particulares, el lípido de aminoamida de H3 se somete, además, a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. En otras modalidades, el lípido de aminoamina de I3 se somete, además, a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴.

Esquema 4



5 El lípido de amino-amida de la fórmula K4 puede prepararse mediante la combinación de cetona A4 y amina J4 en un solvente apropiado, donde LG es un grupo saliente y R¹, R², y R⁴ se describen en la presente descripción. Los LG ilustrativos incluyen halo (por ejemplo, cloruro, bromo o yodo), tosilato y triflato. El lípido de aminoamina de L4 puede prepararse al combinar la amida K4 con un agente reductor (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, borano-tetrahidrofurano o borano-dimetilsulfuro). En otras modalidades, el lípido de amino-amida de K4 se somete, además, a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. En otras modalidades, el lípido de aminoamina de L4 se somete, además, a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴.

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

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

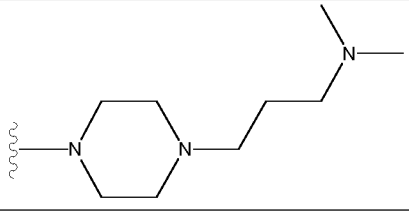
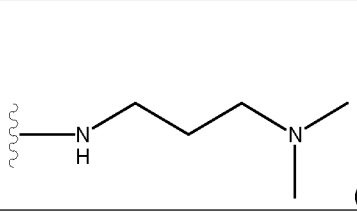
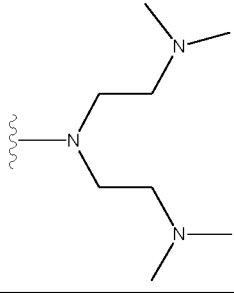
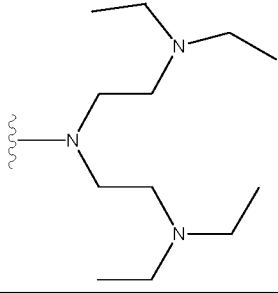
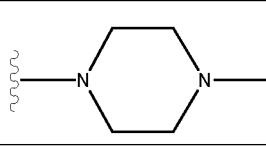
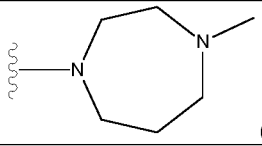
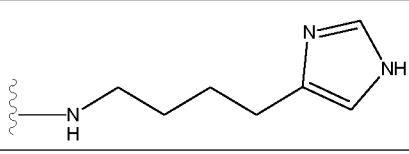
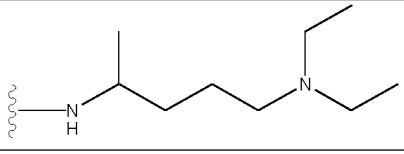
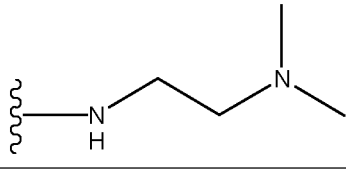
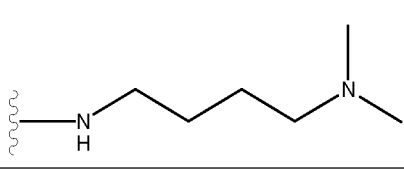
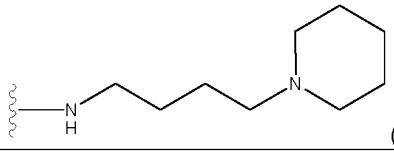
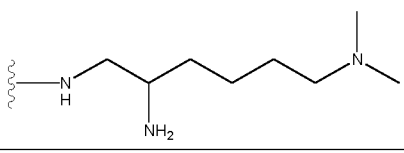
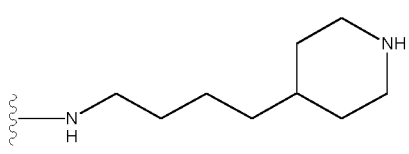
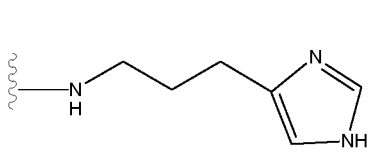
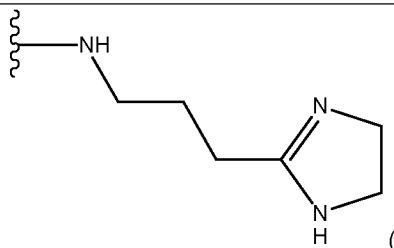
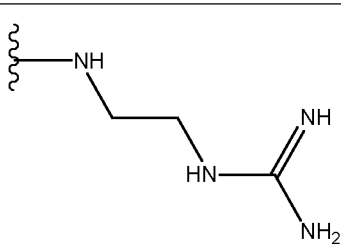
20 Cualquiera de los lípidos descritos en la presente descripción, por ejemplo, como en la Tabla 1, puede producirse mediante la aplicación de los esquemas sintéticos proporcionados anteriormente, los esquemas sintéticos descritos en la técnica y, si es necesario, mediante la realización de modificaciones conocidas por un experto en la técnica.

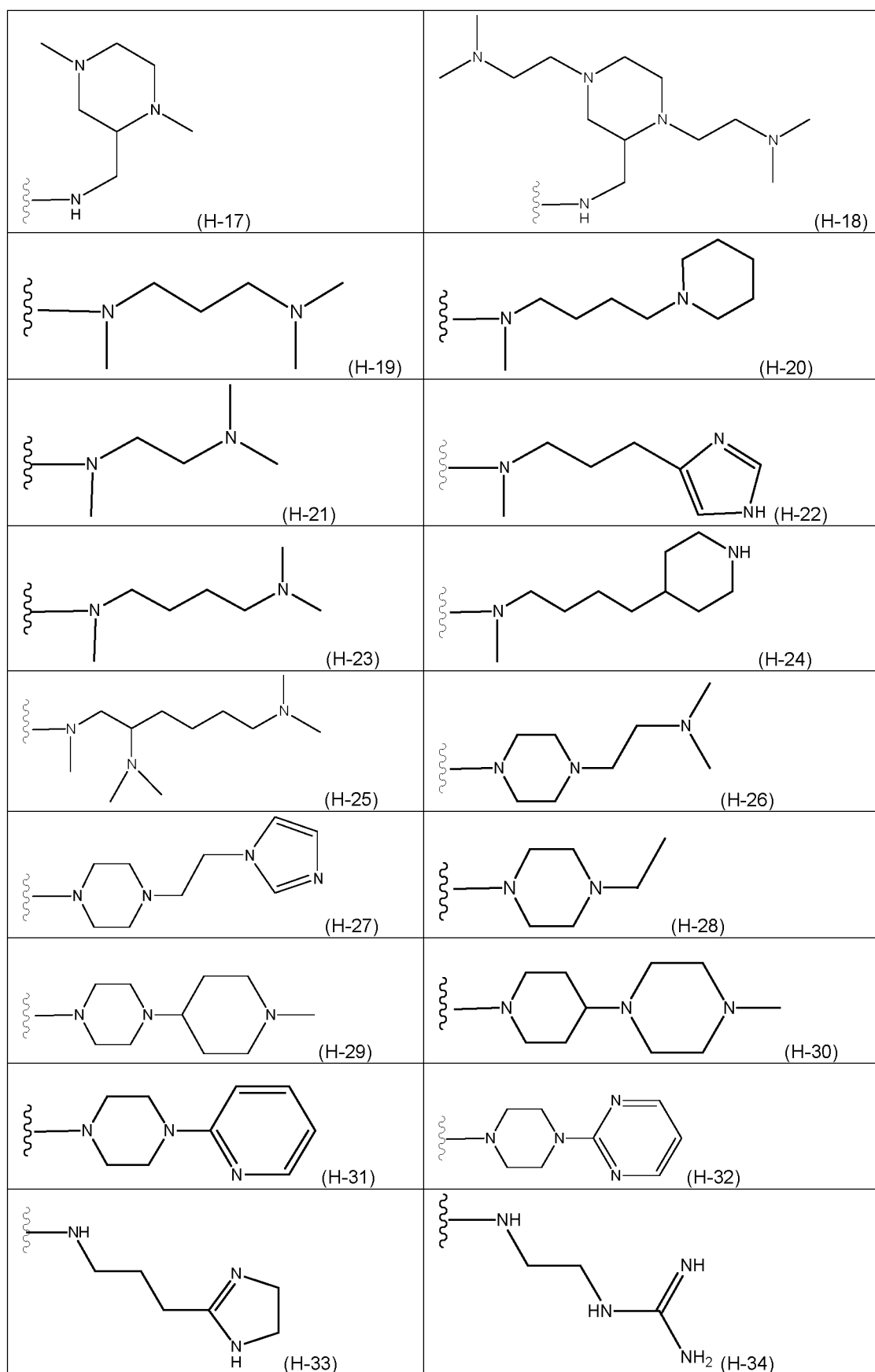
Grupos cabeza lipídicos

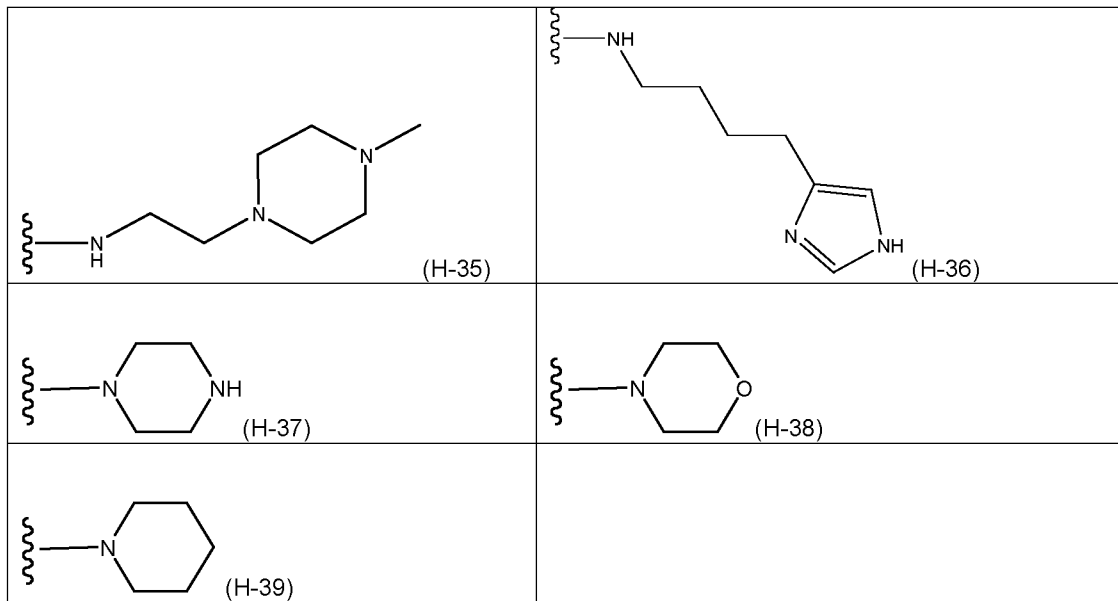
25 Los compuestos empleados en los procesos de la invención pueden incluir un grupo cabeza lipídico, una pieza de cabeza y uno o más grupos cola lipídicos. La pieza de cabeza, por ejemplo, >CH-, conecta el grupo cabeza al/a los grupo(s) de cola. En modalidades particulares, el grupo cabeza incluye dos o más átomos de nitrógeno. Cualquiera de los grupos cabeza descritos en la presente descripción, por ejemplo, en las Tablas 2 o 3, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes (por ejemplo, uno o más sustituyentes descritos en la presente descripción para alquilo).

35 En la Tabla 2 se proporciona una lista no limitante de grupos cabeza que tienen un grupo amina. Cualquiera de los grupos cabeza descritos en la presente descripción, por ejemplo, los grupos cabeza de H-1 a H-39 en la Tabla 2, pueden combinarse con cualquiera de los grupos cola descritos en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 4, mediante la pieza de cabeza >CH- para formar un compuesto de la invención.

Tabla 2: Ejemplos de grupos cabeza lipídicos

 <p>(H-1)</p>	 <p>(H-2)</p>
 <p>(H-3)</p>	 <p>(H-4)</p>
 <p>(H-5)</p>	 <p>(H-6)</p>
 <p>(H-7)</p>	 <p>(H-8)</p>
 <p>(H-9)</p>	 <p>(H-10)</p>
 <p>(H-11)</p>	 <p>(H-12)</p>
 <p>(H-13)</p>	 <p>(H-14)</p>
 <p>(H-15)</p>	 <p>(H-16)</p>

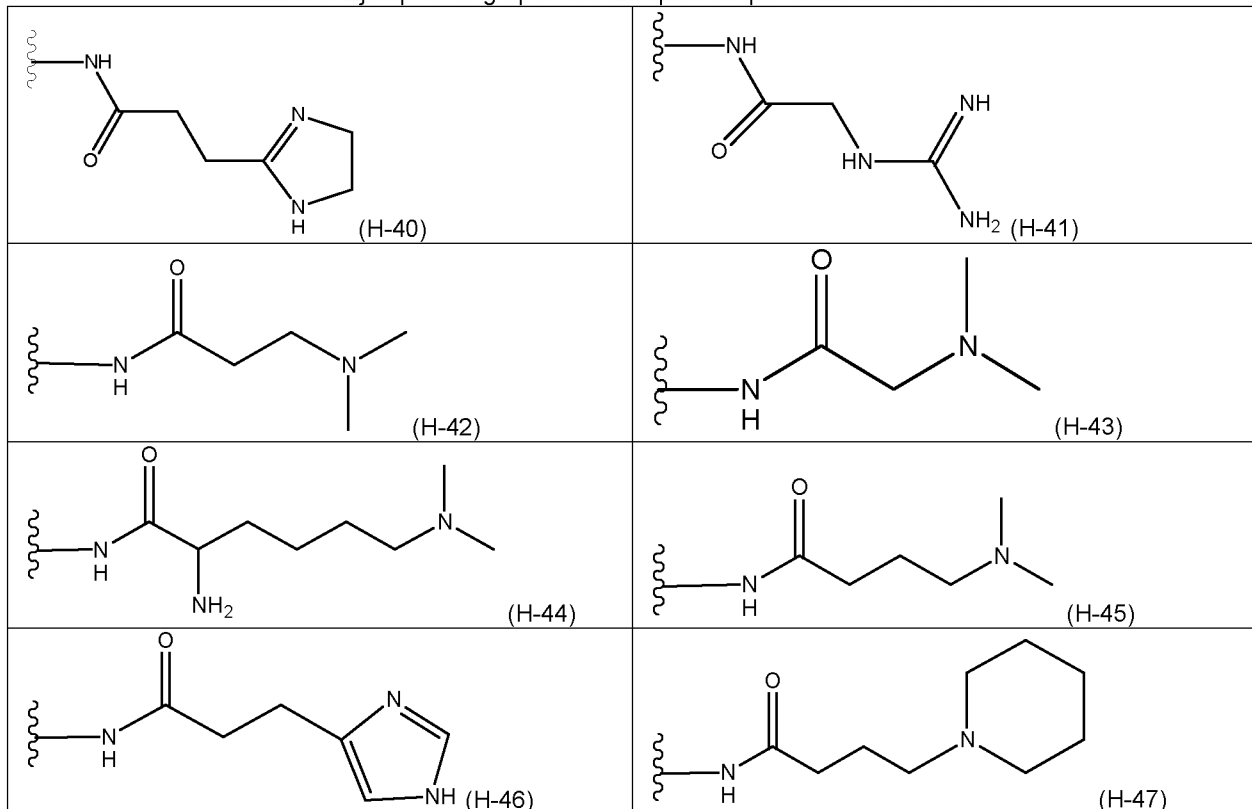


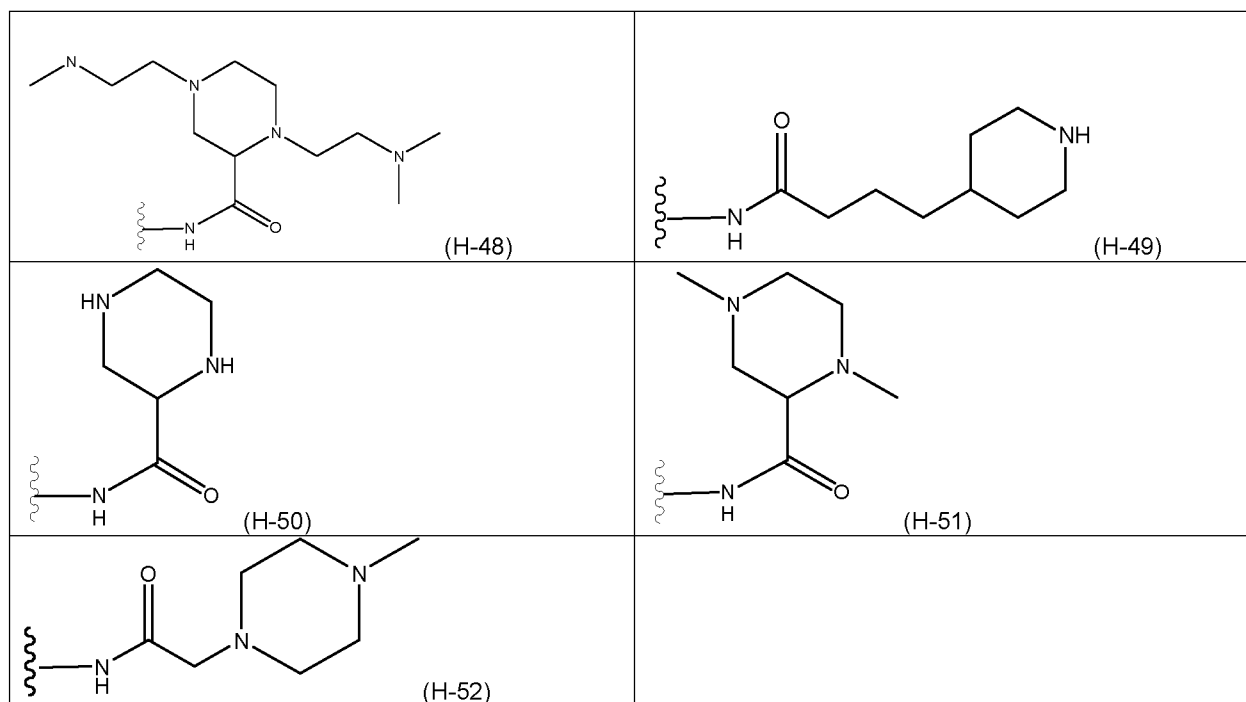


En la Tabla 3 se proporciona una lista no limitante de los grupos cabeza que tienen un grupo amida. Cualquiera de los grupos cabeza descritos en la presente descripción, por ejemplo, los grupos cabeza H-40 a H-52 en la Tabla 3, pueden combinarse con cualquiera de los grupos cola descritos en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 4, mediante la pieza de cabeza >CH- para formar un compuesto para usar en los procesos de la invención.

5

Tabla 3: Ejemplos de grupos cabeza lipídicos que contienen una amida

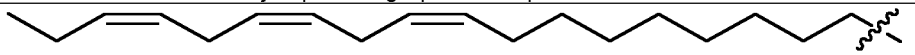
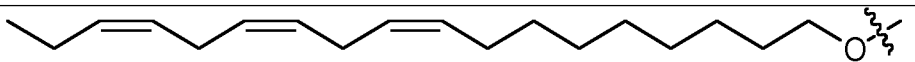
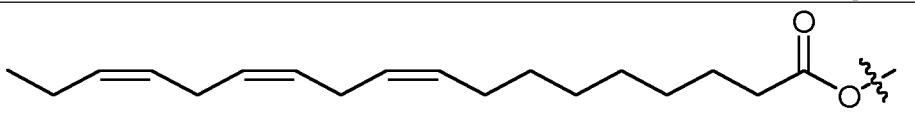
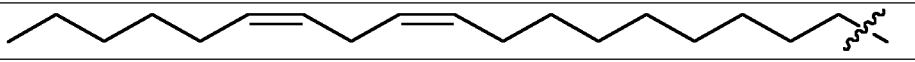
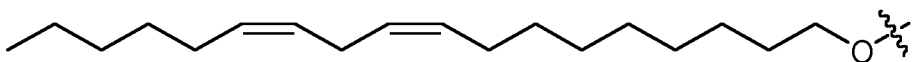
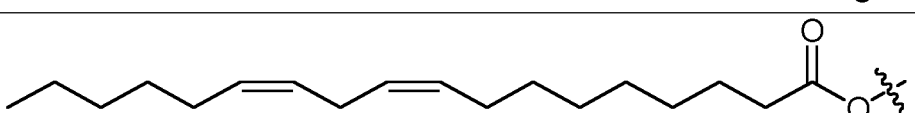
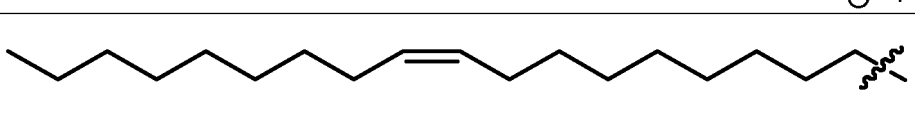


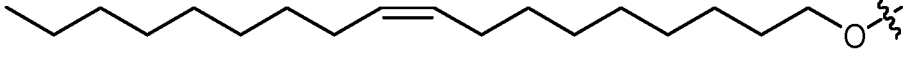
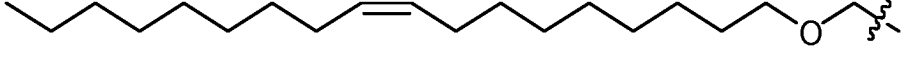
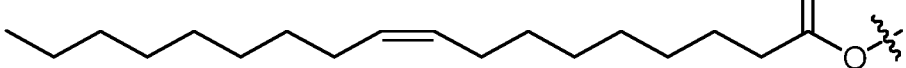
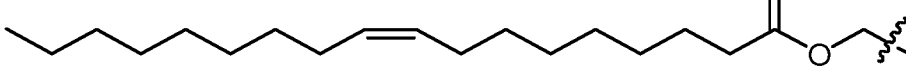
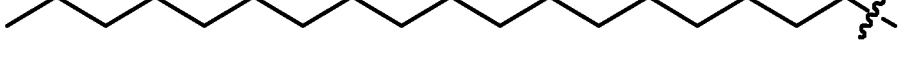
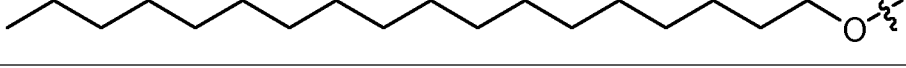
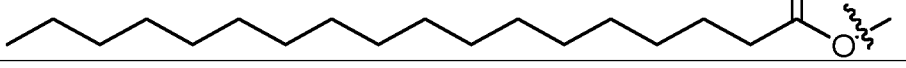


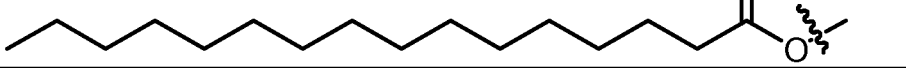
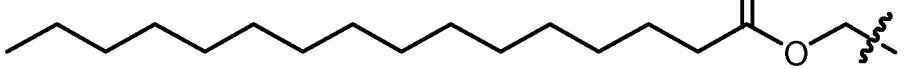


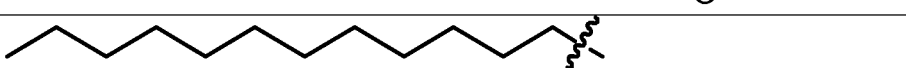
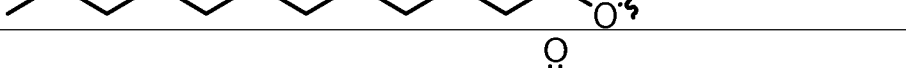
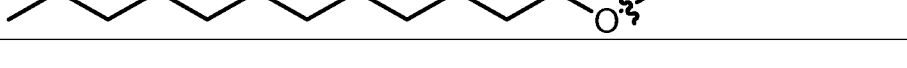



Grupos cola lipídicos

- 5 Como se describe en la presente descripción, los compuestos usados en los procesos de la invención generalmente incluyen uno o más grupos cola que pueden incluir opcionalmente uno o más heteroátomos. Para cada compuesto, los grupos cola pueden ser iguales o diferentes. Cualquiera de los grupos cola descritos en la presente descripción, por ejemplo, en la Tabla 4, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes (por ejemplo, uno o más sustituyentes descritos en la presente descripción para alquilo).
- 10 Los grupos cola ilustrativos incluyen grupos saturados e insaturados que tienen carbono o uno o más heteroátomos (por ejemplo, O), tal como linolenilo (C18:3), linoleniloxi (C18:3), linoleoilo (C18:3), linoleilo (C18:2), linoleiloxi (C18:2), y linoleoilo (C18:2); y cualquier grupo cola heteroatómica descrito en la presente descripción que se conecta a la pieza de cabeza mediante un metileno, por ejemplo, grupos cola seleccionados del grupo de linoleniloximetileno (C18:3), linoleoilmetileno (C18:3), y linoleiloximetileno (C18:2), o linoleoilmetileno (C18:2). En la Tabla 4 se proporciona una
- 15 lista adicional no limitante de grupos cola lipídicos.

