

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 931 174**

(51) Int. Cl.:

**C07C 235/10** (2006.01) **A61K 9/127** (2006.01)  
**C07C 235/60** (2006.01) **A61K 47/69** (2007.01)  
**A61K 47/16** (2006.01) **A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**C07H 15/10** (2006.01)  
**C07D 475/04** (2006.01)  
**C07K 7/23** (2006.01)  
**C07K 7/64** (2006.01)  
**C07C 233/38** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2010 PCT/US2010/028000**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10108108**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 10709947 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2022 EP 2414322**

(54) Título: **Derivados de poliamina**

(30) Prioridad:

**20.03.2009 US 161828 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.12.2022**

(73) Titular/es:

**EGEN, INC. (100.0%)**  
**601 Genome Way Suite 3100**  
**Huntsville, AL 35806, US**

(72) Inventor/es:

**SLOBODKIN, GREGORY;**  
**CONGO, RICHARD;**  
**MATAR, MAJED;**  
**FEWELL, JASON;**  
**ANWER, KHURSHEED y**  
**SPARKS, BRIAN, JEFFERY**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 931 174 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

- Derivados de poliamina
- 5 Antecedentes de la invención
- Campo de la invención
- 10 La invención se refiere a derivados de poliaminas simétricas y formulaciones que comprenden tales compuestos, y más específicamente a derivados de poliaminas que se encuentran parcialmente acilados y opcionalmente portan un grupo auxiliar. Tales compuestos son útiles en la introducción de ARNic en una célula, el silenciamiento de la expresión de una secuencia diana, la administración de ARNic *in vivo*, y en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos.
- 15 Cualquier referencia a métodos de tratamiento en los párrafos subsecuentes de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).
- 20 Descripción de la técnica relacionada
- Los compuestos, composiciones y métodos de la invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, de investigación, y de diagnóstico que se basan en la transferencia eficiente de moléculas biológicamente activas hacia las células, los tejidos, y los órganos. La discusión se proporciona solo para entender la invención que sigue.
- 25 La administración celular de varios compuestos terapéuticos, tales como agentes antivirales y quimioterapéuticos, usualmente se ve comprometida por dos limitaciones. En primer lugar, la selectividad de un número de agentes terapéuticos es a menudo baja, lo que resulta en una alta toxicidad para los tejidos normales. En segundo lugar, el tráfico de muchos compuestos hacia las células vivas se encuentra altamente restringido por los complejos sistemas de membrana de la célula. Los transportadores específicos permiten la entrada selectiva de nutrientes o moléculas reguladoras, mientras excluyen la mayoría de las moléculas exógenas tales como los ácidos nucleicos y las proteínas. Se pueden usar varias estrategias para mejorar el transporte de compuestos hacia las células, lo que incluye el uso de transportadores de lípidos, polímeros biodegradables, y varios sistemas conjugados.
- 30
- 35 Los enfoques mejor estudiados para mejorar el transporte de ácidos nucleicos extraños en las células implican el uso de vectores virales o lípidos catiónicos y citofectinas relacionadas. Los vectores virales se pueden usar para transferir genes de manera eficiente a algunos tipos de células, pero generalmente no se pueden usar para introducir moléculas que se sintetizan químicamente en las células. Un enfoque alternativo es usar formulaciones de administración que incorporen lípidos catiónicos, los que interactúan con los ácidos nucleicos a través de un extremo y los lípidos o los sistemas de membrana a través del otro. Los ácidos nucleicos sintéticos, así como también los plásmidos, se pueden administrar mediante el uso de las citofectinas, aunque la utilidad de tales compuestos a menudo se encuentra limitada por la especificidad del tipo de célula, el requisito de suero bajo durante la transfección, y la toxicidad.
- 40
- 45 Otro enfoque para administrar moléculas biológicamente activas implica el uso de conjugados. Los conjugados a menudo se seleccionan en base a la capacidad de determinadas moléculas para transportarse de manera selectiva a células específicas, por ejemplo, mediante endocitosis mediada por receptores. Al unir un compuesto de interés a moléculas que se transportan activamente a través de las membranas celulares, se puede realizar la transferencia efectiva de ese compuesto hacia las células o a orgánulos celulares específicos. Alternativamente, las moléculas que son capaces de penetrar las membranas celulares sin mecanismos de transporte activo, por ejemplo, varias moléculas lipófilas, se pueden usar para administrar compuestos de interés. Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como conjugados incluyen, pero no se limitan a, péptidos, hormonas, ácidos grasos, vitaminas, flavonoides, azúcares, moléculas indicadoras, enzimas indicadoras, quelantes, porfirinas, intercaladores y otras moléculas que son capaces de penetrar las membranas celulares, ya sea por transporte activo o por transporte pasivo.
- 50
- 55
- 60
- 65
- El suministro de compuestos a tipos de células específicos, por ejemplo, células cancerosas o células específicas de tejidos y órganos particulares, se puede lograr al utilizar receptores asociados con tipos de células específicos. Los receptores particulares se sobreexpresan en determinadas células cancerosas, lo que incluye el receptor de ácido fólico de alta afinidad. Por ejemplo, el receptor de folato de alta afinidad es un marcador tumoral que se sobreexpresa en una variedad de tejidos neoplásicos, lo que incluye los tumores de mama, ovario, cuello uterino, colorrectal, renal y nasofaríngeo, pero se expresa en un grado muy limitado en tejidos normales. El uso de conjugados en base a ácido fólico para transportar compuestos exógenos a través de las membranas celulares puede proporcionar un enfoque de administración que se dirige al tratamiento y diagnóstico de enfermedades y puede proporcionar una reducción en la dosis que se requiere de compuestos terapéuticos. Adicionalmente, la biodisponibilidad terapéutica, la farmacodinámica y los parámetros farmacocinéticos se pueden modular a través del