Tabla 4: Ejemplos de grupos cola lipídicos

linolenilo (C18:3)	
linoleniloxi (C18:3)	
linoleoilo (C18:3)	
linoleilo (C18:2)	
linoleiloxi (C18:2)	
linoleoilo (C18:2)	
oleilo (C18:1)	

oleiloxi (18:1)	
oleiloximetile no (18:1)	
oleoilo (C18:1)	
oleoilmetileno (C18:1)	
estearilo (18:0)	
esteariloxi (C18:0)	
estearoilo (C18:0)	
palmitilo (16:0)	
palmitiloxi (C16:0)	
palmitoilo (C16:0)	
palmitoilmetileno (C16:0)	
miristilo (14:0)	
miristiloxi (C14:0)	
miristoilo (C14:0)	
laurilo (12:0)	
lauriloxi (12:0)	
lauriloilo (12:0)	

Medición de los valores de pKa de lípidos en nanopartículas ensambladas

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

El método de fluorescencia de TNS puede usarse para determinar la pKa aparente del lípido en la formulación. El TNS (ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico) es un colorante fluorescente cargado negativamente cuya fluorescencia se inactiva en presencia de agua. El TNS se reparte en una membrana con carga positiva y esto da como resultado un aumento de la fluorescencia debido a la eliminación del agua. Por lo tanto, el aumento en la fluorescencia puede usarse para estimar la ionización de un lípido catiónico cuando está presente en diferentes ambientes de pH. Los métodos para la determinación de pKa mediante el uso de TNS se conocen bien en la técnica.

Métodos para determinar la solubilidad

Los compuestos usados en los procesos de la invención, así como también las partículas y compuestos resultantes de los procesos de la invención, pueden evaluarse para determinar su solubilidad en un solvente particular. Los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier molécula lipídica (por ejemplo, catiónica, aniónica o lípido neutro), esterol, componente, partícula, o sus combinaciones, como se describe en la presente descripción.

La solubilidad puede medirse mediante cualquier método útil y/o mediante cualquier métrica útil. Los métodos y métricas ilustrativos incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (acoplada opcionalmente con un detector de dispersión de luz evaporativa), resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectroscopía UV/VIS, y métricas tales como el coeficiente de reparto (Log P), solubilidad (por ejemplo, medida por g de soluto por kg de solvente, g de soluto por dl (100 ml) de solvente, molaridad, molalidad, o fracción molar), concentración crítica de la micela, tamaño promedio de partícula, distribución de tamaño de partícula (por ejemplo, según lo determinado por el índice de polidispersión), homogeneidad de la solución resultante, y eficiencia de encapsulado (por ejemplo, de un agente aniónico, tal como cualquiera descrito en la presente descripción, por ejemplo, ARNiP D).

Formulaciones

Los compuestos usados en los procesos de la invención para sintetizar partículas y/o las partículas pueden combinarse con una o más moléculas lipídicas (por ejemplo, lípidos catiónicos, aniónicos, o neutros) para producir una formulación, o las partículas pueden ser la formulación. La formulación también puede incluir uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroides, conjugados PEG-lípido, conjugados poliamida-lípidos, gangliósidos, antioxidantes, surfactantes, agentes anfífilicos, o sales) y/o uno o más agentes aniónicos (por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos o agentes de iARN). Se describieron métodos de formulación de lípidos para incorporar agentes de ácido nucleico, ver, por ejemplo, Judge y otros, *J. Clin. Invest.* 119(3):661, 2009; Noble y otros, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64(4):741, 2009; Abrams y otros, *Mol. Ther.* 18(1):171, 2009; Yagi y otros, *Cancer Res.* 69(16):6531, 2009; Ko y otros, *J. Control. Release* 133(2):132, 2009; Mangala y otros, *Methods Mol. Biol.* 555:29, 2009.

Formulaciones con más de una molécula lipídica

Las formulaciones que incorporan las partículas de los procesos de la invención pueden incluir cualquier combinación útil de moléculas lipídicas (por ejemplo, un compuesto como se tabula en la presente descripción, un lípido catiónico (que incluye opcionalmente uno o más lípidos catiónicos, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos como se describe en la presente descripción y/u opcionalmente que incluyen uno o más lípidos catiónicos conocidos en la técnica), un lípido neutro, un lípido aniónico, y un conjugado PEG-lípido), que incluye conjugados polipéptido-lípido y otros componentes que ayudan en la formación o estabilidad de un vector lipídico, como se describe en la presente descripción. Las formulaciones que incorporan las partículas de los procesos de la invención pueden incluir otros componentes que ayudan en la formación o estabilidad.

El porcentaje de cada componente en la formulación puede equilibrarse para producir una partícula o vector lipídico capaz de encapsular un agente aniónico y transfectar el agente en una célula. Una formulación ilustrativa incluye de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más compuestos de la Tabla 1, de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más lípidos catiónicos, de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más conjugados PEG-lípido, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más lípidos neutros, y de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más derivados de esterol. En modalidades particulares, la formulación incluye de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 25 % mol (por ejemplo, aproximadamente 21,0 % mol, 21,2 % mol, 21,4 % mol, 21,6 % mol, 21,8 % mol, o 22 % mol) de uno o más compuestos de la Tabla 1, de aproximadamente 25 % mol a

aproximadamente 30 % mol (por ejemplo, aproximadamente 25,1 % mol, 25,2 % mol, 25,3 % mol, 25,4 % mol, 25,5 % mol, 25,6 % mol, 25,7 % mol, 25,8 % mol, 25,9 % mol, 26,0 % mol, 26,2 % mol, 26,4 % mol, 26,6 % mol, 26,8 % mol, o 27 % mol) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA), de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 15 % mol (por ejemplo, aproximadamente 13,0 % mol, 13,2 % mol, 13,4 % mol, 13,6 % mol, 13,8 % mol, 14 % mol, 14,1 % mol, 14,3 % mol, 14,5 % mol, 14,7 % mol, o 14,9 % mol) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC), de aproximadamente 2,5 % mol a aproximadamente 10 % mol (por ejemplo, aproximadamente 2,5 % mol, 2,6 % mol, 2,7 % mol, 2,8 % mol, 2,9 % mol, 3 % mol, 3,5 % mol, 4 % mol, 4,3 % mol, 4,5 % mol, 4,7 % mol, 5 % mol, 5,3 % mol, 5,5 % mol, 5,7 % mol, 6 % mol, 6,5 % mol, 6,7 % mol, 7 % mol, 7,5 % mol, 8 % mol, 8,5 % mol, o 9 % mol) de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, aproximadamente 2,8 % mol, 2,9 % mol, 3,0 % mol, 3,5 % mol, 3,7 % mol, 3,9 % mol, 4 % mol, 4,1 % mol, 4,3 % mol, 4,5 % mol, 4,7 % mol, 4,9 % mol, 5 % mol, 5,1 % mol, 5,3 % mol, 5,5 % mol, 5,7 % mol, 5,9 % mol, 6 % mol, 6,3 % mol, 6,5 % mol, 6,7 % mol, o 7 % mol de PEG2000-DSPE y/o PEG2000-DMPE y/o 3 % mol, 3,5 % mol, 3,7 % mol, 3,9 % mol, 4 % mol, 4,1 % mol, 4,3 % mol, 4,5 % mol, 4,7 % mol, 4,9 % mol, 5 % mol, 5,1 % mol, 5,3 % mol, 5,5 % mol, 5,7 % mol, 5,9 % mol, 6 % mol, 6,3 % mol, 6,5 % mol, 6,7 % mol, o 7 % mol de PEG2000-DMG), y de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 35 % mol (por ejemplo, aproximadamente 28,4 % mol, 28,6 % mol, 28,8 % mol, 29,0 % mol, 30 % mol, 31 % mol, 32 % mol, 33 % mol, 33,2 % mol, 33,4 % mol, 33,6 % mol, 33,8 % mol, 34 % mol, 34,4 % mol, 34,7 % mol, o 34,9 % mol) de un derivado de esteroles (por ejemplo, colesterol).

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

En algunas modalidades, la formulación incluye partículas lipídicas que tienen uno o más agentes de unión al ARN y uno o más lípidos de transfección, donde el uno o más agentes de unión al ARN incluyen de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA) y de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, tal como PEG2000-DMPE); y donde el uno o más lípidos de transfección incluyen de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, L-6, -30, o cualquiera en la Tabla 1), de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC), de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, por ejemplo, PEG2000-DMPE), y de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol).

El/los agente(s) de unión al ARN de una partícula lipídica pueden incluir una combinación de cualquier lípido y conjugado útil. En modalidades particulares, el contenido del lípido catiónico (por ejemplo, DODMA) es de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 20 % mol a 40 % mol, 20 % mol a 35 % mol, 20 % mol a 30 % mol, 15 % mol a 40 % mol, 15 % mol a 35 % mol, 15 % mol a 25 % mol, o 15 % mol a 20 % mol). En algunas modalidades, el conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, tal como PEG2000-DMPE) es de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % mol a 1 % mol, 0,5 % mol a 5 % mol, 0,5 % mol a 10 % mol, 1 % mol a 5 % mol, o 1 % mol a 10 % mol).

El/los lípido(s) de transfección de una partícula lipídica pueden incluir una combinación de cualquier lípido y conjugado útil. En modalidades particulares, el contenido de uno o más compuestos de la Tabla 1 (por ejemplo, L-6, -30, o cualquiera en la Tabla 1) es de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 40 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 10 % mol a 20 % mol, 10 % mol a 30 % mol, 10 % mol a 35 % mol, 15 % mol a 20 % mol, 15 % mol a 25 % mol, 15 % mol a 30 % mol, 15 % mol a 35 % mol, 15 % mol a 40 % mol, 20 % mol a 25 % mol, 20 % mol a 30 % mol, 20 % mol a 35 % mol, 20 % mol a 40 % mol, 25 % mol a 30 % mol, 25 % mol a 35 % mol, o 25 % mol a 40 % mol). En algunas modalidades, el contenido de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC) es de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 20 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 5 % mol a 10 % mol, 5 % mol a 15 % mol, 7 % mol a 10 % mol, 7 % mol a 15 % mol, 7 % mol a 20 % mol, 10 % mol a 15 % mol, o 10 % mol a 20 % mol). En algunas modalidades, el contenido de uno o más conjugados PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, tal como PEG2000-DMPE) es de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 10 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % mol a 1 % mol, 0,5 % mol a 5 % mol, 0,5 % mol, a 10 % mol, 1 % mol a 5 % mol, o 1 % mol a 10 % mol). En algunas modalidades, el contenido de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol) es de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 20 % mol a 25 % mol, 20 % mol a 30 % mol, 20 % mol a 35 % mol, 20 % mol a 40 % mol, 25 % mol a 30 % mol, 25 % mol a 35 % mol, o 25 % mol a 40 % mol).

En otras modalidades, los compuestos seleccionados de la Tabla 1 se usan en la formulación del/de los agente(s) de unión a ARN (por ejemplo, aproximadamente 25,9 % mol de L-6, L-30, L-48, o L-49). En modalidades particulares, el compuesto seleccionado de la Tabla 1 usado en la formulación del/de los agente(s) de unión a ARN es diferente del

compuesto (opcionalmente de la Tabla 1) usado en la formulación del/de los lípido(s) de transfección (por ejemplo, 25,9 % mol de L-48 como el agente de unión a ARN, y 21,6 % mol de L-30 como el lípido de transfección). En algunas modalidades de la formulación, el uno o más agentes de unión a ARN forma un agregado interno, y el uno o más lípidos de transfección forma una superficie externa agregada. En modalidades particulares, la superficie externa agregada no es una membrana, una bicapa lipídica, y/o una capa multilamelar.

La formulación también puede incluir cualquier cantidad útil de uno o más conjugados PEG-lípido. En algunas modalidades, el contenido de conjugado PEG-lípido en la formulación es de aproximadamente 1 % mol y aproximadamente 20 % mol (por ejemplo, de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 2 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 4 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 7 % mol, de aproximadamente 4 % mol a aproximadamente 8 % mol, de aproximadamente 8 % mol a aproximadamente 12 % mol, de aproximadamente 12 % mol a aproximadamente 16 % mol, o de aproximadamente 16 % mol a aproximadamente 20 % mol). En otras modalidades, el contenido de conjugado PEG-lípido es de aproximadamente 7 mol, 6 mol, 3,0 mol, o 2,5 % mol. Además, el contenido de PEG-lípido puede variar de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 20 % mol, mediante el ajuste apropiado del contenido de DSPC o colesterol, o de ambos. El PEG-lípido puede variarse mediante el uso de C14:0 (como en la Tabla 4, por ejemplo, PEG-DSPE o PEG-DMPE, etc.), C16 (PEG-DPPE, PEG-DPG, etc.), C18:0 (PEG-DSPE, PEG-DSG, etc.), o C18:1 (PEG-DOPE, PEG-DOG, etc.). Además, pueden usarse porciones de PEG de diferente peso molecular (PEG2000, PEG3400, PEG5000, etc.). En modalidades particulares, se usan conjugados de PEG mixtos, como se describe en la presente descripción. En modalidades particulares, se usa PEG2000-DSPE. En modalidades particulares, se usa PEG2000-DMPE.

Formulaciones con agentes de iARN

Los procesos de la invención pueden usarse para producir una partícula y/o formulación que contiene un agente de iARN mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, ver: Judge y otros, *J. Clin. Invest.* 119(3):661, 2009; Noble y otros, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64(4):741, 2009; Abrams y otros, *Mol. Ther.* 18(1):171, 2009; Yagi y otros, *Cancer Res.* 69(16):6531, 2009; Ko y otros, *J. Control. Release* 133(2):132, 2009; Mangala y otros, *Methods Mol. Biol.* 555:29, 2009.

La partícula y/o formulación puede incluir un agente de iARN y una molécula lipídica y/o uno o más componentes en cualquier relación útil. Las relaciones ilustrativas incluyen de una relación (p/p) de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:100 (p/p) (por ejemplo, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50, por ejemplo, aproximadamente 1:20) de la relación agente de iARN:lípido total, donde la relación de lípido total es el peso de la combinación de una o más moléculas lipídicas (por ejemplo, lípidos catiónicos, aniónicos, o neutros) y uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroides, conjugados PEG-lípidos, conjugados poliamida-lípidos, gangliósidos, antioxidantes, surfactantes, agentes anfífilicos, o sales). En una modalidad, la relación lípido a fármacos (relación masa/masa) (por ejemplo, relación lípidos a ARNd_h) estará en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1, o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1.

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

Métodos para preparar formulaciones

Las partículas de la invención pueden prepararse con una diversidad de procesos útiles. En un procedimiento ilustrativo, los componentes de las partículas de la invención (por ejemplo, uno o más lípidos) se disuelven en un solvente (por ejemplo, un solvente acuoso, un solvente no acuoso, o mezclas de solventes de estos). Los solventes aprobados por la FDA ilustrativos para su uso en los procesos de la invención incluyen ácido acético, acetona, acetonitrilo, anisol, benceno, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, terc-butilmetil éter, tetracloruro de carbono, clorobenceno, cloroformo, cumeno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, n,n-dimetilacetamida, n,n-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, 1,4-dioxano, etanol, 2-etoxietanol, acetato de etilo, etilenglicol, éter etílico, formato de etilo, formamida, ácido fórmico, heptano, hexano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, metanol, 2-metoxietanol, acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metilbutilcetona, metilciclohexano, metiletilcetona, metilisobutilo cetona, 2-metil-1-propanol, n-metilpirrolidona, nitrometano, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol, acetato de propilo, piridina, sulfolano, tetrahidrofurano, tetralina, tolueno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, xileno y sus combinaciones. La suspensión lipídica resultante puede filtrarse opcionalmente, mezclarse (por ejemplo, mezclarse en lote, mezclarse en línea, y/o agitarse en vórtice), evaporarse (por ejemplo, mediante el uso de una corriente de nitrógeno o argón), resuspenderse (por ejemplo, en un solvente acuoso, un solvente no acuoso, o mezclas de solventes de estos), congelarse, extrudirse, y/o sonicarse. Además, la suspensión lipídica puede procesarse opcionalmente al combinarse con cualquiera de los componentes deseados (por ejemplo, agentes aniónicos (por ejemplo, uno o más agentes de iARN), agentes de unión al ARN, lípidos de transfección, y/o cualquiera de los lípidos descritos en la presente descripción) para producir una suspensión final. El

uno o más componentes deseados pueden proporcionarse en el mismo solvente o en uno diferente a la suspensión. Por ejemplo, la suspensión lipídica puede proporcionarse en un primer solvente o sistema solvente (por ejemplo, una solución acuosa ácida tal como agua-HCl, o uno o más solvente(s) acuoso(s) o no acuoso(s), tal como agua, agua-etanol, tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle (EBSS), carbonato, lactato, ascorbato, y citrato, tal como 5 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, o 150 mM)), solución de osmolalidad fisiológica (290 mOsm/kg, por ejemplo, solución salina al 0,9 %, dextrosa al 5 %, y sacarosa al 10 %), solución salina, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, terc-butanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, cloroformo, diclorometano, hexano, ciclohexano, acetona, éter, éter dietílico, dioxano, éter isopropílico, tetrahidrofurano, o sus combinaciones), y el agente aniónico (por ejemplo, agente de iARN) puede proporcionarse en un segundo solvente o sistema solvente, por ejemplo, uno o más solvente(s) acuoso(s) o no acuoso(s), tal como agua, agua-HCl, agua-etanol, tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle (EBSS), carbonato, lactato, ascorbato, y citrato, tal como 5 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, o 150 mM)), solución de osmolalidad fisiológica (290 mOsm/kg, por ejemplo, solución salina al 0,9 %, dextrosa al 5 %, y sacarosa al 10 %), solución salina, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, terc-butanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, cloroformo, diclorometano, hexano, ciclohexano, acetona, éter, éter dietílico, dioxano, éter isopropílico, tetrahidrofurano, o sus combinaciones). Las concentraciones ilustrativas de solventes acuosos y/o tampones incluyen de aproximadamente 4 % a aproximadamente 8 % de etanol (por ejemplo, de aproximadamente 4 % a 5 %, 5 % a 6 %, 6 %, a 7 %, o 7 % a 8 %), de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de citrato (por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a 30 mM, 30 mM a 50 mM, 50 mM a 70 mM, 70 mM a 90 mM, o 90 mM a 100 mM). Cualquiera de los solventes o sistemas solventes puede incluir uno o más estabilizadores, tales como un antioxidante, una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), ácido cítrico, ácido ascórbico, glicina, cisteína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), manitol, lactosa, trehalosa, maltosa, glicerol, y/o glucosa. En ejemplos adicionales, el uno o más agentes aniónicos se introducen en una suspensión lipídica mediante el uso de un primer solvente o sistema solvente y después le sigue la adición de uno o más lípidos adicionales (por ejemplo, lípidos de transfección) en un segundo solvente o sistema solvente, donde el primer y segundo solventes o sistemas solventes son iguales o diferentes (por ejemplo, el primer solvente o sistema solvente es cualquiera descrito en la presente descripción; y el segundo solvente o sistema solvente es cualquiera descrito en la presente descripción). En modalidades particulares, el segundo solvente o sistema solvente incluye uno o más solventes acuosos o no acuosos seleccionados del grupo que consiste en solución salina, tampón (por ejemplo, citrato o PBS), agua, y etanol. La suspensión final puede separarse opcionalmente (por ejemplo, por ultracentrifuga), mezclarse (por ejemplo, mezclarse en lote, mezclarse en línea, y/o agitarse en vórtice), resuspenderse, ajustarse (por ejemplo, con uno o más solventes o sistemas tampones), sonicarse, congelarse-descongelarse, extrudirse, y/o purificarse.