uso de bioconjugados, lo que incluye los bioconjugados de folato. Se ha reportado la síntesis de pteroilo-L-glutamatos biológicamente activos. Se ha descrito un método para la síntesis en fase sólida de determinados conjugados de oligonucleótido folato, así como también de oligonucleótidos modificados con grupos conjugados específicos. Se ha reportado del uso de conjugados de biotina y folato para potenciar el transporte transmembrana de moléculas exógenas, lo que incluye oligonucleótidos específicos. Se han descrito determinados conjugados de folato, lo que incluye conjugados de folato de ácido nucleico específicos con un resto de fosforamidita unido al componente de ácido nucleico del conjugado, y métodos para la síntesis de estos conjugados de folato. Se ha reportado de la síntesis de un intermediario ácido alfa-[2-(trimetilsilil)etoxicarbonil]fólico, útil en la síntesis de determinados tipos de conjugados de folatonucleósido.

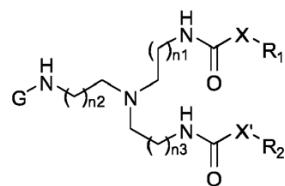
La administración de compuestos a otros tipos de células se puede lograr al utilizar receptores asociados con un determinado tipo de célula, tales como los hepatocitos. Por ejemplo, los sistemas de administración de fármacos que utilizan endocitosis mediada por receptores se han empleado para lograr la dirección de fármacos así como también potenciar la absorción de fármacos. El receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) es único de los hepatocitos y se une a glicoproteínas que terminan en galactosa ramificada, tal como el asialoorosomucoide (ASOR). La unión de tales glicoproteínas o glicoconjugados sintéticos al receptor tiene lugar con una afinidad que depende en gran medida del grado de ramificación de la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, las estructuras triatenarias se unen con mayor afinidad que las cadenas biatenarias o monoatenarias (ejemplo de esta alta especificidad a través del uso de N-acetil-D-galactosamina como resto de carbohidrato, que tiene más alta afinidad por el receptor, en comparación con la galactosa). Este "efecto de agrupamiento" también se ha descrito para la unión y absorción de glicoproteínas o glicoconjugados que terminan en manosilo. El uso de conjugados en base a galactosa y galactosamina para transportar compuestos exógenos a través de las membranas celulares puede proporcionar un enfoque de administración que se dirige al tratamiento de enfermedades hepáticas tales como la infección por VHB y VHC o el carcinoma hepatocelular. El uso de bioconjugados también puede proporcionar una reducción en la dosis que se requiere de compuestos terapéuticos que se requieren para el tratamiento. Adicionalmente, la biodisponibilidad terapéutica, la farmacodinámica, y los parámetros farmacocinéticos se pueden modular a través del uso de bioconjugados.