Lípidos catiónicos

Uno o más lípidos catiónicos pueden incluirse en las partículas y/o formulaciones producidas mediante los métodos de la invención. En adición a los compuestos de la Tabla 1, otros lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a: Cloruro de *N,N*-dioleil-*N,N*-dimetilamonio (DODAC), 1,2-di-*O*-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), *N,N*-diestearil-*N,N*-dimetilamonio (DDAB), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP, que incluye las formas quirales R-DOTAP y S-DOTAP), *N*-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-*N*-2-(espermincarboxamido)etil)-*N,N*-dimetilamonio (DOSPA), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina (DOGS), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), *N,N*-dimetil-(2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), *N*-(1,2-dimirilistiloxiprop-3-il)-*N,N*-dimetil-*N*-hidroxietilamonio (DMRIE), 1,2-dilinoileloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1-linoileoil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileilitio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), (3aR,5 s,6aS)-*N,N*-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina, (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-*O*-etil-3-fosfocolina (DPePC), cloruro de diestearildimetilamonio (DSDMA), 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (12:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro de este), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro de este), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro de este), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:1 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro de este), dipalmitoil fosfatidiletanolamidoespermina (DPPE), dipalmitoil fosfatidil etanolamido L-lisina (DPPEL), cloruro de 1-[2-dioleiloxi]etil]-2-oleil-3-(2-hidroxi)imidazolinio (DOTIM), (1-metil-4-(*cis*-9-dioleil) metil-piridinio-cloruro)) (SAINT), y C12-200, como se describió en Love y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5):1864-1869 (2010).

Los lípidos catiónicos incluyen los de diferentes formas quirales (por ejemplo, las formas R o S de cualquier lípido catiónico descrito en la presente descripción) o cualquier forma de sal (por ejemplo, sal de cloruro, bromuro, trifluoroacetato, o metanosulfonato de cualquier lípido catiónico descrito en la presente descripción).

Adicionalmente, una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos pueden incluirse en la partícula y/o formulación. Tales preparaciones comerciales incluyen, pero no se limitan a: Lipofectamine™ (una combinación de

DOSPA y DOPE) y Lipofectin® (una combinación de DOTMA y DOPE) de Invitrogen Corp.; y Transfectam® (una composición que incluye DOGS) y Transfast™ de Promega Corp.

Lípidos aniónicos

5 Uno o más lípidos aniónicos pueden incluirse en la formulación y/o partículas de los métodos de la presente invención. Tales lípidos aniónicos incluyen, pero no se limitan a: fosfatidilgliceroles (PG), cardiolípidos (CL), diacilfosfatidilserinas (PS), ácidos diacilfosfatídicos (PA), fosfatidilinositoles (PI), N-acilfosfatidiletanolaminas (NAPE), N-succinilfosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilgliceroles, y palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), así como también diferentes formas quirales (por ejemplo, formas R o S), formas de sales (por ejemplo, sales de cloruro, bromuro, trifluoroacetato, o metanosulfonato), y mezclas de estas.

Lípidos neutros

15 Uno o más lípidos neutros pueden incluirse en la formulación y/o partículas de los métodos de la presente invención. Tales lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a: ceramidas, esfingomiélin (SM), diacilgliceroles (DAG), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, que incluye las formas quirales R-DSPC y S-DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dioleoil-glicero-sn-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dielaidoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DEPE), 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (SOPE), 1,2-dilinoiloleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), así como también diferentes formas quirales (por ejemplo, formas R o S), formas de sal (por ejemplo, sales de cloruro, bromuro, trifluoroacetato, o metanosulfonato), y mezclas de estas. Otros lípidos de diacil-sn-glicero-3-fosfocolina y diacil-glicero-sn-3-fosfoetanolamina también pueden usarse en las partículas de lípidos de la invención.

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

Derivados de esteroles

35 Uno o más derivados de esteroles pueden incluirse en la formulación y/o partículas de los métodos de la presente invención. Sin desear limitarse por la teoría, pueden usarse derivados de esteroles para estabilizar la formulación/partículas y/o aumentar la transfección. Los derivados ilustrativos de esteroles incluyen colesterol, derivados de colestanol (por ejemplo, colestano, colesteno, o coprostanol); 3β-[(N,N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol, por ejemplo, una sal de hidrocloreto de este); bis-guanidino-tren-colesterol (BGTC); 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato de (2S,3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptán-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo)carbonilamino)etilo (DPC-1); 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato de (2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptán-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo) (DPC-2); 2,3,4-trihidroxipentanodioato de bis((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptán-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo) (DPC-3); y 6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptán-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo)oxidofosforilo)2,3,4,5-tetrahidroxihexanoato (DPC-4).

Conjugados PEG-lípido

50 Uno o más conjugados PEG-lípido pueden incluirse en la formulación y/o partículas de los métodos de la presente invención. Sin desear limitarse por la teoría, los conjugados PEG-lípido podrían actuar para reducir la agregación de vectores lipídicos. Los conjugados PEG-lípido se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,885,613 y la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2003/0077829.

55 Los conjugados PEG-lípido que pueden incluirse en la formulación y/o partículas incluyen, pero no se limitan a: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DMPE o DMPE-PEG) (por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol)-2000) (PEG-2000-DMPE o DMPE-PEG o DMPE-PEG2k)), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DPPE o DPPE-PEG), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DSPE o DSPE-PEG), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DOPE o DOPE-PEG), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DMG o DMG-PEG) (por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-2000-DMG o DMG-PEG o DMG-PEG2k)), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DPG o DPG-PEG), 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DSG o DSG-PEG), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol)) (PEG-DOG o DOG-PEG), 3-N-[(ω-metoxipoli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristoloxi-propilamina (PEG-C-DMA), R-3-[(ω-metoxi

poli(etilenglicol)2000carbamoil)]-1,2-dimiristiloxilpropil-3-amina (PEG-2000-C-DOMG), y conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20, que se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,820,873). Los conjugados PEG-lípido adicionales incluyen el conjugado de PEG a cualquier lípido descrito en la presente descripción, tal como fosfatidiletanolamina o ceramida (ver, las patentes de Estados Unidos núms. 5,820,873; 5,534,499; y 5,885,613), y las formas de sal de cualquier conjugado de PEG-lípido descrito en la presente descripción (por ejemplo, sales de sodio, amonio o trimetilamonio).

El conjugado PEG-lípido puede incluir una o más modificaciones diversas, tales como sustituciones con cualquier molécula lipídica descrita en la presente descripción o con restos de PEG de diferentes pesos moleculares (por ejemplo, de 300 a 5000 daltons). Las sustituciones ilustrativas incluyen el uso de uno o más de C14:0 (como en la Tabla 4), C16 (PEG-DPPE, PEG-DPG, etc.), C18:0 (PEG-DSPE, PEG-DSG, etc.) o C18:1 (PEG-DOPE, PEG-DOG, etc.) en combinación con una porción de polietilenglicol (por ejemplo, PEG2000, PEG3400, PEG5000, etc.) para formar un conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, mPEG2000-DMG). Los ejemplos de restos de PEG con varios pesos moleculares incluyen PEG350, PEG550, PEG750, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG3400, PEG4000 y PEG5000.

Lípidos ilustrativos

La formulación y/o partículas pueden incluir uno o una combinación de cualquiera de los lípidos reconocidos en la técnica u otros componentes asociados, que incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,756,054; 5,976,567; 6,815,432; 6,858,225; 6,020,526; 6,638,529; 6,670,393; 6,034,135; 5,958,901; 6,172,049; 8,324,366; 8,158,601; 8,034,376; 8,329,070; 7,901,708;

8,283,333; 8,236,943; 8,188,263; 8,101,741; 8,058,069; 7,982,027; 7,803,397; 7,915,399; 7,807,815; 7,799,565; 7,745,651; 6,841,537; 6,410,328; 7,811,602; 7,244,448; y 8,227,443, así como también la solicitud núm. US 2012/0294905; US 2012/0244207; US 2012/0046478; US 2012/0183602; US 2012/0128760; US 2012/0101148; US 2009/0163705; US 2012/0016006; US 2003/0077829; WO 2010/088537; WO 2010/036962; US 2012/0095075; US 2012/0058144; US 2012/0027796; US 2011/0311583; US 2012/0027803; WO 2010/048536; WO 2011/038031; WO 2009/132131; WO 2009/100351; WO 2004/064737; WO 2004/030634; WO 2011/071860; WO 2013/013017; WO 2013/013013; WO 2010/057217; WO 2010/036962; WO 2011/153493; WO 2011/075656; WO 2010/144740; WO 2009/086558; WO 2010/054405; WO 2010/054401; WO 2010/054384; US 2011/0086826; US 2012/0225434; US 2011/0117125; WO 2009/086558; US 2011/0256175; WO 2010/042877; US 2010/0041152; US 2009/0285878; WO 2009/108235; WO 2009/108235; US 2011/0216622; US 2004/0142025; WO 2004/002453; US 2012/0202871; US 2011/0076335; WO 2011/000106; WO 2011/000107; US 2011/0195127; WO 2011/000108; US 2011/0178155; WO 2009/129319; US 2012/0328668; US 2009/0270481; US 2007/0135372; WO 2007/051303; US 2012/0183581; US 2010/0130588; US 2009/0291131; WO 2009/127060; WO 2009/082817; US 2012/0058188; US 2011/0091525; US 2006/0240093; US 2005/0175682; US 2005/0064595; WO 2005/007196; US 2005/026372; WO 2005/007196; US 2011/0224418; US 2008/0249046; US 2006/0051405; US 2006/0025366; WO 2006/007712; WO 2006/002538; WO 2006/007712; US 2011/0262527; US 2011/0060032; US 2006/0083780; US 2006/0008910; WO 2005/120152; WO 2005/121348; WO 2005/120152; US 2005/0118253; US 2013/0022649; WO 2011/066651; US 2012/0172411; US 2011/0313017; US 2011/0201667; WO 2011/011447; US 2011/0189300; US 2006/0134189; WO 2006/053430; US 2011/0177131; US 2007/0135370; WO 2007/048046; US 2011/0071208; US 2009/0149403; US 2008/0171716; WO 2008/019486; US 2007/0218122; WO 2007/056861; US 2007/0054873; US 2007/0042031; WO 2007/012191; WO 2002/088370; US 2003/0108886; WO 2002/088370; WO 2002/087541; WO 2011/038160; WO 2010/083615; WO 2011/141705; WO 2011/141704; WO 2012/000104; WO 2011/141703; WO 2010/105372; y WO 2006/074546.

Otros componentes

La formulación y/o partículas pueden incluir cualquier otro componente para ayudar a estabilizar el vector lipídico, reducir la agregación de vectores lipídicos, y/o suministrar un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN). Los componentes ilustrativos incluyen conjugados poliamida-lípido (ATTA-lípidos) basados en monómeros de ácido alcanóico ω-amino (oligoetilenglicol), tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,320,017 y 6,586,559, que se incorporan en la presente descripción como referencia; gangliósidos (por ejemplo, asialogangliósido GM1 o GM2; disialogangliósido GD1a, GD1a-NAcGal, GD1-b, GD2, o GD3; globósido, monosialogangliósido GM1, GM2, o GM3, tetrasialogangliósido GQ1b, y trisialogangliósido GT1a o GT1b); antioxidantes (por ejemplo, α-tocoferol o β-hidroxitoluidina); uno o más surfactantes (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán o monopalmitato de sorbitán, ésteres de sacarosa acitosos, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitol, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, éteres de polioxietilenoalquilo, éteres de polioxietileno esterol, éteres de polioxietileno-polipropoxialquilo, polímeros de bloque y éter cetílico, así como también aceite de ricino de polioxietileno o derivados de aceite de ricino hidrogenado y ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, tales como Pluronic®, Poloxamer®, Span®, Tween®, Polysorbate®, Tyloxapol®, Emulphor®, o Cremophor® (por ejemplo, Cremophor® EL que tiene un componente principal de ricinoleato de glicerol-polietilenglicol con ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol); uno o más agentes anfífilicos (por ejemplo, aceites vegetales, tales como aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de borraja, aceite de ricino, y aceite de semilla de algodón; aceites minerales y aceites marinos, triglicéridos hidrogenados y/o fraccionados de tales fuentes; triglicéridos de cadena media (MCT-aceites, por ejemplo, Miglyol®), y varios mono-, di- o triglicéridos sintéticos o semisintéticos, tales como los lípidos no polares definidos descritos en el documento WO 92/05571, así como también monoglicéridos

acetilados, o ésteres de alquilo de ácidos grasos, tal miristato de isopropilo, oleato de etilo (ver el documento EP 0 353 267) o alcoholes de ácidos grasos, tales como oleil alcohol, alcohol cetílico); y una o más sales, tales como cualquier sal descrita en la presente descripción. Típicamente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación es de aproximadamente 1 % mol a 15 % mol.

5

Vectores lipídicos

La formulación y/o partículas de los métodos de la invención pueden incluir uno o más compuestos seleccionados de la Tabla 1, y/o cualquier composición a base de lípidos capaz de transportar un agente terapéutico (por ejemplo, un agente aniónico, tal como un agente de iARN). Las composiciones basadas en lípidos ilustrativas incluyen una o más moléculas lipídicas (por ejemplo, compuestos de la Tabla 1, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, o lípidos neutros) y/o uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroil y/o conjugados PEG-lípido).

10

Los vectores lipídicos pueden formarse mediante el uso de cualquier lípido o combinación de lípidos biocompatibles capaces de formar un vector lipídico (por ejemplo, liposomas, lipoplejos y micelas). La encapsulación de un agente terapéutico en un vector lipídico puede proteger al agente del daño o degradación o facilitar su entrada en una célula. Los vectores lipídicos, como resultado de las interacciones de carga (por ejemplo, un vector lipídico catiónico y una membrana celular aniónica), interactúan y se fusionan con la membrana celular, y liberan de esta manera el agente en el citoplasma. Un liposoma es una vesícula con bicapa que comprende uno o más compuestos de la invención, moléculas lipídicas, y/o componentes. Una nanopartícula lipídica es un liposoma que cuyo tamaño está en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm. Un lipoplejo es un liposoma formado con moléculas lipídicas catiónicas para impartir una carga positiva general al liposoma. Una micela es una vesícula con una única capa de moléculas lipídicas.

15

20

Liposomas

En determinadas modalidades, el vector lipídico es un liposoma. Típicamente, los lípidos usados son capaces de formar una bicapa y son catiónicos. Las clases de moléculas lipídicas adecuadas incluyen fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina), ácidos grasos, glucolípidos, ceramidas, glicéridos, y colesterolos, o cualquiera de sus combinaciones. Alternativamente o en adición, el vector lipídico puede incluir lípidos neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)). Otros lípidos que pueden formar vectores lipídicos se conocen en la técnica y se describen en la presente descripción.

30

Como se usa en la presente descripción, una "molécula lipídica" es una molécula con una porción cabeza hidrófoba y una porción cola hidrófila y puede ser capaz de formar liposomas, que incluyen un compuesto de la Tabla 1 o cualquier lípido catiónico, neutro, o aniónico descrito en la presente descripción. La molécula lipídica puede modificarse opcionalmente para incluir grupos de polímeros hidrófilos. Los ejemplos de tales moléculas lipídicas incluyen 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE), por ejemplo, una sal de amonio de este) y 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[carboxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE carboxi).

35

40

Los ejemplos de moléculas lipídicas incluyen lípidos naturales, tales como la cardiolipina (CL), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), y fosfatidilserina (PS); mezclas de lípidos, tales como lecitina; esfingolípidos, tales como esfingosina, ceramida, esfingomielina, cerebrósidos, sulfátidos, gangliósidos, y fitoesfingosina; lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDAB), 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol), bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DORIE), y 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA); fosfatidilcolinas, tales como 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), y 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC); fosfoetanolaminas, tales como 1,2-dibutiril-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), y 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-(glutarilo); ácidos fosfatídicos, tales como fosfato de dicetilo (DCP), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato, y 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfato; fosfatidilgliceroles, tales como dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), y 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol); fosfatidilserinas, tales como 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina, y 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina; cardiolipinas, tales como 1',3'-bis[1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol; y conjugados PEG-lípido, tales como 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metoxi(polietilenglicol)-750], 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], y 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[carboxi(polietilenglicol)-2000].

50

55

60

65

Los compuestos tales como los de la Tabla 1 pueden combinarse con cualquier composición lipídica útil, que incluye composiciones lipídicas disponibles comercialmente. Los ejemplos de tales composiciones incluyen Lipofectamine™ (una combinación de DOSPA y DOPE) y Lipofectin® (una combinación de DOTMA y DOPE) de Invitrogen Corp.; Transfectam® (una composición que incluye DOGS) y Transfast™ de Promega Corp.; NeuroPORTER™ y Escort™ de Sigma-Aldrich Co.; FuGENE® 6 de Roche; y LipoTAXI® de Strategene. Las composiciones lipídicas conocidas incluyen la tecnología Trojan Horse Lipsome, como se describió en Boado, *Pharm. Res.* 24:1772-1787 (2007).

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

El liposoma puede ser de cualquier combinación útil que comprende moléculas lipídicas, que incluyen, por ejemplo, uno o más compuestos de la Tabla 1 y otros componentes lípidos que ayudan en la formación o estabilidad de liposomas. Un experto en esa técnica sabrá cómo optimizar la combinación que favorece la encapsulación de un agente particular, la estabilidad del liposoma, las condiciones de reacción aumentadas, o cualquier otro factor pertinente. Las combinaciones ilustrativas se describen en Boado, *Pharm. Res.* 24:1772-1787 (2007).

La producción de liposomas típicamente se produce mediante un proceso general de dos etapas. En la primera etapa, los lípidos y los componentes lípidos se mezclan en un solvente orgánico volátil o mezclas de solventes para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. Los ejemplos de solventes incluyen cloroformo, metanol, ciclohexano, y t-butanol. El solvente se retira entonces para formar una mezcla de lípidos secos en una película, polvo, o gránulos. El solvente también puede eliminarse mediante el uso de cualquier técnica analítica conocida, tal como mediante el uso de nitrógeno, evaporación giratoria, secado por pulverización, liofilización, y secado al vacío.

En la segunda etapa, la mezcla de lípidos secos se hidrata con una solución acuosa para formar liposomas. El agente puede adicionarse a la solución acuosa, lo que resulta en la formación de liposomas con agente encapsulado. Alternativamente, los liposomas se forman primero con una primera solución acuosa y después se exponen a otra solución acuosa que contiene el agente. La encapsulación del agente puede promoverse mediante cualquier técnica conocida, tal como mediante ciclos de congelación-descongelación repetidos, sonicación, o mezcla. Un ejemplo adicional de este enfoque se describe en Boado, *Pharm. Res.* 24:1772-1787 (2007). Alternativamente, el agente se acopla a una porción hidrófoba (por ejemplo, colesterol) para producir un derivado lipofílico y el derivado lipofílico se usa con otras moléculas lipídicas para formar liposomas.

Durante la segunda etapa, la mezcla de lípidos secos puede contener o no el conjugado polipéptido-lípido. El proceso puede incluir opcionalmente varias etapas adicionales, incluir calentar la solución acuosa más allá de la temperatura de transición de fase de las moléculas lipídicas antes de adicionarla a la mezcla lipídica seca, donde los intervalos particulares de temperaturas incluyen de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 70 °C; incubar la combinación de la mezcla de lípidos secos y la solución acuosa, donde los intervalos de tiempo particulares incluyen de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas; mezclar la mezcla de lípidos secos y la solución acuosa durante la incubación, tal como mezclar en vórtice, sacudir, agitar, o por agitación; adicionar no electrolitos a la solución acuosa para garantizar la osmolalidad fisiológica, tal como una solución de solución salina al 0,9 %, dextrosa al 5 %, y sacarosa al 10 %; interrumpir vesículas multilamelares grandes, tal como por extrusión o sonicación; e incubar adicionalmente los liposomas preformados con conjugado polipéptido-lípido, donde la mezcla lipídica seca no contenía las moléculas lipídicas. Un experto en la técnica será capaz de identificar la temperatura particular y los tiempos de incubación durante esta etapa de hidratación para garantizar la incorporación de la molécula lipídica derivatizada en los liposomas o para obtener liposomas estables.

Los compuestos lípidos tales como los de la Tabla 1 pueden adicionarse en cualquier punto en el proceso de formación de liposomas. En un ejemplo, el compuesto se adiciona a los lípidos y componentes lípidos durante la formación de la mezcla de lípidos seca. En otro ejemplo, el compuesto se adiciona a liposomas que se forman previamente con una mezcla de lípidos secos que contiene los lípidos y componentes lípidos. En otro ejemplo más, las micelas se forman con el compuesto, los liposomas se forman con una mezcla de lípidos secos que contiene lípidos y componentes lipídicos, y después las micelas y liposomas se incuban juntas. La solución acuosa puede incluir componentes adicionales para estabilizar el agente o el liposoma, tales como tampones, sales, agentes quelantes, solución salina, dextrosa, sacarosa, etc.

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

Partículas lipídicas que tienen una estructura de vesícula

En determinadas modalidades, la partícula lipídica comprende un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, y/o un lípido de amino-amina, lípido de amino-amida, u otro lípido, por ejemplo, de la Tabla 1) y un agente aniónico (por ejemplo, un agente de iARN), así como también un lípido neutro o zwitteriónico, un conjugado PEG-lípido, y opcionalmente, colesterol.

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

Las partículas lipídicas también incluyen aquellas que tienen uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección. En una modalidad, el uno o más agentes de unión a ARN forma un agregado interno, y el uno o más lípidos de transfección forma una superficie externa agregada. En modalidades particulares, la superficie externa agregada no es una membrana, una bicapa lipídica, y/o una capa multilamelar. En determinadas modalidades, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente el 10-90 % del total de lípidos. En otras modalidades, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente el 50 % del lípido total. En otras modalidades, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente el 30 % del lípido total. En determinadas modalidades, el complejo/agregado de un agente de ácido nucleico con uno o más agentes de unión a ARN de la partícula lipídica comprende un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, y/o un lípido de amino-amina o lípido de amino-amida, por ejemplo, de la Tabla 1) y un agente de iARN; y el uno o más lípidos de transfección de la partícula lipídica comprenden un lípido neutro o zwitteriónico, un conjugado PEG-lípido y, opcionalmente, colesterol. En otras modalidades, el uno o más lípidos de transfección de la partícula comprenden un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, un lípido de amino-amina y/o un lípido de amino-amida), un lípido neutro, un conjugado PEG-lípido y, opcionalmente, colesterol.