Se han desarrollado un número de transportadores celulares en base a péptidos por varios grupos de investigación. Estos péptidos son capaces de atravesar las membranas celulares *in vitro* e *in vivo* con alta eficiencia. Los ejemplos de tales péptidos fusogénicos incluyen un fragmento de 16 aminoácidos del homeodomino de ANTENNAPEDIA, un factor de transcripción de *Drosophila*; un fragmento de 17 mer que representa la región hidrófoba de la secuencia señal del factor de crecimiento de fibroblastos de *Kaposi* con o sin dominio NLS; una secuencia señal peptídica de 17 unidades de la cadena ligera de Ig(5) de caiman *crocodylus*; una secuencia de fusión de 17 aminoácidos de la glicoproteína gp4114 de la envoltura del VIH; el fragmento de VIH-1 Tat49-57; un transportano A-27 aquimérico-mer que consiste en un fragmento N-terminal de neuropéptido galanina y péptido de veneno de avispa que interactúa con la membrana mastoporano; y un 24-mer derivado de la glicoproteína de la envoltura de hemaglutinina del virus de la influenza. Estos péptidos se usaron con éxito como parte de un conjugado de péptido-oligodesoxirribonucleótido antisentido para la transfección de cultivos celulares sin lípidos. En un número de casos, tales conjugados demostraron una mejor eficacia en el cultivo celular que los oligonucleótidos de origen que se transfecaron mediante el uso de la administración de lípidos. Además, el uso de técnicas de visualización de fagos ha identificado varios péptidos que se dirigen a órganos y tumores *in vivo*. Se ha demostrado que la conjugación de péptidos que se dirigen a tumores con doxorrubicina mejora significativamente el perfil de toxicidad y ha demostrado una eficacia potenciada de la doxorrubicina en el modelo de cáncer murino *in vivo* MDA-MB-435 de carcinoma de mama.

Otro enfoque para la administración intracelular de moléculas biológicamente activas implica el uso de polímeros catiónicos (por ejemplo, se ha descrito el uso de polímeros de lisina de alto peso molecular para aumentar el transporte de varias moléculas a través de las membranas celulares). Se han descrito determinados métodos y composiciones para transportar fármacos y macromoléculas a través de membranas biológicas en las que el fármaco o macromolécula se une covalentemente a un polímero de transporte que consiste en de 6 a 25 subunidades, de las cuales al menos el 50 % contiene una cadena lateral de guanidina o amidina. Los polímeros de transporte son preferentemente péptidos de poliarginina compuestos todo D-, todo L- o mezclas de D- y L-arginina. También se describen determinados compuestos de polilisina y poliarginina para la administración de fármacos y otros agentes a través de tejidos epiteliales, lo que incluye la piel, el tracto gastrointestinal, el epitelio pulmonar y la barrera hematoencefálica. También se han descrito determinados compuestos de poliarginina y determinados compuestos de polilisina y poliarginina para la administración intraocular de fármacos. Se han descrito determinadas composiciones de polímeros de ciclodextrano que incluyen un componente de polímero catiónico reticulado y determinadas formulaciones en base a lípidos.