Proceso de fabricación de partículas lipídicas escalable

25 En determinadas modalidades, la invención proporciona procesos para la producción de partículas que mejoran los procesos previamente practicados, con tales procesos mejorados, por ejemplo, que permiten la producción de cantidades más grandes de partículas lipídicas con poca o incluso ninguna pérdida significativa de eficacia de partículas, en comparación con otros procesos para producir partículas y/o formulaciones lipídicas. Sin desear limitarse a la teoría, los procesos de la invención se diseñan para producir una población más homogénea de tamaños y estructuras de partículas que las obtenidas mediante el uso de procesos alternativos para la preparación formación/de partículas. Se cree que tales atributos de la presente invención son el resultado del orden de adición de componentes durante el desempeño de los procesos descritos en la presente descripción, específicamente, donde los complejos que contienen agentes aniónicos se suspenden en una solución acuosa y los lípidos adicionales se suspenden en un solvente tal como etanol, la adición de la solución lipídica que contiene etanol a la solución acuosa que contiene los complejos de agente aniónico resulta en menos interrupción/disociación de los complejos de agente aniónico que cuando la solución acuosa que contiene complejos de agente aniónico se adiciona a la solución lipídica que contiene etanol. Cuando se realiza el último orden de adición (acuoso en etanol), los complejos de agente aniónico iniciales adicionados a la solución lipídica que contiene etanol se exponen a una concentración elevada de etanol, que después disminuye con el tiempo después de la adición adicional de la solución acuosa a la solución de etanol, en última instancia para lograr la concentración final de etanol de la solución mezclada. Se cree que la exposición de estos complejos de agentes aniónicos iniciales a una concentración transitoriamente alta de etanol es disruptiva para tales complejos, lo que da como resultado una mayor heterogeneidad de estructuras y tamaños de partículas dentro de una población final de partículas que también posee una actividad y/o potencia reducidas. Por el contrario, determinados aspectos de la presente invención se refieren a la identificación sorprendente de la homogeneidad estructural y de tamaño de la población de partículas, eficacia y/o potencia mejoradas cuando el orden de adición es de manera que la solución de etanol que contiene lípidos adicionales se adiciona a los complejos de agentes aniónicos suspendidos en solución acuosa, lo que provoca que los complejos de agente aniónico se expongan a una concentración inicialmente baja y después aumente gradualmente la concentración de etanol (para lograr la misma concentración final que cuando se invierte el orden de adición), a su vez, resulta en una interrupción y/o disociación reducidas de las partículas y una homogeneidad de la población de partículas, eficacia y/o potencia mejoradas.

Aunque las diferencias entre los métodos, por ejemplo, que implican la adición de complejos acuosos a lípidos suspendidos con solvente (por ejemplo, etanol) y los métodos mejorados de la presente invención pueden ser modestas y/o difíciles de detectar a pequeñas escalas de producción (por ejemplo, la preparación de 1 mg de agente aniónico en partículas en un ml de volumen de agua), tales diferencias inventivas se vuelven mucho más pronunciadas y evidentes una vez que aumenta la escala de producción. Las escalas de producción de partículas ilustrativas para los procesos de la invención incluyen no solo la producción a pequeña escala (por ejemplo, 1 mg de agente aniónico en partículas), sino también 10 mg o más de agente aniónico en partículas, 50 mg o más de agente aniónico en partículas, 100 mg o más de agente aniónico en partículas, 250 mg o más de agente aniónico en partículas, 500 mg o más de agente aniónico en partículas, 1 g o más de agente aniónico en partículas, 2 g o más de agente aniónico en partículas, 3 g o más de agente aniónico en partículas, 4 g o más de agente aniónico en partículas, 5 g o más de agente aniónico en partículas, 7,5 g o más de agente aniónico en partículas, 10 g o más de agente aniónico en partículas, 20 g o más de agente aniónico en partículas, 40 g o más de agente aniónico en partículas, 50 g o más de agente aniónico en partículas, 100 g o más de agente aniónico en partículas, 200 g o más de agente aniónico en partículas, 300 g o más de agente aniónico en partículas, 400 g o más de agente aniónico en partículas, 500 g o más de agente aniónico en partículas, 1 kg o más de agente aniónico en partículas, 2 kg o más de agente aniónico en

partículas, 3 kg o más de agente aniónico en partículas, 4 kg o más de agente aniónico en partículas, 5 kg o más de agente aniónico en partículas, o 10 kg o más de agente aniónico en partículas.

5 En determinadas modalidades, las partículas de los procesos mejorados de la presente invención poseen al menos un 10 % más de eficacia y/o potencia totales (por cantidad y/o volumen de partículas, etc.) que una población correspondiente de partículas producidas por métodos que implican la adición de la solución acuosa a la solución solvente (por ejemplo, etanol). Opcionalmente, partículas de los procesos mejorados de la presente invención poseen al menos un 20 % más, al menos un 30 % más, al menos un 40 % más, al menos un 50 % más, al menos un 60 % más, al menos un 70 % más, al menos un 80 % más, al menos un 90 % más, al menos un 100 % más, al menos un 200 % más, al menos un 500 % más, o al menos un 1000 % más de eficacia y/o potencia totales (por cantidad y/o volumen de partículas, etc.) que una población correspondiente de partículas producidas mediante métodos que implican la adición de la solución acuosa al solvente (por ejemplo, solución de etanol). En modalidades relacionadas, las partículas de los procesos mejorados de la presente invención reducen la expresión génica objetivo del agente aniónico (por ejemplo, agente de iARN) a al menos un 10 % menos de los niveles absolutos que una población correspondiente de partículas producidas por métodos que implican la adición de la solución acuosa a la solución solvente (por ejemplo, etanol). Opcionalmente, partículas de los procesos mejorados de la presente invención reducen la expresión génica objetivo del agente aniónico (por ejemplo, agente de iARN) a al menos un 20 % menos de los niveles absolutos, al menos un 30 % menos de los niveles absolutos, al menos un 40 % menos de los niveles absolutos, al menos un 50 % menos de los niveles absolutos, al menos un 60 % menos de los niveles absolutos, al menos un 70 % menos de los niveles absolutos, al menos un 80 % menos de los niveles absolutos, al menos un 90 % menos de los niveles absolutos, al menos un 95 % menos de los niveles absolutos, o un 100 % menos de los niveles absolutos que una población correspondiente de partículas producidas mediante métodos que implican la adición de la solución acuosa al solvente (por ejemplo, solución de etanol). Tales diferencias o mejoras se observan comúnmente mejor a altos niveles de producción de partículas, tales como a niveles de aproximadamente 10 mg o más, 20 mg o más, 50 mg o más, 100 mg o más, 250 mg o más, 500 mg o más, 1 g o más, 2 g o más, 3 g o más, 4 g o más, 5 g o más, 7,5 g o más, 10 g o más, 20 g o más, 40 g o más, 50 g o más, 100 g o más, 200 g o más o agente aniónico, 300 g o más, 400 g o más, 500 g o más, 1 kg o más, 2 kg o más, 3 kg o más, 4 kg o más, 5 kg o más, o 10 kg o más.

30 Las partículas lipídicas de los procesos de la invención típicamente tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm, y son sustancialmente no tóxicos. En adición, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas lipídicas de los procesos de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y determinados métodos de preparación se describen en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos núm. 20040142025 y 20070042031.

Agentes de iARN

45 La interferencia de ARN (iARN) es un mecanismo que inhibe la expresión génica al provocar la degradación de moléculas de ARN específicas o dificultar la transcripción de genes específicos. En la naturaleza, los objetivos de iARN son a menudo moléculas de ARN de virus y transposones (una forma de respuesta inmunitaria innata), aunque también desempeña una función en la regulación del desarrollo y el mantenimiento del genoma. Las hebras de ARN de interferencia pequeño (ARNip), que tienen secuencias de nucleótidos suficientemente complementarias a una molécula de ARN mensajero (ARNm) a la que se dirigen, son clave para el mecanismo de iARN. El ARNip dirige las proteínas dentro de la vía de iARN al ARNm objetivo y las degrada, mediante su división en porciones más pequeñas que ya no pueden traducirse en proteínas.

55 La vía de iARN se inicia por la enzima Dicer, que escinde moléculas largas de ARN de doble hebra (ARNdh) en moléculas de ARNip, típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y que contienen aproximadamente 19 dúplex de pares de bases. Una de las dos hebras de cada fragmento, conocida como la hebra guía, se incorpora entonces en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se empareja con secuencias complementarias. El RISC media la escisión del ARN de simple hebra que tiene una secuencia complementaria a la hebra antisentido del dúplex de ARNip. La escisión del ARN objetivo tiene lugar en el medio de la región complementaria a la hebra antisentido del dúplex de ARNip. El resultado de este evento de reconocimiento es el silenciamiento génico postranscripcional. Esto ocurre cuando la hebra guía se empareja específicamente con una molécula de ARNm e induce la degradación por Argonauta, el componente catalítico del complejo RISC.

65 Las partículas de los métodos de la invención pueden usarse para suministrar uno o más agentes aniónicos, tales como agentes de iARN, a una célula *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en un sujeto). Los agentes de iARN pueden incluir diferentes tipos de moléculas de doble hebra que incluyen hebras ya sean ARN:ARN o ARN:ADN. Estos agentes pueden introducirse en las células en una diversidad de estructuras, que incluyen un dúplex (por ejemplo, con o sin

salientes en el extremo 3' terminal), un lazo en horquilla o un vector de expresión que expresa uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido de doble hebra solo o en combinación con otro polinucleótido. Los agentes de iARN ilustrativos incluyen agentes ARNip, ARNhc, ARNipD y miARN, que se describen en la presente descripción. Generalmente, estos agentes son de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, y las longitudes preferidas se describen más abajo para agentes de iARN particulares.

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

ARNip

Los ARN de interferencia pequeño (ARNip) son generalmente moléculas de ARN de doble hebra de 16 a 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 18 a 25 nucleótidos, por ejemplo, 21 nucleótidos) con uno o dos salientes de nucleótidos en el extremo 3'-terminal o sin ningún saliente. Un profesional experto puede variar la longitud de esta secuencia (por ejemplo, para aumentar o disminuir el nivel total de silenciamiento génico). En determinadas modalidades, los salientes son UU o dTdT en el extremo 3'-terminal. Generalmente, las moléculas de ARNip son completamente complementarias a una cadena de una molécula de ADN objetivo, ya que incluso los errores de emparejamiento de un solo par de bases demostraron reducir el silenciamiento. En otras modalidades, los ARNip pueden tener una composición de cadena principal modificada, tal como, por ejemplo, modificaciones 2'-desoxi- o 2'-O-metilo, o cualquier modificación descrita en la presente descripción.

El ARNip se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir o regular negativamente la expresión génica de una manera específica de secuencia; ver, por ejemplo, Zamore y otros, Cell 101:25 33 (2000); Bass, Nature 411:428-429 (2001); Elbashir y otros, Nature 411:494-498 (2001); y los núm. de publicación PCT. WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 00/01846, WO 01/29058, WO 99/07409, y WO 00/44914. Los métodos para preparar una molécula de ARNip para su uso en el silenciamiento génico se describen en la patente de Estados Unidos núm. 7,078,196.

ARNhc

Los ARN en horquilla corta (ARNhc) son moléculas de ARN de simple hebra en las que está presente una estructura de lazo en horquilla, lo que permite que nucleótidos complementarios dentro de la misma cadena formen enlaces intermoleculares. Los ARNhc pueden exhibir sensibilidad reducida a la degradación de nucleasas en comparación con los ARNip. En determinadas modalidades, un ARNhc tiene una longitud del tallo de 19 a 29 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 19 a 21 nucleótidos o de 25 a 29 nucleótidos). En algunas modalidades, el tamaño del lazo es de entre 4 y 23 nucleótidos de longitud. El ARNhc puede contener generalmente uno o más errores de emparejamiento, por ejemplo, errores de emparejamiento G-U entre las dos cadenas del tallo del ARNhc, sin disminuir la potencia.

ARNipD

Los ARN de sustrato de Dicer (ARNipD) son agentes de ARN de doble hebra de 25 a 35 nucleótidos. Se cree que los agentes de tal longitud se procesan por la enzima Dicer de la vía de interferencia de ARN (iARN), mientras que los agentes más cortos que 25 nucleótidos generalmente imitan productos de Dicer y escapan del procesamiento por Dicer. En algunas modalidades, el ARNipD tiene un saliente de nucleótidos de simple hebra en el extremo 3'-terminal de la hebra antisentido o sentido de 1 a 4 nucleótidos (por ejemplo, 1 o 2 nucleótidos).

Determinadas estructuras modificadas de agentes de ARNipD se describieron previamente, como en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2007/0265220. Las estructuras de ARNipD adicionales y composiciones específicas adecuadas para su uso en las formulaciones de la presente invención se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 12/586,283; las publicaciones de Patente de Estados Unidos núm. 2005/0244858, 2005/0277610, 2007/0265220, 2011/0021604, 2010/0173974, 2010/0184841, 2010/0249214, 2010/0331389, 2011/0003881, 2011/0059187, 2011/0111056; y las publicaciones de PCT núm. WO 2010/080129, WO 2010/093788, WO 2010/115202, WO 2010/115206, WO 2010/141718, WO 2010/141724, WO 2010/141933, WO 2011/072292 y WO 2011/075188. Generalmente, las construcciones de ARNipD se sintetizan mediante el uso de métodos de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida como se describió para los ARNip de 19-23 mer (ver las patentes de Estados Unidos núm. 5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,117,657; 6,353,098; 6,362,323; 6,437,117; 6,469,158; 6,111,086; 6,008,400; y 6,111,086).

miARN

Los microARN (miARN) son moléculas de ARN de simple hebra de 17 a 25 nucleótidos (por ejemplo, 21 a 23 nucleótidos) de longitud. Un profesional experto puede variar esta longitud de secuencia para aumentar o disminuir el nivel total de silenciamiento génico. Estos agentes silencian un gen objetivo mediante la unión de secuencias

complementarias en el ARN mensajero objetivo. Como se usa en la presente descripción, el término “precursor de miARN” se usa para abarcar, sin limitación, transcritos de ARN primario, pri-miARN y pre-miARN. Un “agente de miARN” de la invención puede incluir pri-miARN, pre-miARN, y/o miARN (o miARN maduro). En determinadas modalidades, un ARNip (por ejemplo, un ARNipD) de la invención puede presentar una hebra guía que incorpora una secuencia de miARN, o es lo suficientemente homóloga a la secuencia de miARN para funcionar como dicho miARN (que convierte dicho ARNip en “mimético de miARN”).

Compuestos antisentido

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

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

Pueden realizarse modificaciones a compuestos antisentido y pueden incluir grupos de conjugados unidos a uno de los terminales, posiciones de nucleobase seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleósidos. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de azúcar de alta afinidad 2'-fluoro (2'-F), 2'-OMetil (2'-OMe), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-MOE), caperuzas abásicas invertidas, desoxinucleobases y análogos de nucleobases bicíclicas, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos enlazados con etileno (ENA).

Método para producir agentes de iARN

Los agentes de iARN incluyen al menos una secuencia de nucleótidos antisentido que se dirige a un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un gen objetivo). Los nucleótidos antisentido son hebras individuales de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia objetivo elegida. En el caso del ARN antisentido, evitan la traducción de hebras de ARN complementarias mediante la unión a estas. El ADN antisentido puede usarse para dirigirse a un ARN específico, complementario (codificante o no codificante). En una modalidad particular, los nucleótidos antisentido contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El nucleótido antisentido puede tener hasta 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o incluso 100 % de complementariedad con el gen objetivo deseado.

Los métodos para producir nucleótidos antisentido y sentido, así como también dúplex correspondientes o lazos en horquilla, se conocen en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido que se dirige a cualquier secuencia de ácido nucleico objetivo. Las secuencias de nucleótidos antisentido pueden seleccionarse para optimizar la especificidad del objetivo, tal como mediante el análisis de la secuencia objetivo y la determinación de la estructura secundaria, T_m, energía de unión, y estabilidad relativa; y/o para reducir la formación de estructuras secundarias, tales como dímeros, horquillas, u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm objetivo en una célula hospedera. En algunas modalidades, las regiones objetivo altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de estructura secundaria y consideraciones de selección del sitio objetivo pueden realizarse, por ejemplo, mediante el uso de la v.4 del software de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el software del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997). Los métodos no limitantes para preparar agentes de iARN se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,117,657; 6,353,098; 6,362,323; 6,437,117; 6,469,158; 6,111,086; 6,008,400; y 6,111,086.

Los agentes de iARN pueden tener cualquier forma útil, tal como de simple hebra, de doble hebra, lineal, circular (por ejemplo, un plásmido), circular con mella, enrollado, superenrollado, concatemerizado, o cargado. Adicionalmente, los nucleótidos pueden contener modificaciones terminales de la cadena sentido y antisentido en 5' y 3' y pueden tener nucleótidos terminales romos o que sobresalen (por ejemplo, UU o TT en el extremo 3' terminal), o sus combinaciones.

Los ácidos nucleicos modificados, que incluyen moléculas de ADN o ARN modificadas, pueden usarse en lugar de ácidos nucleicos de origen natural en los polinucleótidos (por ejemplo, agentes de iARN) descritos en la presente

descripción. Los ácidos nucleicos modificados pueden mejorar la semivida, estabilidad, especificidad, suministro, solubilidad, y resistencia a nucleasas de los polinucleótidos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, los agentes de ARNip pueden estar compuestos parcial o completamente por análogos de nucleótidos que confieren las cualidades beneficiosas descritas anteriormente. Como se describió en Elmén y otros (*Nucleic Acids Res.* 33:439-447 (2005)), pueden usarse análogos de nucleótidos sintéticos, similares al ARN (por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA)) para construir moléculas de ARNip que exhiben actividad de silenciamiento contra un producto génico objetivo.

La modificación de la cadena principal del fosforotioato (PS), donde un oxígeno que no se enlaza en el enlace fosfodiéster se reemplaza por azufre, es uno de los medios más tempranos y más comunes que se despliega para estabilizar los fármacos de ácidos nucleicos contra la degradación de nucleasas. En general, parece que las modificaciones de PS pueden realizarse ampliamente en ambas hebras de ARNip sin mucho impacto en la actividad (Kurreck, *Eur. J. Biochem.* 270:1628-44 (2003)). En modalidades particulares, la modificación de PS generalmente se restringe a una o dos bases en los extremos 3' y 5'. El enlazador boranofosfato puede usarse para mejorar la actividad del ARNip mientras que tiene baja toxicidad (Hall y otros, *Nucleic Acids Res.* 32:5991-6000 (2004)). Otras modificaciones ilustrativas a la cadena principal de oligonucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de alquilo (por ejemplo, fosfonato de 3'-alquileo), fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos (por ejemplo, 3'-amino fosforamidato), aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y una cadena principal de nucleótidos proteicos (PNA) que tiene unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, donde los compuestos de PNA representativos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 5,539,082, 5,714,331 y 5,719,262, y Nielsen y otros, *Science* 254:1497-1500 (1991).

Otras modificaciones a la cadena principal incluyen las que reemplazan el átomo fosforoso con enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta (por ejemplo, enlaces morfolino; cadenas principales de siloxano; sulfuro, cadenas principales de sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilen formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mezcladas).

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

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

En determinadas modalidades, pueden emplearse ácidos nucleicos que poseen formas descritas de modificación y/o patrones de modificación. Pueden encontrarse detalles adicionales con respecto a modificaciones y patrones de modificación ilustrativos de ácidos nucleicos, por ejemplo, en al menos las siguientes referencias: US 2010/0240734; WO 2010/080129; WO 2010/033225; US 2011/0021604; WO 2011/075188; WO 2011/072292; WO 2010/141724; WO 2010/141726; WO 2010/141933; WO 2010/115202; WO 2008/136902; WO 2011/109294; WO 2011/075188; PCT/US11/42810; PCT/US11/42820; documentos núm. de serie de Estados Unidos 61/435,304; núm. de serie de Estados Unidos 61/478,093; núm. de serie de Estados Unidos 61/497,387; núm. de serie de Estados Unidos 61/529,422; patentes de Estados Unidos núm. 7,893,245; WO 2007/051303; y US 2010/0184209.

Objetivos génicos de iARN

5 En determinadas modalidades, la presente invención presenta el silenciamiento de un gen objetivo en un tejido u órgano enfermo mediante el tratamiento con una partícula o formulación, en combinación con un agente de iARN. El potencial terapéutico de la presente invención se produce cuando las moléculas de ARNm de un gen específico y seleccionado como objetivo conocido o que se cree que participan en el establecimiento o mantenimiento del estado de la enfermedad (por ejemplo, un cáncer) se degradan por el agente de iARN.

10 Los ejemplos de objetivos de iARN para su uso con la presente invención incluyen proteínas del desarrollo, tales como moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina cinasa, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélices Winged, miembros de la familia Hox, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores; proteínas codificadas por oncogenes (por ejemplo, ABL1 (núm. de entrada de UniProt P00519, ID del gen de NCBI: 25), AR (núm. de entrada UniProt. P10275, ID del gen de NCBI: 3647), β -Catenina (CTNNB1, núm. de entrada de UniProt. P35222, ID del gen de NCBI: 1499), BCL1 (núm. de entrada de UniProt. P24385, ID del gen de NCBI: 595), BCL2 (núm. de entrada de UniProt. P10415, ID del gen de NCBI: 596), BCL6 (núm. de entrada de UniProt. P41182), CBFA2 (núm. de entrada de UniProt. Q01196, ID del gen de NCBI: 861), CBL (núm. de entrada de UniProt. P22681, ID del gen de NCBI: 687), CSF1R (núm. de entrada de UniProt. P07333, ID del gen de NCBI: 1436), ERBA1 (núm. de entrada de UniProt. P10827, ID del gen de NCBI: 7067), ERBA2 (núm. de entrada de UniProt. P10828, ID del gen de NCBI: 7068), ERBB (núm. de entrada de UniProt. P00533, ID del gen de NCBI: 1956), ERBB2 (núm. de entrada de UniProt. P04626, ID del gen de NCBI: 2064), ERBB3 (núm. de entrada de UniProt. P21860, ID del gen de NCBI: 190151), ERBB4 (núm. de entrada de UniProt. Q15303, ID del gen de NCBI: 600543), ETS1 (núm. de entrada de UniProt. P14921, ID del gen de NCBI: 2113), ETS2 (núm. de entrada de UniProt. P15036,

25 ID del gen de NCBI: 2114), ETV6 (núm. de entrada de UniProt. 41212, ID del gen de NCBI: 2120), FGR (núm. de entrada de UniProt. P09769, ID del gen de NCBI: 2268), FOS (núm. de entrada de UniProt. P0110, ID del gen de NCBI: 2353), FYN (núm. de entrada de UniProt. P06241, ID del gen de NCBI: 2534), HCR (núm. de entrada de UniProt. Q8TD31, ID del gen de NCBI: 54535), HRAS (núm. de entrada de UniProt. P01112, ID del gen de NCBI: 3265), JUN (núm. de entrada de UniProt. P05412, ID del gen de NCBI: 3725), KRAS (núm. de entrada de UniProt. P01116, ID del gen de NCBI: 3845), LCK (núm. de entrada de UniProt. P06239 ID del gen de NCBI: 3932), LYN (núm. de entrada de UniProt. P07948, ID del gen de NCBI: 4067), MDM2 (núm. de entrada de UniProt. Q00987, ID del gen de NCBI: 4193), MLL1 (núm. de entrada de UniProt. Q03164, ID del gen de NCBI: 4297), MLL2 (núm. de entrada de UniProt. O14686, ID del gen de NCBI: 8085), MLL3 (núm. de entrada de UniProt. Q8NEZ4, ID del gen de NCBI: 58508), MYB (núm. de entrada de UniProt. P10242, ID del gen de NCBI: 4602), MYC (Introducción de UniProt Núm. P01106, ID del gen de NCBI: 4609), MYCL1 (núm. de entrada de UniProt. P12524, ID del gen de NCBI: 4610), MYCN (núm. de entrada de UniProt. P04198, ID del gen de NCBI: 4613), NRAS (núm. de entrada de UniProt. P01111, ID del gen de NCBI: 4893), PIM1 (núm. de entrada de UniProt. P11309, ID del gen de NCBI: 5292), PML (núm. de entrada de UniProt. P29890, ID del gen de NCBI: 5371), RET (núm. de entrada de UniProt. P07949, ID del gen de NCBI: 5979), SRC (núm. de entrada de UniProt. P12931, ID del gen de NCBI: 6714), TAL1 (núm. de entrada de UniProt. P17542, ID del gen de NCBI: 6886), TAL2 (núm. de entrada de UniProt. Q16559, ID del gen de NCBI: 6887), TCL3 (núm. de entrada de UniProt. P31314, ID del gen de NCBI: 3195), TCL5 (núm. de entrada de UniProt. P17542, ID del gen de NCBI: 6886), y YES (núm. de entrada de UniProt. P07947, ID del gen de NCBI: 7525)); proteínas supresoras de tumor (por ejemplo, BRCA1 (núm. de entrada de UniProt. P38398, ID del gen de NCBI: 672), BRCA2 (núm. de entrada de UniProt. P51587, ID del gen de NCBI: 675), MADH4 (núm. de entrada de UniProt. Q13485, ID del gen de NCBI: 4089), MCC (núm. de entrada de UniProt. P23508, ID del gen de NCBI: 4163), NF1 (núm. de entrada de UniProt. P21359, ID del gen de NCBI: 4763), NF2 (núm. de entrada de UniProt. P35240, ID del gen de NCBI: 4771), RB1 (núm. de entrada de UniProt. P06400, ID del gen de NCBI: 5925), TP53 (núm. de entrada de UniProt. P04637, ID del gen de NCBI: 7157), PLK1 (núm. de entrada de UniProt. P53350, ID del gen de NCBI: 9606), proteína de unión a KIF1 (núm. de entrada de UniProt. Q96EK5, ID del gen de NCBI: 9606), y WT1 (núm. de entrada de UniProt. P19544, ID del gen de NCBI: 4790)); lipoproteínas (por ejemplo, apolipoproteína B (ApoB100, núm. de entrada de UniProt. P04114, ID del gen de NCBI: 338)); enzimas (por ejemplo, sintasas y oxidasas ACC, desaturasas e hidroxilasas ACP, piroforilasas de ADP-glucosa, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasa, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, sintasas de calcona, quitinasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextrinasas, polimerasas de ADN y ARN, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasa, sintasas de almidón unidas al gránulo, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, cinasas (por ejemplo, PLK1 (núm. de entrada de UniProt. P53350, ID del gen de NCBI: 9606)), lactasas, ligasas (por ejemplo, proteína 2 que contiene repeticiones WD y dedo anular (RFWD2), también conocida como COP1), lipasas, lipoxigenasas, lisoenzimas, sintasas de nopalina, sintasas de octopina, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasa, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladoras del crecimiento vegetal, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasas (RuBisCos), topoisomerasas, transferasas, tal como hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1), y xilanasas).

65 El hígado es uno de los tejidos objetivo más importantes para la terapia con ácidos nucleicos, dada su participación central en el metabolismo (por ejemplo, metabolismo de las lipoproteínas en varias hipercolesterolemias) y la secreción de proteínas circulantes (por ejemplo, factores de coagulación en la hemofilia). En adición, los trastornos adquiridos

tales como la hepatitis crónica y la cirrosis son frecuentes y también se tratan potencialmente con terapias hepáticas basadas en polinucleótidos. Una serie de enfermedades o afecciones que afectan o se afectan por el hígado se tratan potencialmente a través de la inactivación (inhibición) de la expresión génica en el hígado. Las enfermedades y afecciones hepáticas ilustrativas pueden seleccionarse de la lista que comprende: cánceres de hígado (que incluyen carcinoma hepatocelular, CHC), infecciones virales (que incluyen hepatitis), trastornos metabólicos (que incluyen hiperlipidemia y diabetes), fibrosis, y lesión hepática aguda. Objetivos moleculares ilustrativos para agentes terapéuticos hepáticos (por ejemplo, que incluyen agentes terapéuticos dirigidos a HCC en particular) – y opcionalmente para agentes terapéuticos que abordan otros objetivos, enfermedades y/o trastornos, que incluyen otros cánceres, incluyen CSN5 (núm. de entrada de UniProt. Q92905, ID del gen de NCBI: 10987), CDK6 (núm. de entrada de UniProt. Q00534, ID del gen de NCBI: 1021), ITGB1 (núm. de entrada de UniProt. P05556, ID del gen de NCBI: 3688), MYC (núm. de entrada de UniProt. P01106, ID del gen de NCBI: 4609), TGFβ1 (núm. de entrada de UniProt. P01137, ID del gen de NCBI: 7040), Ciclina D1 (núm. de entrada de UniProt. Q9H014, ID del gen de NCBI: 595), hepcidina (núm. de entrada de UniProt. P81172, ID del gen de NCBI: 57817), PCSK9 (núm. de entrada de UniProt. Q8NBP7, ID del gen de NCBI: 255738), y transtiretina (TTR, núm. de entrada de UniProt. P02766, ID del gen de NCBI: 7276), entre otros.

Las partículas y/o formulaciones de los métodos de la invención pueden dirigirse opcionalmente a tejidos normales (por ejemplo, tejido hepático normal), así como también a varios modelos (por ejemplo, modelos hepáticos ortotópicos, modelos hepáticos subcutáneos, etc.).

Un objetivo ilustrativo para las partículas de los procesos de la invención es la Apolipoproteína B (ApoB), que se encuentra en diversas clases de lipoproteínas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermitente (IDL), y lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ApoB funciona como una señal de reconocimiento para la unión celular y la internalización de partículas de LDL por el receptor ApoB/E. Una acumulación o sobreabundancia de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B puede provocar trastornos relacionados con los lípidos, tales como aterosclerosis. Las terapias formuladas que reducen ApoB pueden ser útiles para tratar trastornos relacionados con los lípidos. Se demostró que una terapia basada en ácido nucleico, en forma de terapia antisentido, reduce los niveles de ApoB en ratones in vivo, y los tratamientos subsecuentemente redujeron los niveles de colesterol y triglicéridos en suero (publicación de los Estados Unidos núm. 2003/0215943). Estos resultados demostraron una regulación negativa moderada de ApoB y su uso como objetivo en el tratamiento de trastornos relacionados con lípidos.

Otro objetivo ilustrativo para las partículas de los procesos de la invención es la Proteína C, que puede seleccionarse como objetivo, por ejemplo, para el tratamiento de la hemofilia.

Las nanopartículas de lípidos-ARNipD se forman típicamente espontáneamente al mezclar lípidos con los ARNipD para formar un complejo. En dependencia de la distribución de tamaño de partícula deseada, la mezcla de nanopartículas resultante puede extrudirse a través de una membrana de policarbonato (por ejemplo, valor de corte de 100 nm) mediante el uso de, por ejemplo, una extrusora de termobaril, tal como una extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, la etapa de extrusión puede omitirse. En la preparación adicional de una partícula para su uso, la eliminación de etanol y el intercambio simultáneo de tampón pueden lograrse mediante, por ejemplo, diálisis o filtración de flujo tangencial. El tampón puede intercambiarse con, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a aproximadamente pH 7, por ejemplo, aproximadamente pH 6,9, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,1, aproximadamente pH 7,2, aproximadamente pH 7,3, o aproximadamente pH 7,4.

Las formulaciones de partículas se caracterizan típicamente por inspección visual. Deben ser soluciones traslúcidas blanquecinas libres de agregados o sedimentos. El tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de lípidos pueden medirse mediante dispersión de luz mediante el uso de, por ejemplo, un Zetasizer Nano ZS de Malvern (Malvern, Estados Unidos). Las partículas deben tener un tamaño de aproximadamente 20-300 nm, tal como 40-100 nm. La distribución de tamaño de partícula debe ser unimodal. La concentración total de ARNipD en la formulación, así como también la fracción atrapada, se estima mediante el uso de un ensayo de exclusión por colorante. Una muestra del ARNipD formulado puede incubarse con un colorante de unión al ARN, tal como Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de un surfactante que interrumpe la formulación, por ejemplo, Triton-X100 al 0,5 %. El ARNipD total en la formulación puede determinarse por la señal de la muestra que contiene el surfactante, con relación a una curva estándar. La fracción atrapada se determina mediante la sustracción del contenido de ARNipD “libre” (medido por la señal en ausencia de surfactante) del contenido total de ARNipD. El por ciento de ARNip atrapado es típicamente > 85 %. Para determinadas formulaciones, el tamaño de partícula es al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 110 nm y al menos 120 nm. El intervalo adecuado es típicamente de aproximadamente al menos 50 nm a aproximadamente 110 nm, aproximadamente al menos 60 nm a aproximadamente 100 nm, o aproximadamente al menos 80 nm a aproximadamente 90 nm.

Suministro de un agente terapéutico

Las partículas y/o formulaciones de los procesos de la invención pueden usarse para suministrar un agente terapéutico (por ejemplo, agentes aniónicos, tales como ácidos nucleicos o agentes de iARN) a las células. El agente suministrado

por las partículas y/o formulaciones puede usarse para el silenciamiento génico (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* en un sujeto) o para tratar o tratar profilácticamente una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en un sujeto.

El suministro de un agente terapéutico puede evaluarse mediante el uso de cualquier método útil. Por ejemplo, el suministro con una partícula y/o formulaciones producidas por los procesos de la invención puede evaluarse mediante 1) la inactivación de un gen objetivo o 2) la toxicidad o tolerabilidad, en comparación con un control a una dosis equivalente. Estas evaluaciones pueden determinarse con cualquier combinación útil de lípidos en la partícula y/o formulación, tal como cualquier lípido catiónico descrito en la presente descripción (por ejemplo, DOTAP, DODMA, DLinDMA, y/o DLin-KC2-DMA), opcionalmente en combinación, por ejemplo, con un compuesto de la Tabla 1. En modalidades particulares, se observa una mejora del suministro de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente aniónico, tal como un agente de iARN) cuando se usa un proceso de la invención, donde la mejora es más del 25 % (por ejemplo, más de una mejora en el suministro de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, o 1000 veces), en comparación con un control.

Suministro de agentes de iARN

El silenciamiento por iARN puede usarse en una amplia variedad de células, donde las líneas celulares HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 y MCF-7 se encuentran entre las susceptibles a algún nivel de silenciamiento del ARNip. Además, la supresión en células de mamíferos puede producirse a nivel de ARN con especificidad para los genes objetivo, donde se observó una fuerte correlación entre el ARN y la supresión de proteínas. En consecuencia, las partículas producidas por los procesos de la invención, y formulaciones de estas, pueden usarse para suministrar un agente de iARN a una o más células (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*). Los agentes de iARN ilustrativos incluyen ARNip, ARNhc, ARNdh, miARN y agentes de ARNipD, como se describe en la presente descripción.

Inactivación del objetivo *in vitro*

El suministro de un agente de iARN puede evaluarse mediante cualquier método útil. Por ejemplo, las formulaciones que incluyen un agente terapéutico pueden transfectarse *in vitro* en modelos de cultivo celular (por ejemplo, células HeLa), donde las mediciones del punto final incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: (i) cuantificación de ARNm mediante el uso de qPCR; (ii) cuantificación de proteínas mediante el uso de transferencia Western; (iii) internalización celular marcada del agente aniónico y/o un lípido catiónico de una partícula producida por los procesos de la invención. La captación o suministro puede evaluarse tanto para la extensión como para la duración de los criterios de valoración mencionados anteriormente. Antes del suministro, la formulación puede diluirse en medio de cultivo celular a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, y la concentración final puede variar de 0 a 50 nM del agente aniónico o de uno o más lípidos u otros componentes de partículas y/o de la formulación en experimentos de dosis-respuesta. Para los experimentos de curso temporal, puede estudiarse una concentración óptima del experimento de dosis para varios tiempos de incubación, por ejemplo, de 30 minutos a 7 días.

La funcionalidad del agente aniónico y las formulaciones lipídicas también puede probarse al marcar diferencialmente el compuesto lipídico y el agente terapéutico con etiquetas fluorescentes y mediante la realización de estudios de colocalización fluorescente. La capacidad de los compuestos de la invención para suministrar agentes aniónicos y/o una etiqueta fluorescente unida puede evaluarse tanto mediante la medición de la fluorescencia total dentro de la célula como mediante la medición de la fluorescencia que no se asocia de manera estable con compartimentos endosómicos o lisosómicos (para funcionar, se requiere que los agentes terapéuticos que activan la iARN no solo alcancen el interior de la célula, sino también alcancen el citoplasma de la célula). El rendimiento de los estudios de localización de fluorescencia y tráfico celular se describió en la técnica (Lu, y otros, *Mol. Pharm.* 6(3):763, 2009; McNaughton y otros, *Proc. Natl. Acad. Ciencias U.S.A.* 106(15):6111, 2009).

Suministro a tipos de células objetivo particulares y tejidos objetivos

Las partículas producidas por los procesos de la invención pueden usarse para suministrar agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes aniónicos) a varios órganos y tejidos para tratar diversas enfermedades. Los tejidos u órganos dirigidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, pulmón, próstata, riñón, médula ósea, bazo, timo, ganglio linfático, cerebro, médula espinal, corazón, músculo esquelético, piel, mucosa oral, esófago, estómago, íleon, intestino delgado, colon, vejiga, cuello uterino, ovario, testículos, glándula mamífera, glándulas adrenales, tejido adiposo (blanco y/o marrón), sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34+, células CD4+), linfocitos y otras células del linaje sanguíneo.

Terapia contra el cáncer

Las partículas producidas por los procesos de la invención pueden usarse para suministrar uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes de iARN) a un sujeto que tiene cáncer o en riesgo de desarrollar un cáncer (por ejemplo, un aumento del riesgo de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %). Los cánceres ilustrativos incluyen cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma,

colangiocarcinoma, angiosarcoma, o hemangiosarcoma) o neuroblastoma. Las enfermedades neoplásicas ilustrativas y las complicaciones asociadas incluyen, pero no se limitan a, carcinomas (por ejemplo, de pulmón, mamas, páncreas, colon, hepatocelular, renal, tracto genital femenino, células escamosas, carcinoma in situ), linfoma (por ejemplo, linfoma histiocítico, linfoma no hodgkiniano), síndromes MEN2, neurofibromatosis (que incluye neoplasia de células de Schwann), síndrome mielodisplásico, leucemia, angiogénesis tumoral, cánceres de tiroides, hígado, hueso, piel, cerebro, sistema nervioso central, páncreas, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), mamas, colon, vejiga, próstata, tubo gastrointestinal, endometrio, trompas de falopio, testículos y ovario, tumores estromales gastrointestinales (GIST), tumores prostáticos, tumores de mastocitos (que incluyen tumores de mastocitos caninos), mielofibrosis mieloide aguda, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, melanoma, mastocitosis, gliomas, glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, sarcomas (por ejemplo, sarcomas de origen neuroectodérmico o leiomiocarcinoma), metástasis de tumores a otros tejidos, e hipoxia inducida por quimioterapia.

Administración y dosis

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

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

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse con filtro. Las soluciones acuosas resultantes pueden empaquetarse para su uso tal cual, o liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, con mayor preferencia entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y con la máxima preferencia entre 7 y 8, tal como 7 a 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida pueden envasarse en múltiples unidades de dosis única, cada una que contiene una cantidad fija del agente o agentes mencionados anteriormente, tal como en un empaque sellado de comprimidos o cápsulas. La composición en forma sólida también puede empaquetarse en un contenedor para una cantidad flexible, tal como en un tubo exprimible diseñado para una crema o ungüento aplicable tópicamente.

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

Las cantidades efectivas para este uso pueden depender de la gravedad de la enfermedad o afección y el peso y el estado general del paciente, pero generalmente están en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 3000 mg del agente o agentes por dosis por paciente. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las administraciones de refuerzo se tipifican mediante una administración inicial seguida de dosis repetidas a uno o más intervalos por hora, diarios, semanales, o mensuales mediante una administración posterior. La cantidad efectiva total de un agente presente en las composiciones de la invención puede administrarse a un mamífero como una dosis única, ya sea por bolo o por infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o puede administrarse mediante el uso de un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un período de tiempo más prolongado (por ejemplo, una dosis cada 4-6, 8-12, 14-16 o 18-24 horas, o cada 2-4 días, 1-2 semanas, una vez al mes). Alternativamente, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones terapéuticamente efectivas en la sangre.

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

El paciente también puede recibir un agente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 3000 mg por dosis una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más veces por semana), 0,1 a 2500 (por ejemplo, 2000, 1500, 1000, 500, 100, 10, 1, 0,5, o 0,1) mg de dosis por semana. Un paciente también puede recibir un agente de la composición en el intervalo de 0,1 a 3000 mg por dosis una vez cada dos o tres semanas.

La cantidad (dosis) de formulación y agente (por ejemplo, ARNipD) a administrar puede determinarse empíricamente. En determinadas modalidades, se observa una inactivación efectiva de la expresión génica mediante el uso de 0,0001-10 mg/kg de peso animal del agente de ácido nucleico y 0,001-200 mg/kg de peso animal de formulación de suministro. Una cantidad ilustrativa en ratones es 0,1-5 mg/kg de agente de ácido nucleico y 0,7-100 mg/kg de formulación de suministro. Opcionalmente, se administra aproximadamente 1-50 mg/kg de formulación de suministro. La cantidad de agente (por ejemplo, ARNipD) aumenta fácilmente porque típicamente no es tóxico en dosis más grandes.

En determinadas modalidades, las dosis pueden administrarse diariamente durante un período de días, semanas, o más (por ejemplo, entre uno y 28 días o más), o solo una vez, o a otros intervalos, en dependencia de, por ejemplo, indicaciones agudas frente a crónicas, etc.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones de la invención que comprenden una cantidad efectiva pueden llevarse a cabo con niveles de dosis y patrones seleccionados por el médico responsable del tratamiento. La dosis y el esquema de administración pueden determinarse y ajustarse en función de la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente, que puede monitorizarse a lo largo del curso del tratamiento de acuerdo con los métodos comúnmente practicados por los médicos o los descritos en la presente descripción.

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Proceso para la producción de partículas que contienen un agente aniónico (Proceso 2141)

ARNipD para HPRT1 y MYC

Las partículas se prepararon como se describe más abajo con un lípido catiónico (DODMA), un lípido neutro (DSPC), un conjugado PEG-lípido (PEG-DMPE y PEG-DMG), y colesterol con un agente de iARN (ARNipD para HPRT1 o MYC), que tiene una de las siguientes estructuras:

HPRT1:

10 5'-GCCAGACUUUGUUGGAUUUGAAAtt (SEQ ID NO: 1)
3'-UUCGGUCUGAAACAACCUAAACUUUAA (SEQ ID NO: 2)

MYC-622:

15 5'-AGGAACUAUGACCUCGACUACGAct-3' (SEQ ID NO: 3)
3'-UGUCCUUGAUACUGGAGCUGAUGCUGA-5' (SEQ ID NO: 4)

MYC-1711:

20 5'-AGCUUUUUUGCCUCGUGACCAAga-3' (SEQ ID NO: 5)
3'-CCUCGAAAAACGGGACGCACUGGUCU-5' (SEQ ID NO: 6)

25 donde las letras mayúsculas significan nucleótido de ARN, las letras mayúsculas subrayadas significan un nucleótido 2'-O-metil-ARN, y las letras minúsculas significan un nucleótido de ADN. Tenga en cuenta que, aunque las SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8 se presentan anteriormente en una orientación complementaria 3'-5', en el Listado de secuencias proporcionado con esta solicitud, se presentan en orientación 5'-3' según sea necesario y como se muestra en el Listado de secuencias más abajo en la Tabla 11).

Preparación de hebras de ARNipD: síntesis y purificación de oligonucleótidos

30 Se sintetizaron hebras de ARN individuales y se purificaron por HPLC de acuerdo con métodos estándar (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). Por ejemplo, los oligonucleótidos de ARN se sintetizaron mediante el uso de química de fosforamidita en fase sólida, se desprotegeron, y desalinizaron en columnas NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) mediante el uso de técnicas estándar (Damha y Olgivie, *Methods Mol. Biol.* 20:81, 1993; Wincott y otros, *Nucleic Acids Res.* 23: 2677, 1995). Los oligómeros se purificaron mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (IE-HPLC) en una columna Amersham Source 15Q (1,0 cm x 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) mediante el uso de un gradiente lineal por etapas de 15 minutos. El gradiente fue de 90:10 de los tampones A:B a 52:48 de los tampones A:B, donde el tampón A es Tris 100 mM pH 8,5 y el tampón B es Tris 100 mM pH 8,5, NaCl 1 M. Las muestras se monitorearon a 260 nm, y los picos correspondientes a las especies de oligonucleótidos de longitud completa se recolectaron, se agruparon, se desalinizaron en columnas NAP-5, y se liofilizaron.