Otro enfoque para el suministro intracelular de moléculas biológicamente activas implica el uso de liposomas u otras composiciones formadoras de partículas. Desde la primera descripción de los liposomas en 1965, ha habido un interés y un esfuerzo constantes en el área del desarrollo de sistemas de transporte en base a lípidos para la administración de compuestos farmacéuticamente activos. Los liposomas son transportadores de fármacos atractivos ya que protegen las moléculas biológicas de la degradación mientras mejoran su absorción celular. Una de las clases de formulaciones de liposomas que más se usan para administrar polianiones (por ejemplo, ADN) es la

- que contiene lípidos catiónicos. Los agregados de lípidos se pueden formar con macromoléculas mediante el uso de lípidos catiónicos solos o incluyendo otros lípidos y anfífilos tal como la fosfatidiletanolamina. Es bien conocido en la técnica que tanto la composición de la formulación de lípidos así como también su método de preparación tienen efecto sobre la estructura y el tamaño de la macromolécula aniónica resultante y agregado de lípido catiónico. Estos factores se pueden modular para optimizar la administración de polianiones a tipos de células específicos *in vitro* e *in vivo*. El uso de lípidos catiónicos para la administración celular de moléculas biológicamente activas tiene varias ventajas. La encapsulación de compuestos aniónicos mediante el uso de lípidos catiónicos es esencialmente cuantitativa debido a la interacción electrostática. Además, se cree que los lípidos catiónicos interactúan con las membranas celulares cargadas negativamente, lo que inicia el transporte de la membrana celular.
- Los experimentos han demostrado que el ADN plasmídico se puede encapsular en pequeñas partículas que consisten en un único plásmido encapsulado dentro de una vesícula de bicapa lipídica. Estas partículas contienen típicamente el lípido fusogénico de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), niveles bajos de un lípido catiónico, y se pueden estabilizar en medios acuosos mediante la presencia de un recubrimiento de poli(etilenglicol) (PEG). Estas partículas tienen aplicaciones sistémicas, ya que exhiben una vida útil prolongada en circulación después de la inyección intravenosa (iv), se pueden acumular preferentemente en varios tejidos y órganos o tumores debido a la mayor permeabilidad vascular en tales regiones, y se pueden diseñar para escapar de la vía lisosómica de endocitosis por alteración de las membranas endosómicas. Estas propiedades pueden ser útiles para administrar moléculas biológicamente activas a varios tipos de células para aplicaciones experimentales y terapéuticas. Por ejemplo, el uso efectivo de tecnologías de ácidos nucleicos tales como el ARN de interferencia corto (ARNic), antisentido, ribozimas, señuelos, oligonucleótidos formadores de tríplex, oligonucleótidos 2-5A y aptámeros *in vitro* e *in vivo* se puede beneficiar de la administración eficiente de estos compuestos a través de las membranas celulares. Se han descrito determinadas composiciones que consisten en la combinación de ARNic, determinados compuestos anfípicos, y determinados policationes. Se han descrito determinadas formulaciones en base a lípidos, determinadas formulaciones de ARN de interferencia encapsuladas en lípidos y determinadas composiciones policationicas para la administración celular de polinucleótidos. También se han descrito moléculas de ácido nucleico de interferencia corto (ANic) y varias tecnologías para la administración de moléculas de ANic y otros polinucleótidos.
- Además, un trabajo reciente que implica partículas de lípidos catiónicos demostró la formación de dos complejos estructuralmente diferentes que comprenden ácido nucleico (u otro compuesto polianiónico) y lípidos catiónicos. Una estructura comprende una estructura multilamelar con monocapas de ácido nucleico intercaladas entre bicapas lipídicas catiónicas ("estructura lamelar"). Una segunda estructura comprende una estructura de fase columnar hexagonal bidimensional ("estructura hexagonal invertida") en la que las moléculas de ácido nucleico se encuentran rodeadas por lípido catiónico en la formación de una estructura hexagonal. Los autores también demostraron que la estructura hexagonal invertida transfecta células de mamífero de manera más eficiente que la estructura lamelar. Adicionalmente, los estudios de microscopía óptica mostraron que los complejos que comprenden la estructura laminar se unen de manera estable a las vesículas aniónicas sin fusionarse con las vesículas, mientras que los complejos que comprenden la estructura hexagonal invertida son inestables y se fusionan rápidamente con las vesículas aniónicas, liberando el ácido nucleico tras la fusión.
- La transformación estructural de los complejos de fase lamelar a fase hexagonal invertida se logra ya sea mediante al incorporar un lípido auxiliar adecuado que ayuda a la adopción de una estructura hexagonal invertida o mediante el uso de un tensioactivo, tal como el hexanol. Sin embargo, ninguna de estas condiciones de transformación es adecuada para la administración en sistemas biológicos. Adicionalmente, mientras que el complejo hexagonal invertido exhibe una mayor eficiencia de transfección, tiene una estabilidad sérica muy pobre en comparación con el complejo lamelar. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de diseñar agentes de administración que sean estables en suero.
- El documento WO 03/106636 describe un proceso para la administración de un polinucleótido a una célula. El proceso comprende formar un complejo salino estable entre el polinucleótido y un tensioactivo catiónico.
- Resumen de la invención**
- La invención proporciona compuestos, composiciones y métodos para mejorar la eficiencia de la administración sistémica y local de moléculas biológicamente activas. Entre otras cosas, la invención proporciona compuestos, composiciones y métodos para fabricar y usar agentes de administración que son estables en circulación y experimentan cambios estructurales bajo condiciones fisiológicas apropiadas (por ejemplo, pH) que aumentan la eficiencia del suministro de moléculas biológicamente activas.
- De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de la fórmula (A):