45 La pureza de cada oligómero se determinó mediante electroforesis capilar (CE) en un Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). Los capilares CE tienen un diámetro interior de 100 µm y contienen gel 100R para ADNsh (Beckman-Coulter). Típicamente, se inyectó aproximadamente 0,6 nmol de oligonucleótido en un capilar, se ejecutó en un campo eléctrico de 444 V/cm y se detectó mediante absorbancia UV a 260 nm. El tampón de corrida de Tris-Borato-7 M-urea desnaturalizante se adquirió de Beckman-Coulter. Se obtuvieron oligorribonucleótidos que tenían una pureza de al menos 90 % según se evaluó por CE para usar en los experimentos que se describen más abajo. La identidad del compuesto se verificó mediante espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en una estación de trabajo de bioespectrometría Voyager DETM (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se obtuvieron masas moleculares relativas de todos los oligómeros, a menudo dentro del 0,2 % de la masa molecular esperada.

Preparación de dúplex de ARNipD

55 Los oligómeros de ARN de simple hebra (ARNsh) se resuspendieron, por ejemplo, a una concentración de 100 µM en tampón de dúplex que consiste de acetato de potasio 100 mM, HEPES 30 mM, pH 7,5. Se mezclaron hebras sentido y antisentido complementarias en cantidades molares iguales para producir una solución final de, por ejemplo, dúplex 50 µM. Las muestras se calentaron hasta 100 °C durante 5 minutos en tampón de ARN (IDT) y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente antes de su uso. Los oligonucleótidos de doble hebra (ARNdh) se almacenaron a -20 °C. Los oligómeros de ARN de simple hebra se almacenaron liofilizados o en agua libre de nucleasas a -80 °C.

Preparación de partículas

65 Los complejos lipídicos de ARNipD se produjeron inicialmente al combinar (a) 24 mg/ml de ARNipD anti-HPRT1 disuelto en 12,5 ml de agua con (b) 37,5 ml de una suspensión lipídica que comprende los componentes de la Tabla 5 en HCl 60 mM (pH = 2,3).

Tabla 5: Composición de lípidos acuosos usados para formar complejos ARNipD-lípido

	DODMA	DMPE-PEG2000
MW (Da)	620,90	2693,30
mol %	90,04	9,96
% en peso	67,58	32,42
Mol (mmol)	2,14	0,24
Peso (mg)	1330,71	638,31

5 Los componentes anteriores de la Tabla 5 se extruyeron a través de membranas de 100 nm durante 10-12 ciclos, y después se evaluaron el tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI), que fueron de 80,76 nm y 0,058, respectivamente. Después de combinar el ARNipD y la suspensión lipídica inicial, se adicionaron 100 ml de agua, lo que dio como resultado un pH final de 2,8 para el volumen de 150 ml de complejos lipídicos de ARNipD obtenidos (ver Figura 1). Después se depositaron complejos ARNipD-lípido en un recipiente de mezcla, y después se adicionaron 100 ml de una solución adicional de lípidos (que contenían contenido total de lípidos de 37 mg/ml) disueltos en etanol al 100 % a la suspensión acuosa de complejo ARNipD-lípido. La composición de esta solución adicional de lípidos se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición de lípidos disueltos con EtOH adicionados a los complejos ARNipD-lípido

	DSPC	COL	L-30 de la Tabla 1	DSPE-PEG2k
MW (Da)	790,16	386,4	613,05	2805,50
mol %	19,38	46,44	30,32	3,87
% en peso	24,43	28,63	29,65	17,30
Mol (mmol)	1,143	2,739	1,788	0,228
Peso (mg)	903,15	1058,35	1096,13	639,65

15 Después de completar la mezcla de lípidos adicionales con los complejos ARNipD-lípido, se adicionaron 500 ml de agua a las partículas, lo que produjo una reducción adicional en la concentración de etanol de la suspensión mezclada, a etanol al 14,3 % (opcionalmente, pueden adicionarse volúmenes variables de etanol en esta etapa, por ejemplo, 180 ml de agua para reducir la concentración de etanol al 25 %, 1,75 l de agua para reducir la concentración de etanol al 8 %, 3,75 l de agua para reducir la concentración de etanol al 4 %, etc.). Esta suspensión mezclada se sometió después a filtración de flujo tangencial (TFF), lo que dio como resultado un volumen concentrado de aproximadamente 150 ml. Después, esta suspensión se diafiltró con 600 ml de PBS y después se enjuagó dos veces con 50 ml de PBS, lo que dio como resultado un volumen total de 220 ml.

25 Después se midió el tamaño de partículas (93,11 nm), índice de polidispersión (PDI = 0,106) y la concentración. Para la concentración, se midió que los complejos ARNipD-lípido eran de 1,3 mg/ml, se observó que la eficiencia de encapsulado era del 95,44 % y el volumen total era de 220 ml, lo que significa que se requirió una adición de 52,96 ml de PBS para llevar la concentración final de la muestra a 1 mg/ml. En particular, la concentración final de etanol de esta muestra que contiene partículas estuvo por debajo de 0,15 %. El proceso demostrado en el Ejemplo 1 se denomina generalmente en la presente descripción como "proceso 2141" y se distingue en el Ejemplo 2 del "proceso 2072" descrito más abajo.

Ejemplo 2: Proceso 2072 en comparación con el Proceso 2141 del Ejemplo 1

35 Un proceso similar al proceso anterior pero que se distinguió del proceso anterior solo en que la concentración de lípidos adicionales en etanol se redujo con relación al proceso descrito anteriormente (denominado el "proceso 2072") se examinó inicialmente para determinar las propiedades de las partículas formadas de esta manera. Con respecto a los procesos de este Ejemplo, las proporciones y cantidades totales de lípidos usados durante la formulación de partículas en el "proceso 2072", para los cuales los resultados se describen en este Ejemplo, y el "proceso 2141", que se establece en el Ejemplo 1 anterior, fueron los mismos. La única diferencia entre el "proceso 2141" y el "proceso 2072" puede encontrarse en la concentración de lípidos que se usaron en los lípidos adicionales en el componente de solución de etanol de los procesos, que se elevó en el "proceso 2141" de una manera como se describe en los Ejemplos más abajo, con relación al "proceso 2072".

45 Las partículas producidas por el "proceso 2072" que implican la adición de complejos ARNipD-lípido en lípidos adicionales en etanol, así como también por el "proceso 2141" que implica la adición de lípidos adicionales en etanol en complejos ARNipD-lípido se evaluaron para sus propiedades físicas y se compararon. Los dos paneles superiores de la Figura 2 demuestran que la inversión del orden de adición de complejos ARNipD-lípido y lípidos adicionales en etanol (proceso 2141 en comparación con el proceso 2072) creó una diferencia dramática y sorprendente tanto en el tamaño promedio de las partículas como en la distribución de tamaño de las partículas obtenidas mediante el proceso

inverso. Específicamente, cuando se fabricó un lote de partículas de 100 mg (contenido de ARNipD = 100 mg) mediante un "proceso de 2072" en el que se adicionaron complejos ARNipD a lípidos adicionales en etanol, las partículas resultantes poseían un tamaño promedio de 152,6 nm, mientras que la heterogeneidad de esta población de partículas fue alta, como se refleja en un valor de PDI observado de 0,265 para esta preparación. Por el contrario, cuando se fabricó un lote de partículas más grande de 300 mg (contenido de ARNipD = 100 mg) mediante un proceso que implicaba adicionar los lípidos adicionales en etanol en la suspensión del complejo ARNipD-lípido, (el "proceso 2141") el tamaño promedio de las partículas se redujo a 98,85 y también se encontró que la distribución de tamaño de la población de partículas era dramáticamente más homogénea (PDI = 0,127).

Este resultado demostró que la alteración implementada del orden de adición afectaba al tamaño de partícula y a la homogeneidad de una manera dramática, ventajosa y sorprendente. Como se demuestra en los Ejemplos más abajo, el tamaño promedio de partículas más bajo y la heterogeneidad reducida de tales poblaciones de partículas se asociaron tanto con la eficacia mejorada (de inactivación de la eficacia e impacto fenotípico) como con la tolerabilidad mejorada/toxicidad reducida de las poblaciones de partículas cuando se administraron a un sujeto.

Ejemplo 3: Aumento de las concentraciones de lípidos adicionales en las propiedades de partícula mejoradas con etanol

El proceso descrito anteriormente ilustrado esquemáticamente en la Figura 1, que también se denomina en la presente descripción "2141", no solo se distinguió de otros procesos probados en el orden de la adición de complejos ARNipD-lípido y lípidos adicionales en etanol, sino que también se distinguió de otros procesos por la concentración de lípidos y esteroides que se solubilizaron en los lípidos adicionales en solución de etanol. Específicamente, en el "proceso 2072", el colesterol se adicionó al solvente a una concentración de aproximadamente 10-11 mg/ml en etanol, que se acercó al límite de solubilidad del colesterol en etanol. Después se adicionaron lípidos adicionales a esta mezcla de colesterol en etanol para crear el componente "lípidos adicionales en etanol", y hubo un límite en la cantidad de lípido total que podría estar presente en la solución "lípidos adicionales en etanol" de aproximadamente 20 mg/ml de lípido total. Por el contrario, en el "proceso 2141" de la invención, L-30 de la Tabla 1, DSPC y DSPE-PEG2k se combinaron en 100 ml de etanol en las cantidades mostradas en la Tabla 6 anterior. Esta solución de etanol se adicionó entonces al colesterol como un polvo, a una concentración de colesterol de aproximadamente 11 mg/ml, pero con la distinción de que el contenido de lípidos total de esta solución de "lípidos adicionales en etanol" logró un contenido de lípidos total de 37 mg/ml en ausencia de agregación u otro efecto perjudicial. (De hecho, también se prepararon con éxito lotes adicionales de esta solución de "lípidos adicionales en etanol" que tenían aproximadamente 21 mg/ml de colesterol (un nivel que excedió drásticamente la solubilidad del colesterol solo en etanol) y 74 mg/ml de lípido total en etanol).

El impacto de impulsar el contenido total de lípidos de la solución "lípidos adicionales en etanol" de los procesos actuales por encima de los niveles de aproximadamente 20 mg/ml o inferiores usados para procesos "2072" y similares, a aproximadamente 34 mg/ml en el caso del "proceso 2141"/partículas, fue inesperado y dramático: las partículas preparadas mediante el "proceso 2141" poseen un tamaño y polidispersión mejorados en comparación con las partículas preparadas mediante el "proceso 2072"; las partículas "2141" también demostraron una mejor inactivación específica del objetivo que las partículas preparadas mediante el "proceso 2072", mostró una eficacia mejorada en la reducción del volumen tumoral en un modelo de cáncer de hígado de ratón Hep3B, y se toleraron mucho mejor en ratones que las partículas correspondientes preparadas mediante el "proceso 2072".

Los dos paneles de la parte inferior de la Figura 2 muestran el tamaño y los valores de polidispersión mejorados que se observaron para una población de partículas preparadas mediante el uso del "proceso 2141" (que incluía una concentración elevada de lípidos adicionales en etanol durante el proceso de formulación) en comparación con tales partículas preparadas mediante el uso del "proceso 2072" (que incluía concentraciones totales de lípidos adicionales en etanol en 20 mg/ml o por debajo durante el proceso de formulación). Específicamente, el "proceso 2141" produjo partículas que poseen un tamaño promedio de 95,07 nm con una PDI observada de 0,072, en comparación con las partículas correspondientes producidas por el "proceso 2072", que mostraron un tamaño promedio de 98,85 nm y una PDI observada de 0,127. Por lo tanto, se observó que las partículas producidas por el "proceso 2141" eran ligeramente más compactas y significativamente más homogéneas que las partículas correspondientes producidas por el "proceso 2072", mediante esta evaluación bruta de las propiedades físicas de ambas poblaciones de partículas.

La evaluación adicional de las características físicas de las partículas producidas por "2141" y las producidas por "2072" reveló diferencias aún más dramáticas entre las dos poblaciones de partículas. Cuando ambas poblaciones de partículas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño ("SEC") y se examinaron las intensidades de las señales, la homogeneidad de las partículas producidas por "2141" fue especialmente impactante. Como se muestra en la Figura 3, las fracciones SEC 2-5 de una población de partículas producidas por "2072" revelaron una heterogeneidad significativa de la población de partículas, específicamente, la población de partículas "2072" del panel superior de la Figura 3 reveló un pico menor significativo de menor tamaño de partícula que el pico principal, que parecía corresponder a restos de micela; por el contrario, las partículas producidas por "2141" del panel inferior no mostraron tal pico menor y el tamaño de las partículas producidas por "2141" se agrupó más estrechamente. Por lo tanto, las partículas fabricadas por el "proceso 2141" tenían un tamaño más consistente y menos restos de micelas, en comparación con las partículas producidas por el "proceso 2072". Este efecto fue particularmente notable porque,

como se indicó anteriormente, las composiciones lipídicas de partículas producidas por "2141" y producidas por "2072" fueron idénticas.

El examen adicional de las partículas producidas por "2141" en comparación con las partículas producidas por "2072" definió, además, la homogeneidad relativa de la población de partículas producidas por "2141" en comparación con la heterogeneidad de la población de partículas producidas por "2072". El análisis del volumen en por ciento se realizó mediante el uso de 1,0 ml de ARNipD 1,0 mg/ml en la ejecución de LNP en una columna Sefarosa 4B, 30 ml, y las partículas se midieron por % de volumen, con contenido de ARN para cada fracción evaluado por tamaño promedio de partículas (Malvern). Como se muestra en la Figura 4, cuando se realizó un análisis de volumen en por ciento tanto sobre partículas producidas por "2072" como por "2141", se observó que las partículas producidas por "2072" (Figura 4, panel superior) poseen una fracción mayoritaria (57 %) de partículas de 21-32 nm dentro de la población de partículas, aparentemente correspondientes a restos de micelas, mientras que solo el 36 % de la población de partículas producidas por "2072" correspondía a las partículas de 79-106 nm evaluadas como partículas que contenían ARNipD. Por el contrario, las partículas producidas por "2141" evaluadas por volumen en por ciento fueron sorprendentemente homogéneas: más del 98 % de la población de partículas se identificó en una ventana de 51-78 nm que correspondía a partículas que contenían ARNipD. Por lo tanto, el "proceso 2141" resultó en la incorporación casi completa de la carga útil de ARNipD en partículas de tamaño adecuado, mientras que el "proceso 2072" se observó bajo tales análisis estrictos que acumuló una cantidad significativa de restos de micelas dentro de la población de partículas.

Ejemplo 4: El "proceso 2141" produjo partículas que mostraron una inactivación específica del objetivo mejorada, actividades fenotípicas mejoradas, y que se toleraron bien

La eficacia de las partículas producidas por "2141" se evaluó *in vivo* en una serie de experimentos. Primero, se examinaron las partículas formuladas por "2141" que portaban un ARNipD de carga útil anti-HPRT1 como se describió anteriormente para determinar la eficacia de inactivación específica del objetivo en tumores de ratón (en tales experimentos, los ratones portadores de tumores Hep3B recibieron 5 mg/kg de partículas ("2141" u otras como se indicó en la Figura 5), y la inactivación en el tumor hepático de HPRT1 se evaluó 48 horas después de la administración, N = 7/grupo). Como se muestra en la Figura 5, las partículas fabricadas mediante el "proceso 2141" (que también se comparte por las partículas "2137" y "2144", con solo proporciones de lípidos componentes que varían entre tales tres grupos) produjeron aproximadamente una inactivación del 80 % de HPRT1 en tumores de ratón. Este resultado fue significativamente mejor que el observado para las partículas producidas por el "proceso 2072", lo que dio como resultado una inactivación de aproximadamente el 70 % del transcrito de HPRT1 objetivo en tumores de ratón. Por lo tanto, el "proceso 2141", que se distingue del "proceso 2072" solo en la concentración elevada de lípidos presentes dentro del componente "lípidos adicionales en etanol" del proceso, produjo una población de partículas que fue más efectiva en la inactivación específica del objetivo de un transcrito objetivo (en la presente descripción, HPRT1) *in vivo*. Sin desear limitarse a la teoría, al menos parte de esta notable mejora probablemente fue atribuible a la homogeneidad dramáticamente mejorada de las partículas obtenidas a través del "proceso 2141".

También se examinó la eficacia fenotípica *in vivo* de partículas formadas por "2141" en comparación con partículas formadas por "2072". Dentro de tales experimentos, se formularon dos ARNipD dirigidos a MYC ("MYC-622" y "MYC-1711") mediante el uso del "proceso 2141" o el "proceso 2072". Después se administraron partículas que contenían estos ARNipD dirigidos a MYC a ratones que portaban tumores Hep3B y se evaluó la eficacia (los ratones recibieron una dosis de TIWx2 a las concentraciones indicadas en la Figura 6, y los pesos tumorales se evaluaron 48 horas después de la administración de la dosis final). En experimentos anteriores, se observó que tanto las cargas útiles de MYC-622 como de MYC-1711 poseen eficacias comparables (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 6, una carga útil de ARNipD MYC-1711 formulada en partículas mediante el "proceso 2141" mostró una potencia aproximadamente 4-5 veces mayor (eficacia escalada al nivel de dosis) en la reducción del volumen tumoral de Hep3B *in vivo*, en comparación con las partículas formadas por "2072" que portaban un ARNipD MYC-622. Específicamente, las partículas formadas por "2141" que portaban la carga útil de MYC-1711 administrada a 3 mg/kg o 5 mg/kg mostraron reducciones respectivas en el tamaño del tumor de 73 % y 77 %, respectivamente. Estos niveles de reducción fueron significativamente mayores que los observados para las partículas que portaban una carga útil dirigida a MYC producidas por el "proceso 2072", e incluso las dosis de menos de 1 mg/kg de partículas formadas por "2141" que tenían cargas útiles anti-MYC mostraron reducciones significativas en el tamaño del tumor (una reducción de aproximadamente el 28 % para 0,3 mg/kg y una reducción de aproximadamente el 47 % para 0,5 mg/kg). La tolerabilidad de las formulaciones respectivas también se evaluó mediante el examen de los siguientes marcadores de toxicidad: Fos ALC, ALT, AST, ALB y bilirrubina total. Como se muestra en la tabla inferior de la Figura 6, las partículas producidas por el "proceso 2072" elevaron los niveles de tales marcadores de toxicidad en una medida mucho mayor que la que se observó para las partículas producidas por el "proceso 2141".

Se realizaron ensayos adicionales para evaluar la tolerabilidad de las partículas producidas por el "proceso 2141" o el "proceso 2072", y todos estos ensayos destacaron la tolerabilidad/carencia de toxicidad mejoradas de las partículas producidas por el "proceso 2141". Cuando una formulación no se tolera bien en un ratón, tal ratón a menudo mostrará una pérdida de peso corporal después de la administración de tal formulación. Mientras tanto, el peso hepático a menudo aumenta para tales ratones. Como se muestra en la Figura 7, las tolerancias brutas de las partículas producidas por "2072" y "2141" se compararon mediante la evaluación del impacto sobre el peso corporal y el peso

hepático de la administración de 10 mg/kg (BIWx2, cuatro dosis en total, n = 15/grupo) de tales partículas a ratones. Se observaron diferencias notables entre las partículas formuladas por cada uno de estos procesos, con partículas formadas por "2072" que mostraron un impacto dramático tanto en el peso corporal (la administración de partículas formadas por "2072" produjo una reducción en el peso corporal de casi el 20 %) como en el peso hepático (se observó un aumento aproximado del 50 % en el peso hepático para los ratones a los que se administró las partículas formadas por "2072". Por el contrario, no se observó un impacto significativo sobre el peso corporal para los ratones a los que se administraron partículas formuladas por "2141", y las partículas formuladas por "2141" provocaron solo un aumento muy modesto (aproximadamente del 10-20 %) en el peso hepático, un efecto que también se observó en una de las dos preparaciones "2141" examinadas. Por lo tanto, las partículas producidas por "2141" se toleraron sorprendentemente bien, en base a indicaciones macroscópicas de tolerabilidad a la formulación, *in vivo*.

Tales resultados de tolerabilidad/toxicidad de las partículas formadas por "2141" se reforzaron mediante la evaluación de los siguientes marcadores de toxicidad en aquellos ratones a los que se administraron las partículas formadas por "2072" y "2141" a una administración de 10 mg/kg (BIWx2, cuatro dosis en total, n = 15/grupo): ALT, AST, bilirrubina, CPK, fosfatasa alcalina, y albúmina. Como se muestra en la Figura 8, tales dosis elevadas y repetidas de partículas formuladas por "2072" provocaron cambios en cada uno de estos marcadores que fueron indicativos de toxicidad de la formulación: Los niveles de ALT, AST, bilirrubina, CPK y fosfatasa alcalina fueron todos significativamente elevados, mientras que los niveles de albúmina se redujeron significativamente. Por el contrario, las partículas formuladas por "2141" no mostraron tales cambios dramáticos en los marcadores de toxicidad examinados: ninguna de las partículas formuladas por "2141" mostró ningún cambio significativo en tal marcador de toxicidad, en comparación con los animales tratados en paralelo con PBS. Por lo tanto, el "proceso 2141" (que incluía una concentración elevada de lípidos adicionales en etanol durante el proceso de formulación) produjo partículas que no solo tenían características físicas mejoradas (tamaño, PDI, etc.), sino que también fueron más eficaces *in vivo*, así como también que se toleraron mejor, que las partículas correspondientes producidas por métodos que no incluían el uso de concentraciones elevadas de lípidos adicionales en etanol durante el proceso de formulación.

Ejemplo 5: Procesos y formulaciones para producir partículas que contienen agentes aniónicos

Las composiciones lipídicas para su uso en la producción de partículas que portan agentes aniónicos se formularon generalmente como se describió anteriormente para los Ejemplos 1 (el proceso 2141) y de acuerdo con el proceso mostrado en la Figura 1. El proceso incluye preparar una primera suspensión lipídica que comprende lípidos del núcleo que incluyen un lípido catiónico tal como DODMA, DL-048, DL-049, DL-033, y un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formulación de partículas de lípido-agente aniónico, por ejemplo, un conjugado PEG-lípido tal como DMPE-PEG2k, DMG-PEG2k, y DSPE-PEG2k. Los lípidos del núcleo se mezclan en una solución acuosa ácida para formar un complejo lipídico.

Una segunda solución lipídica (adicional) se prepara en un solvente, por ejemplo, etanol, preferentemente, etanol al 100 %. Como se muestra en las Tablas 7 y 8, la segunda solución lipídica contiene uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en un lípido estructural, un esteroles, un lípido catiónico, y un lípido modificado. Los ejemplos incluyen DDPC, DSPC, MSPC, POPC, Liso PC, POGP, Colesterol, DL-033, DL-036, DMPD-PEG2k, DSPE-PEG2k, y DSG-PEG2k, y similares. Las abreviaturas químicas de los compuestos usados en las formulaciones se definen más abajo en la Tabla 9.