(A)

10 en donde

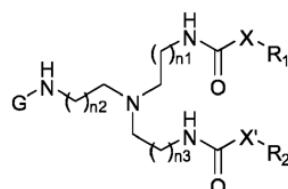
n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;

X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

15 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y

G es un resto de polímero.

20 El compuesto de fórmula (A) es un compuesto de fórmula I, excepto que G en la fórmula (A) es un resto de polímero y no hidrógeno,



I

30 en donde

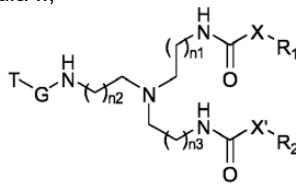
n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;

X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

35 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y

G es hidrógeno o un resto de polímero.

También se describen compuestos de fórmula II,



II

45 en donde

n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;

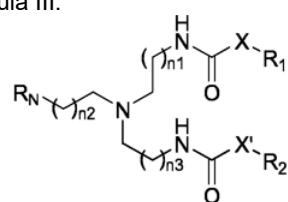
X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

50 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y

T es un ligando de direccionamiento; y

G es un enlace o un resto de polímero.

55 También se describen compuestos de fórmula III:



III

65 en donde

n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;

X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y

5 R<sub>N</sub> representa NHR<sub>4</sub>, NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, o N<sup>+</sup>R<sub>4</sub>R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> representa independientemente grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

También se describen intermediarios sintéticos que son útiles en la fabricación de los compuestos de Fórmulas A y I-III.

10 Un aspecto de la invención proporciona una formulación que comprende un compuesto de fórmula (A). Las formulaciones de la invención contienen lipoplejos o liposomas formados por el compuesto de fórmula (A).

15 Un aspecto de la invención proporciona formulaciones que comprenden un compuesto de fórmula (A) y otra molécula, que puede ser una molécula biológicamente activa. La molécula biológicamente activa se puede (a) seleccionar del grupo que consiste en: ARN ribosómico; polinucleótidos antisentido de ARN o ADN; ribozimas; ARNic; ARNh; miARN; y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc o ARNm que codifican una proteína terapéuticamente útil; o (b) proteínas, péptidos, colesterol, hormonas, moléculas pequeñas tales como antivirales o quimioterapéuticos, vitaminas, y cofactores.

20 En un aspecto relacionado, la invención proporciona formulaciones que comprenden un compuesto de fórmula (A) y un aptámero. En estas formulaciones, el aptámero no se encuentra unido covalentemente al compuesto.

25 Otro aspecto de la invención proporciona formulaciones que comprenden partículas formadas por el compuesto de fórmula (A) y otra molécula, que puede ser una molécula biológicamente activa. En este aspecto, la invención proporciona partículas estables útiles para encapsular, por ejemplo, una o más moléculas de ARNic.

También se describe un método para introducir ARNic en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una formulación de la invención.

30 También se describe un método para modular la expresión de una secuencia diana, dicho método que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación de la invención.

35 También se describe un método para la administración de ARNic *en vivo*, dicho método que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación de la invención.