Las combinaciones ilustrativas específicas de lípidos para preparar la primera composición lipídica del núcleo y las segundas composiciones lipídicas adicionales se enumeran en las Tablas 7 y 8, y se prepararon como se describió anteriormente para el Ejemplo 1 y se probaron para determinar propiedades específicas. Como se describió para el Ejemplo 1, un método preferido para producir partículas que contienen una carga útil de agente aniónico incluye las etapas de combinar en una solución acuosa ácida, preferentemente, una solución acuosa de HCl, un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico y un lípido catiónico (por ejemplo, los lípidos catiónicos del núcleo mostrados en las Tablas 7 y 8), en una cantidad suficiente para formar un complejo. El complejo lipídico puede entonces combinarse con un agente aniónico, tal como una molécula de ácido nucleico, para formar un complejo-agente aniónico, y combinarse con una solución acuosa neutra para formar una suspensión acuosa de complejo-agente aniónico.

Los lípidos adicionales se combinan para formar una solución o suspensión lipídica adicional, que comprende uno o más lípidos seleccionados de un lípido estructural, un esteroles, un lípido catiónico, y un lípido modificado. En una modalidad preferida, los lípidos adicionales se combinan en un solvente tal como etanol, preferentemente, etanol al 100 %, y preferentemente, incluyen uno o más de los lípidos de envoltura mostrados en las Tablas 7 y 8. La solución o suspensión de los lípidos de envoltura adicionales se adiciona, preferentemente, al complejo-agente aniónico para producir partículas que comprenden el agente aniónico.

Las partículas que contenían un agente antigénico se produjeron mediante el uso de las formulaciones descritas en las Tablas 7 y 8 y cada una de las formulaciones proporcionó partículas que tenían las características mejoradas descritas para las partículas producidas por el proceso 2141 en comparación con las partículas fabricadas por el proceso 2072 descrito en los Ejemplos 1 y 2. Las características mejoradas incluyeron homogeneidad, uniformidad, carga útil, y eficacia terapéutica.

ES 2 981 700 T3

5 Como se demuestra en la Tabla 10, las partículas tienen características mejoradas sobre las partículas producidas por el proceso 2072 medido por una o más de las siguientes características y/o marcadores: Tamaño promedio de partículas, índice de polidispersión (PDI), por ciento de carga útil, por ejemplo, ácido nucleico en la partícula y/o suministrado a la célula objetivo, marcadores de enfermedad, fosfatasa alcalina, CPK, ALT, AST, albúmina, bilirrubina total, HPRT1, cambio en el peso corporal o peso hepático, por ejemplo, medido en ensayos de diagnóstico representativos de la carga útil y su objetivo. Ver Tabla 10, más abajo.

Tabla 7. Composiciones de formulación de LNP EnCore (% mol) – Centradas en el tumor

Composiciones de formulación EnCore LNP (% mol) Centradas en el tumor						
	Lípido	2141	2163	2311	2332	2376
Núcleo Lípidos	DODMA	25,9				
	DL-048			25,9		25,9
	DL-049					
	DL-033		25,2		24,7	
	DMPE-PEG2k	2,9		2,9		
	DMG-PEG2k					
	DSPE-PEG2k		2,8		2,7	2,9
	Total	28,7	28,0	28,7	27,4	28,7
	Envoltura Lípidos	DPPC				
DSPC		13,8	13,4	13,8	13,2	13,8
MSPC						
POPC						
Liso PC						
POPG						
COL		33,1	32,2	33,1	31,6	33,1
DL-033			21,0			
DL-036		21,6		21,6	20,6	21,6
DMPE-PEG2k						
DSPE-PEG2k		2,8		2,8		2,8
DSG-PEG2k			5,3		7,3	
Total		71,3	72,0	71,3	72,6	71,3
Suma total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Lípidos PC (zwitteriónicos)	13,8	13,4	13,8	13,2	13,8	
Lípidos PG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Grupo PO4-	19,4	16,2	19,4	15,9	19,4	
Lípidos asimétricos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ionizable (Positivo)	47,5	46,2	47,5	45,3	47,5	
Ionizable (Negativo)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Lípidos PEG	5,6	8,1	5,6	10,0	5,6	

Tabla 8. Centrado en el hígado

Objetivo/EnCore #	2185/2325	2345	2357	2360	2361	2362	2363	2368	2372	2373	2386	2391	2408	2410	2411	2413	2414	2416
DODMA				24,7	27,6	31,2	35,8											
DL-048	26,6	25,3						25,3	16,3	27,8	24,6	24,3	26,8	29,9	26,8	29,9	26,8	29,9
DL-049			25,3															
DL-033																		
DMPE-PEG2k	2,9	2,8	2,8	2,7	3,0	3,4	4,0				2,7	2,5	3,0	3,3	3,0	3,3	3,0	3,3
DMG-PEG2k								2,8	1,8	3,1								
DSPE-PEG2k																		
Total	29,6	28,1	28,1	27,4	30,6	34,6	39,8	28,1	18,1	30,9	27,3	26,8	29,7	33,2	29,7	33,2	29,7	33,2
DPPC	14,2																	
DSPC																		
MSPC															14,1	3,9		
POPC													14,1	3,9				
Liso PC																	14,1	3,9
POPG											0,4	2,2						
COL	34,0	36,0	36,0	36,3	34,7	32,7	30,1	36,0	41,0	34,6	36,2	35,5	33,7	37,7	33,7	37,7	33,7	37,7
DL-033																		
DL-036	22,2	36,0	36,0	36,3	34,7	32,7	30,1	36,0	41,0	34,6	36,2	35,5	22,5	25,1	22,5	25,1	22,5	25,1
DMPE-PEG2k																		
DSPE-PEG2k																		
DSG-PEG2k																		
Total	70,4	71,9	71,9	72,6	69,4	65,4	60,2	71,9	81,9	69,1	72,7	73,2	70,3	66,8	70,3	66,8	70,3	66,8
Suma total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

ES 2 981 700 T3

Tabla 9. Nombres químicos

Abreviaturas	Nombre químico	Núm. CAS
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina	63-89-8
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	816-94-4
MSPC	1-miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	76343-22-1
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	26853-31-6
Liso PC	1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina	17364-16-8
POPG	1-hexadecanoil-2-(9Z-octadecanoil)-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)	268550-95-4
COL	colesterol	57-88-5
DMPE-PEG2k	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]	474922-82-2
DMG-PEG2k	1,2-Dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol-2000	
DSPE-PEG2k	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]	474922-77-5
DSG-PEG2k	1,2-Distearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol-2000	308805-39-2
DODMA	1,2-dioleiloil-N,N-dimetilaminopropano	104162-47-2
DL-048	Dioleil-N,N-Dimetilglicina	
DL-049	Dioleil-N,N-Dimetilglicina	
DL-033	DiLin-N-Metilpiperazina	
DL-036	DiLin-N,N-Dimetilglicina	

Tabla 10

Formulación	PSD (nm)	PDI	% ARN encapsulado	Composición					KD ₅₀ del tumor (mpk)	KD ₅₀ hepática (µg/kg)	Nota
				DODMA	DMPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-036			
2141	100 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DODMA	DMPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-036	DSPE-PEG2k	De 0,5 a 1 en HCC	
2163	90 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-033	DSPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-033	DSG-PEG2k	< 0,5 en HCC	
2311	100 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-036	DSPE-PEG2k	De 0,5 a 1 en HCC	Contenido de PEG muy alto
2332	90 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-033	DSPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-033	DSG-PEG2k	a 5 en próstata	
2376	100 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DSPE-PEG2k	DSPC	COL	DL-036	DSPE-PEG2k	De 0,5 a 1 en HCC	
2185/2325	100 ± 10	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	DPPC	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2345	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	N/A	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2357	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-049	DMPE-PEG2k	N/A	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2360	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DODMA	DMPE-PEG2k	N/A	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2368	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMG-PEG2k	N/A	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2386	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMG-PEG2k	POPG (0,5 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2391	105 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMG-PEG2k	POPG (3 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 10 a 20
2408	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	POPC (20 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2410	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	POPC (5 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2411	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	MSPC (20 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2413	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	MSPC (5 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2414	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	Liso PC (C16, 20 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50
2416	100 ± 15	≤ 0,15	≥ 85 %	DL-048	DMPE-PEG2k	Liso PC (C16, 5 %)	COL	DL-036	N/A	N/A	De 20 a 50

Ejemplo 6: Formulaciones centradas en el hígado: Inactivación de HAO1

Se prepararon formulaciones de lípido-ácido nucleico adicionales como se describió, por ejemplo, 1de acuerdo con el proceso 2041 y se probaron para la producción efectiva de partículas terapéuticas, y para determinar una dosis y frecuencia mínimas suficientes para la inactivación del gen y proteína HAO1. El ARNipD dirigido a HAO se formuló en partículas lipídicas EnCore de acuerdo con las formulaciones específicas mostradas más abajo en la Tabla 11 y se preparó como se describió para el Ejemplo 1, el proceso 2141. Las formulaciones 2401 y 2373 contenían la misma combinación de lípidos y agente de ácido nucleico, pero diferían en que el proceso 2401 incluía la mezcla en línea de la solución o suspensión lipídica de envoltura con la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico, mientras que el proceso 2373 utilizaba la mezcla por lote.

Las partículas se inyectaron por vía intravenosa en ratones hembra y los animales se sacrificaron 24 y 168 horas después de la dosificación. Se recolectaron muestras de plasma y tejido hepático para el análisis de la expresión del gen y proteínas hidroxilácido oxidasa 1 (HAO1). El ARNipD dirigido fue un agente de iARN (ARNipD para MAO1), que tenía las siguientes secuencias, respectivamente SEQ ID NO: 7 y 8. Tenga en cuenta que, aunque la SEQ ID NO: 8 antisentido se muestra más abajo en la orientación 3'-5', en el listado de secuencias, todas las secuencias se presentan en la orientación 5'-3'.

Sentido: 5'- rAmUrAmUrUmUrUrCrCrCrArUrCmUrGmUrAmUrUrArUrUrUTT -3' (SEQ ID NO:7)
 Antisentido: 3'- mAmAmAmArArUrArAmUrAmCrAmGrAmUrGrGrArArArAmUrAmUmUmG-5' (SEQ ID NO:8)*

En este estudio, la eficacia de las partículas producidas con POPG como un lípido de envoltura se comparó con DPPC. Las partículas contenían cantidades variadas de POPG de 0,5 % a 3 %, mientras que otros componentes, que incluían los lípidos de envoltura colesterol y DL-036 y los lípidos de núcleo DL-048 y DMG-PEG2k fueron constantes en todas las formulaciones. Ver Tabla 10 más abajo.

Las partículas se prepararon como se describió anteriormente para los Ejemplos 1 y 5, mediante el uso de las formulaciones específicas descritas en la Tabla 11 más abajo, y el ARNipD formado a partir de las SEQ ID NO: 7 y 8, que se diseñó para interferir con el objetivo celular, MAO1.

Para este estudio, las formulaciones que contenían carga útil de ARNipD de FVII murino se inyectaron por vía intravenosa en ratones hembra CB57-BL6 a 10 ug/kg (círculos), 25 ug/kg (diamantes) o 50 ug/kg (cuadrados) como se indica en la Figura 9. Se recolectaron muestras de suero 24 horas después de la dosificación para acceder a la reducción de la proteína FVII mediante el uso del ensayo de actividad. El PBS se incluyó como control negativo. Las diferentes formulaciones EnCore se marcaron con números individuales de 4 dígitos como se indica en la Tabla 11 y la Figura 9. Se usaron diferentes composiciones de lípidos para cada formulación como se muestra en la parte inferior de la Figura.

Las partículas se probaron para determinar la eficacia mejorada mediante el análisis de la presencia del Factor VII en los ratones que reciben la molécula terapéutica de interferencia mediante las partículas lipídicas. El ensayo midió la conversión del factor X humano, un sustrato del Factor VII, al Factor Xa, una reacción que después actuó sobre sXa-11, un sustrato cromogénico, para producir un color medido a 405 nm. Los datos se muestran en la Tabla 11 y Figura 9.

Tabla 11. Formulaciones para la prueba de eficacia centrada en el hígado

Objetivo/EnCore #		Centrado en el hígado										
		2185 / 2325	2345	2368	2373	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2401
Núcleo	DL-048	26,6	25,3	25,3	27,8	27,0	26,9	26,8	26,7	26,6	26,5	27,8
	DMPE-PEG2k	2,9	2,8									
	DMG-PEG2k			2,8	3,1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,1
	Total	29,6	28,1	28,1	30,9	30,0	29,9	29,8	29,7	29,6	29,5	30,9
ENV	DPPC	14,2										
	POPG					0,4	0,8	1,1	1,4	1,8	2,1	
	COL	34,0	36,0	36,0	34,6	34,8	34,7	34,5	34,4	34,3	34,2	34,6
	DL-036	22,2	36,0	36,0	34,6	34,8	34,7	34,5	34,4	34,3	34,2	34,6
	Total	70,4	71,9	71,9	69,1	70,0	70,1	70,2	70,3	70,4	70,5	69,1
Suma total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

ES 2 981 700 T3

Listado de las secuencias descritas en la presente descripción:

SEQ ID NO:	AN/proteína	Especies	Secuencia 5' – 3' *
1	AN	sintético	GCCAGACUUUGUUGGAUUUGAAAtt
2	AN	sintético	AAUUUCAAAAU <u>CCAACA</u> AGUCUG <u>GGCUU</u>
3	AN	sintético	AGGA <u>ACU</u> AUG <u>ACCUCG</u> ACUACGAct
4	AN	sintético	<u>UGUCCU</u> UGAUACUG <u>GAGCU</u> GAUG <u>CGU</u>
5	AN	sintético	AGCUUUUUUG <u>CCCUCG</u> UGACCAga
6	AN	sintético	<u>CCUCG</u> AAAAAACGGGACGCACUG <u>GUCU</u>
7	AN	sintético	rAmUrAmUrUmUrUrCrCrCrArUrCmUrGmUrAmUrUrArUrUrUTT
8	AN	sintético	GUmUmAmUrAmArArArGrGrGrUrAmGrAmCrAmUrAmArUrArAr mAmAmAm

* donde las letras en MAYÚSCULAS significan nucleótido de ARN, las letras mayúsculas subrayadas significan un nucleótido 2'-O-metil-ARN, y letras minúsculas significan un nucleótido de ADN.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula que comprende un agente aniónico que comprende:

- 5 (a) combinar en una solución acuosa ácida (i) un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico, en donde el lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido y agente aniónico es un lípido modificado con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida o gangliósido, y (ii) un lípido catiónico, en una cantidad suficiente para que se forme un complejo;
- 10 (b) combinar el complejo de la etapa (a) con un agente aniónico;
- (c) combinar una solución acuosa neutra con el complejo-agente aniónico de la etapa (b) para formar una suspensión acuosa de complejo-agente aniónico, en donde la solución acuosa neutra es agua;
- 15 (d) formar una solución o suspensión que comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en un lípido neutro, un esteroil, un lípido catiónico, y un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido y agente aniónico es un lípido modificado con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida o gangliósido; y
- 20 (e) combinar la solución o suspensión de la etapa (d) con la solución acuosa de complejo-agente aniónico de la etapa (c) mediante un método seleccionado del grupo que consiste en adicionar la solución o suspensión de la etapa (d) a la suspensión acuosa de complejo-agente aniónico de la etapa (c) y mezclar en línea la solución o suspensión de la etapa (d) y la solución acuosa de complejo-agente aniónico de la etapa (c), para producir de esta manera una partícula que comprende un agente aniónico.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución acuosa ácida de la etapa (a) comprende HCl, preferentemente, HCl a aproximadamente 60 mM, y/o posee un pH de menos de 4.

30 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho lípido catiónico de la etapa (a) comprende un grupo protonatable y, preferentemente, tiene un pKa de 4 a 11, preferentemente, en donde dicho lípido catiónico de la etapa (a) se selecciona del grupo que consiste en DODMA, DOTMA y un lípido catiónico de la Tabla 1.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico de la etapa (a) o la etapa (d) es un lípido modificado con PEG, preferentemente, seleccionado del grupo que consiste en DMPE-PEG, DSPE-PEG y DSG-PEG.

35 5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente aniónico es un ácido nucleico, preferentemente, en donde dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico de doble hebra.

40 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho ácido nucleico de doble hebra se selecciona del grupo que consiste en un ARN en horquilla pequeño (ARNhp) y un ARNip, preferentemente, en donde dicho ácido nucleico de doble hebra es un sustrato de Dicer humana.

45 7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha formación de una solución o suspensión de la etapa (d) implica la disolución en etanol de dicho al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en un lípido neutro, un esteroil, un lípido catiónico y un lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-agente aniónico, en donde el lípido modificado que evita la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido y agente aniónico es un lípido modificado con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida o gangliósido.

50 8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha formación de una solución o suspensión de la etapa (d) comprende mezclar una pluralidad de lípidos con etanol para formar una segunda solución lipídica y adicionar colesterol a dicha segunda solución lipídica mediante la combinación de dicha segunda solución lipídica con colesterol como un polvo a temperatura ambiente.

55 9. El método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que comprende, además, la siguiente etapa:

(f) combinar la partícula que comprende un agente aniónico con un volumen de agua suficiente para reducir la concentración de etanol dentro de la solución combinada a 10 % o menos.

60 10. El método de la reivindicación 9 que comprende, además, la etapa de:

(g) realizar un proceso seleccionado del grupo que consiste en filtración de flujo tangencial (TFF) y diálisis a dicha solución combinada, preferentemente, en donde dicha solución combinada se dializa contra PBS.

11. El método de la reivindicación 1 o 7, en donde el lípido neutro es DSPC, DPPC o DOPC.

Figura 1

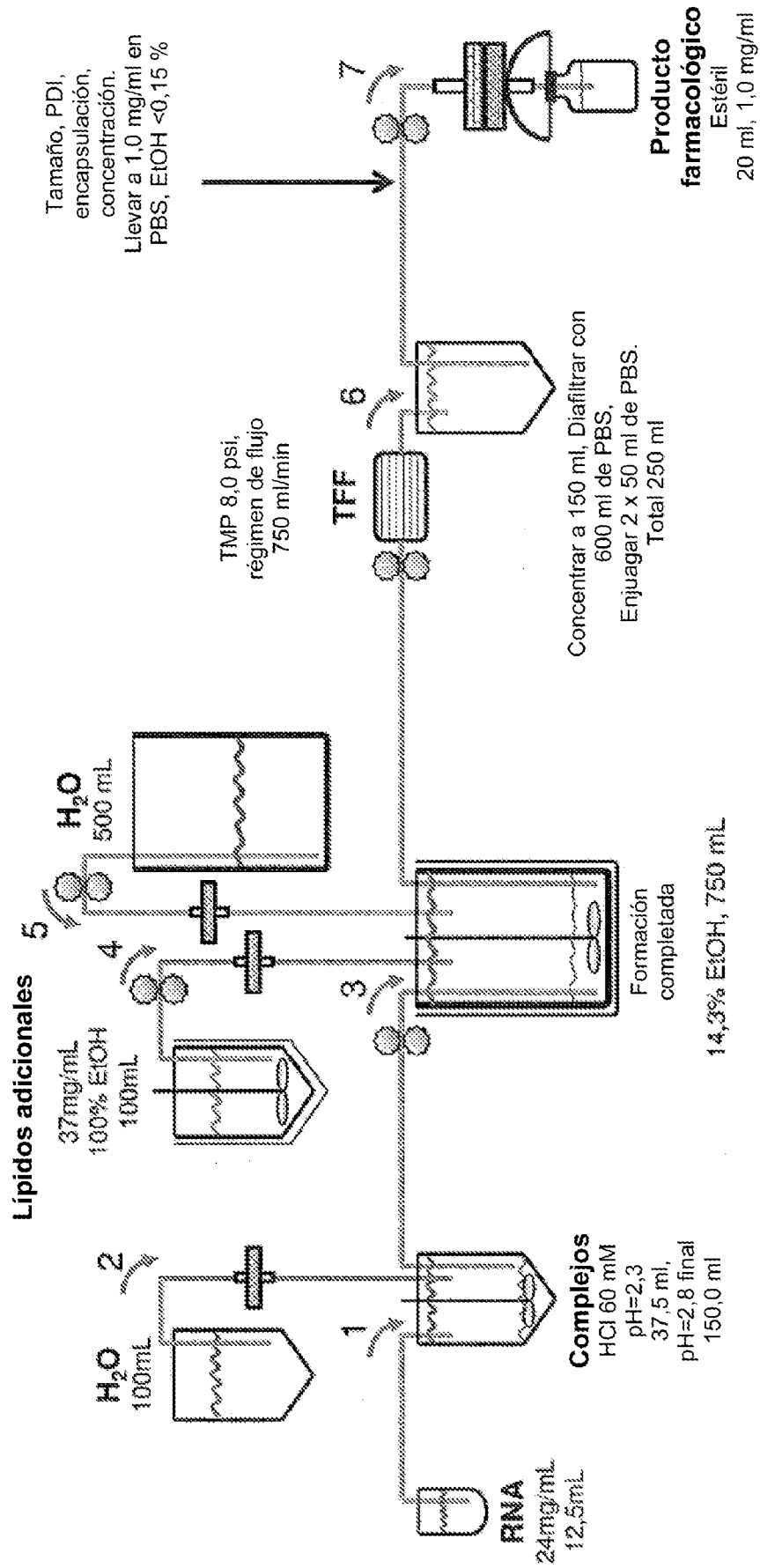


Figura 2

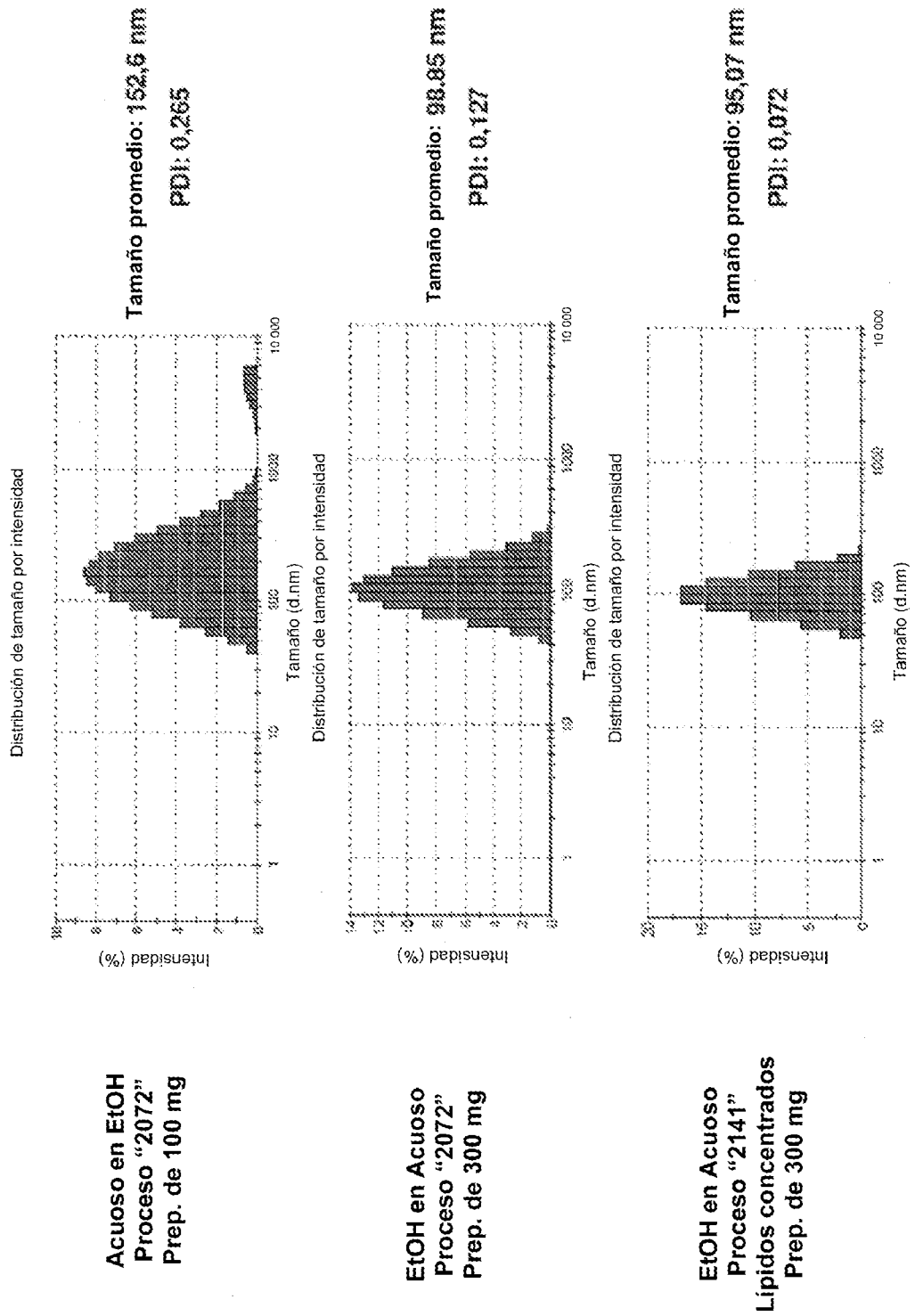


Figura 3

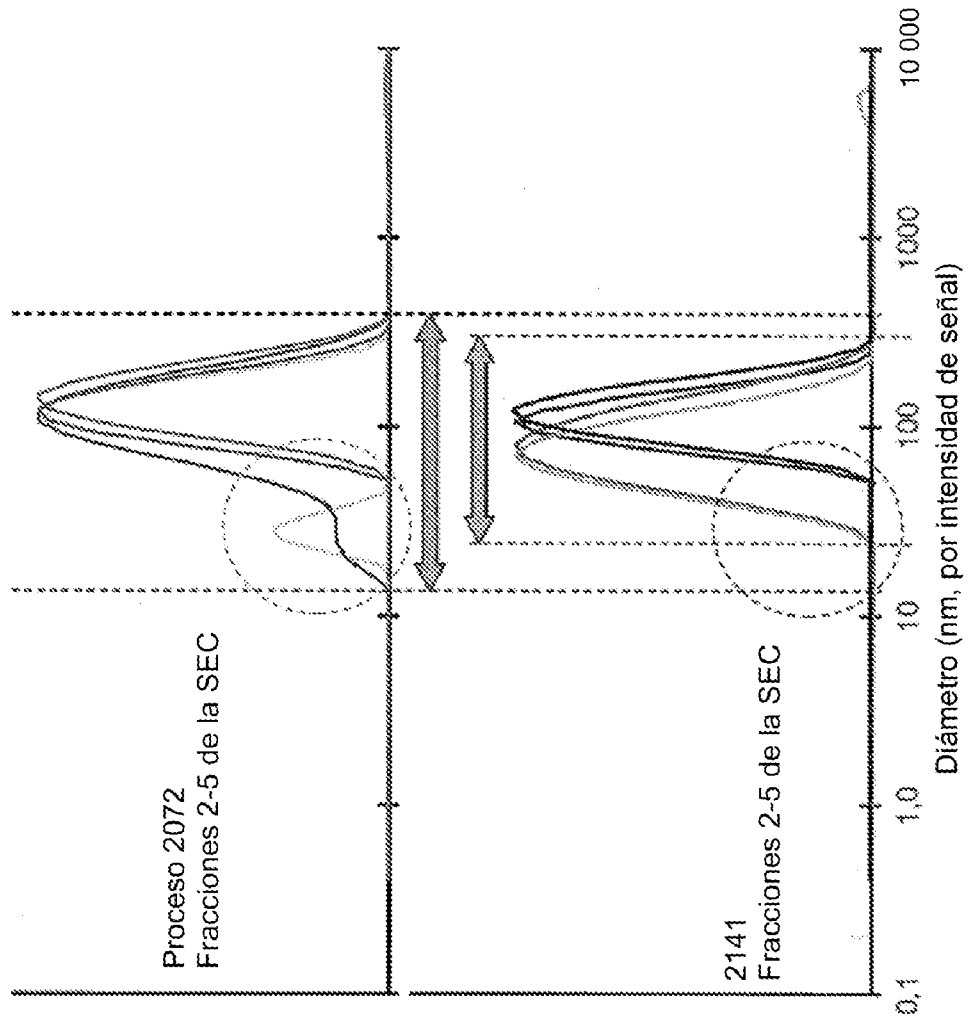


Figura 4

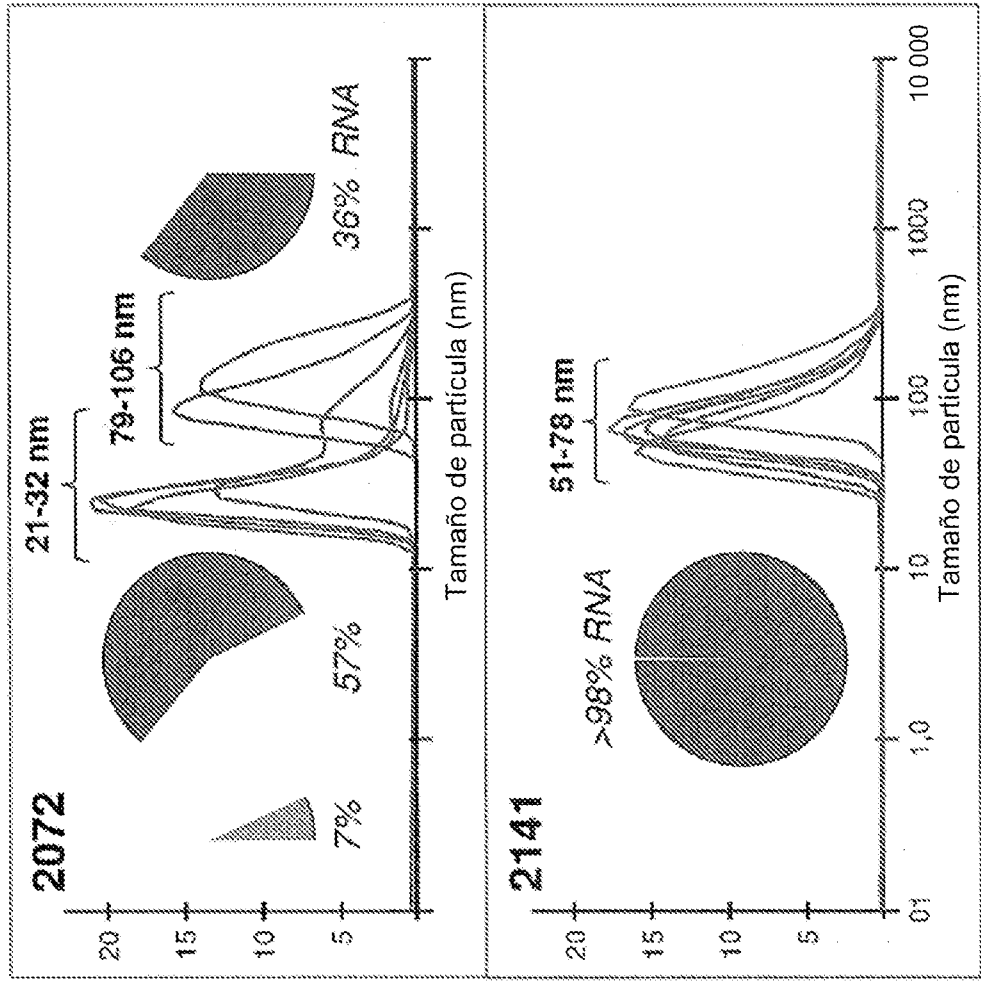


Figura 5

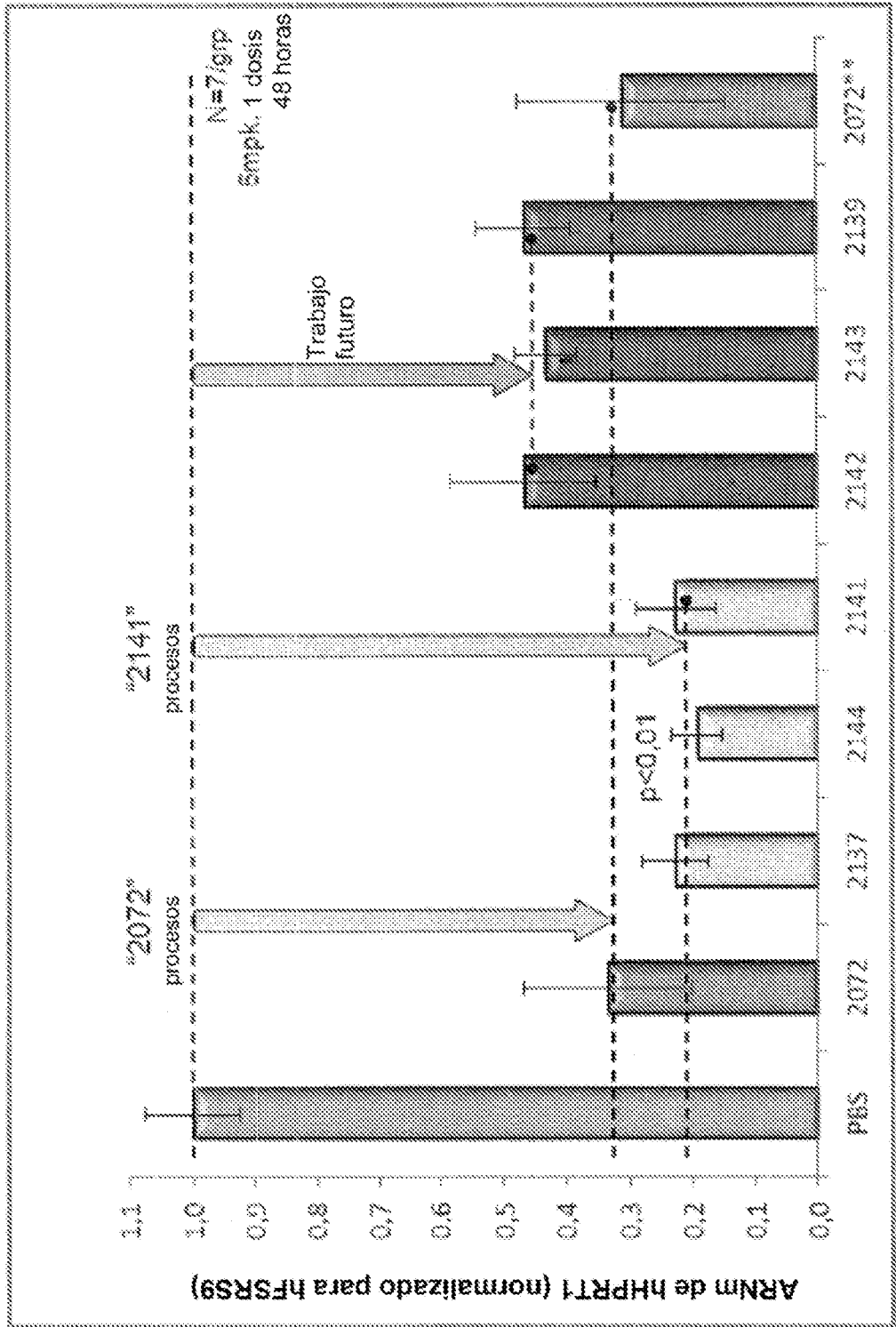
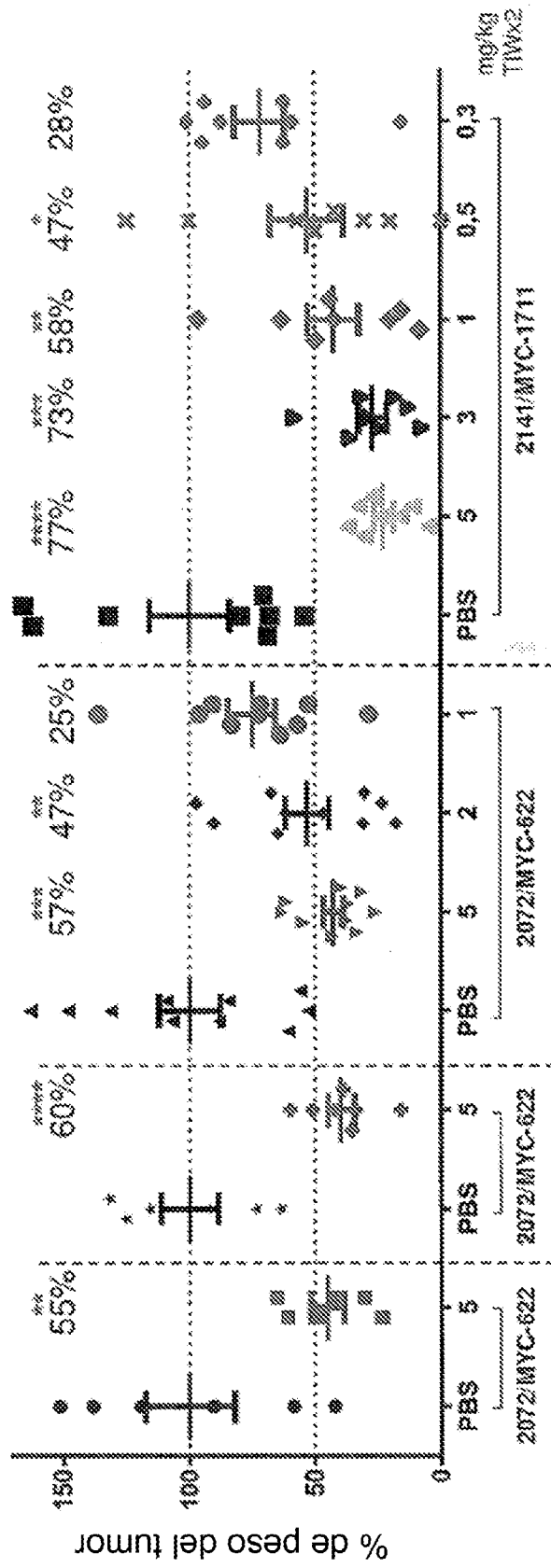
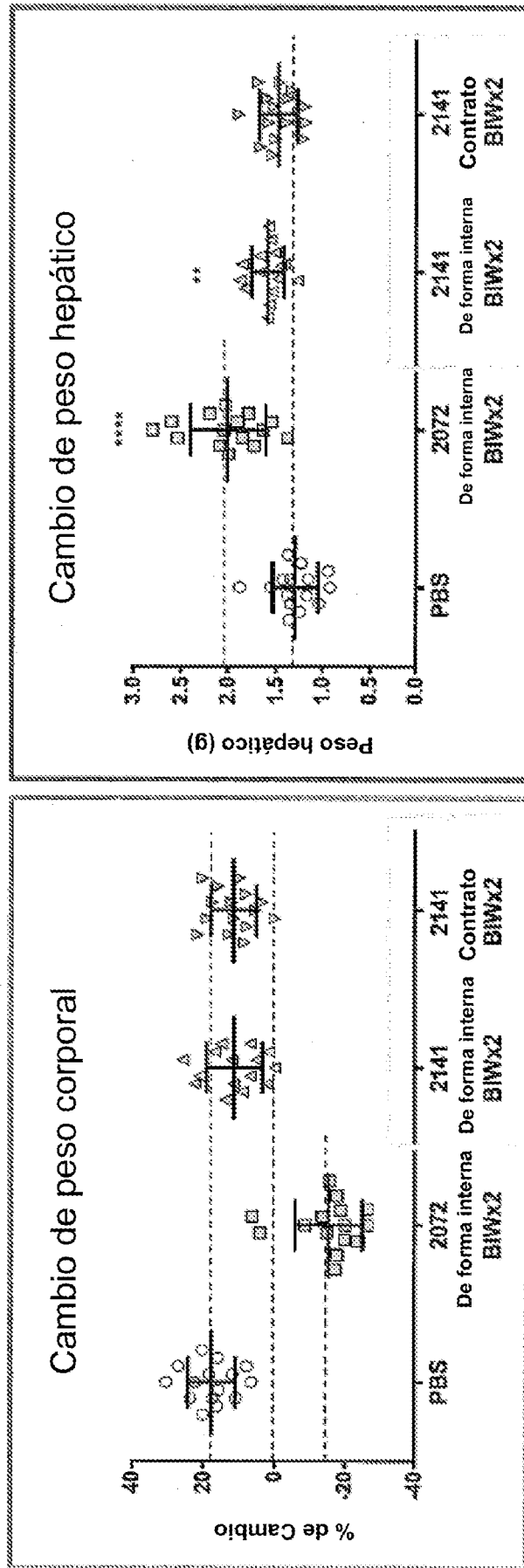


Figura 6



Parámetro	2072/MYC-622		2072/MYC-622		2072/MYC-622		2141/MYC-1711		2141/MYC-1711						
	PBS	2072	PBS	2072	PBS	2072	PBS	2072	PBS	2072					
10mpk Ave	128	346	136	19,8	830	59,4	39	3500	71,2	3,1	2,75	2,94	1,00	13,2	1,00
Cambio/PBS	1,00	2,84	1,06	1,00	41,9	3,00	1,00	34,9	4,85	1,00	0,89	0,95	1,00	13,2	1,00
2072/2141		2,68			13,9			21,0			1,19			13,2	

Figura 7



n = 15/grupo

Figura 8

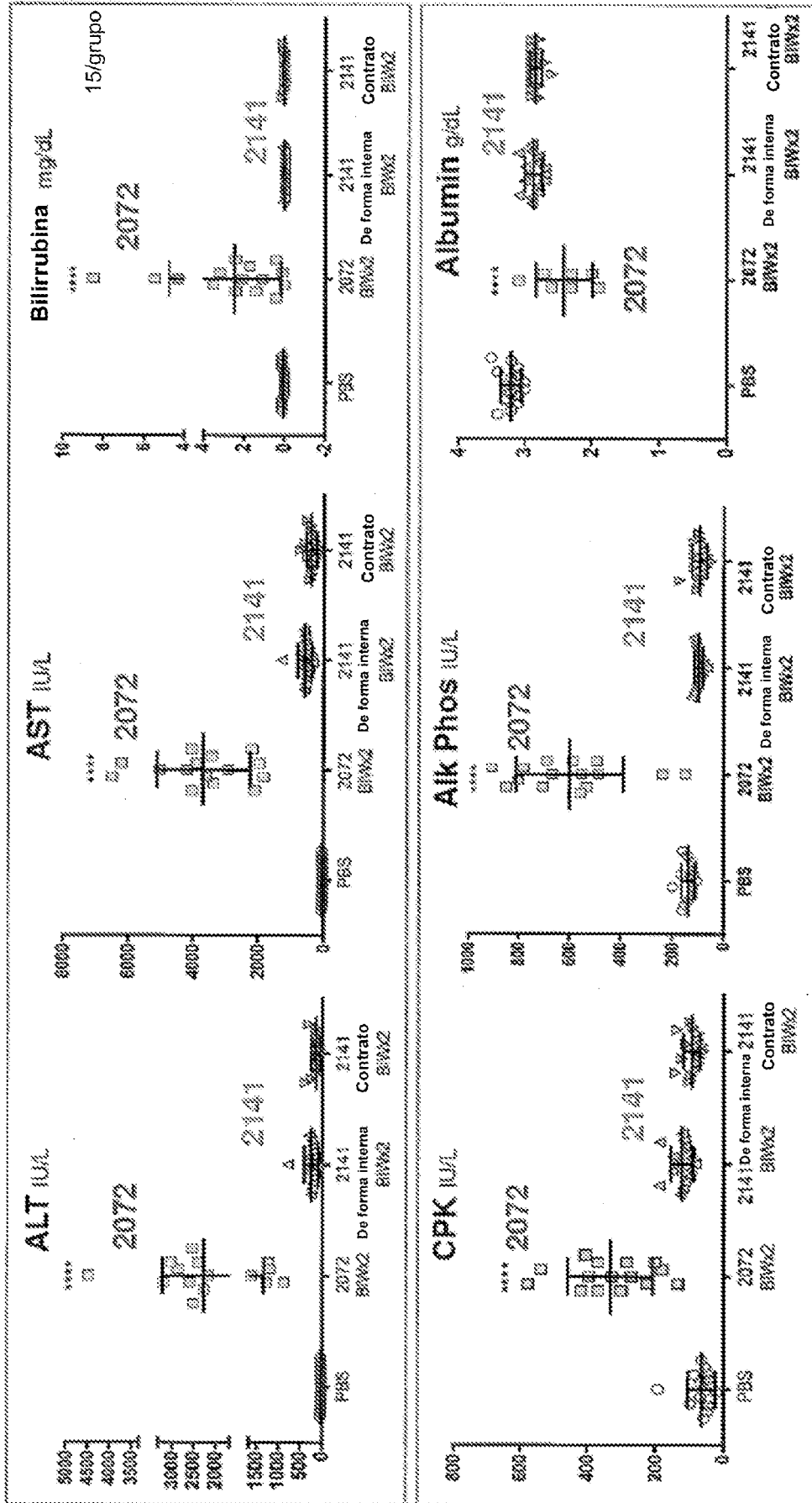


Figura 9