También se describe un método para la administración de ADN plasmídico *in vivo*, dicho método que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación de la invención.

40 También se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto mamífero, dicho método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación de la invención.

45 Sorprendentemente, se ha descubierto que las formulaciones y los sistemas de administración que se fabrican mediante el uso de compuestos de la invención, por ejemplo, dioleoil monoamina, son eficaces para la reducción específica de transcritos y son relativamente no tóxicos.

También se ha descubierto sorprendentemente que el uso de formulaciones y sistemas de administración de la invención resulta en una absorción preferencial de un fármaco por el tejido pulmonar y también conduce a una reducción preferencial de transcritos en el pulmón con relación a otros tejidos tales como el hígado.

50 Descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de proteína de VEGF en medio de cultivo celular después de una transfección *in vitro* mediante el uso de células de carcinoma de células escamosas murinas VII (SCCVII). Las células se transfecaron con ARNic formulado con dioleoil monoamina (no forma parte de la invención).

60 La Figura 2 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de proteína de VEGF en medio de cultivo celular después de una transfección *in vitro* mediante el uso de células de carcinoma de células escamosas murinas VII (SCCVII). Las células se transfecaron con ARNic formulado con dioleoil monoamina o dioleoil monoamina de metilo (ninguna forma parte de la invención).

65 La Figura 3 es un gráfico que muestra la reducción específica del transcripto de ARNic (Caveolina-1) en el pulmón y el hígado de ratones después de una única inyección iv de ARNic formulado con dioleoil monoamina (no forma parte de la invención).

La Figura 4A y la Figura 4B son gráficos que muestran los niveles del transcripto de mVEGF en tumores SCCVII después de la inyección IT de ARNic de VEGF formulado con dioleoil monoamina (que no forma parte de la invención) (Figura 4A) y la inhibición del crecimiento tumoral (Figura 4B) en ratones después de la administración intratumoral de ARNic de VEGF formulado.

5 La Figura 5A y la Figura 5B son gráficos que muestran los niveles relativos del transcripto de Caveolina-1 (Cav-1) en medio de cultivo celular después de una transfección *in vitro* mediante el uso de células escamosas murinas de células de carcinoma VII (SCCVII). Las células se transfecaron con complejos de ARNic y dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina (Figura 5A) o ARNic encapsulado con dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina (Figura 5B).

10 La Figura 6 muestra la reducción específica del transcripto de ARNic (Cav-1) dependiente de la dosis (10 µg-100 µg) en el pulmón de ratones después de una única inyección iv de ARNic en complejo con dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina.

15 La Figura 7 muestra los niveles de expresión de proteínas de β-actina en medio de cultivo celular después de una transfección *in vitro* mediante el uso de células HepG2. Las células se transfecaron con ARNic formulado con dioleoil monoamina/lactobionil-dioleoil monoamina.

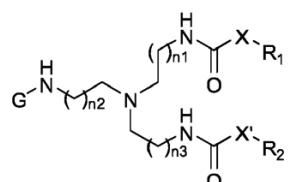
20 La figura 8 muestra la liberación controlada de ARNic de Cav-1 en complejo con dioleoil monoamina (que no forma parte de la invención) a partir de geles de alginato con y sin EDTA.

25 La Figura 9 muestra la reducción específica del transcripto de ARNic (Cav-1) en el pulmón y el hígado de ratones después de una única inyección iv de ARNic en complejo con dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina, o con DOTAP:DOPE (1:1), o con BPEI.

La Figura 10 muestra la actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil amina reticulada/antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) que se dirige al aptámero (no forma parte de la invención).

30 Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención proporciona un compuesto de la fórmula (A),



(A)

45 y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3, o 4; X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

45 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y

50 G es un resto de polímero.

50 En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde n1, n2 y n3 son todos 1, y X y X' son enlaces.

En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es un grupo hidrocarbonado C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contiene de 1-4 dobles enlaces.

55 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde ambos de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.

En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen 1 o 2 dobles enlaces.

60 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen 1 doble enlace.

65 En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 o 2 dobles enlaces.

En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente grupos hidrocarbonados  $C_{14}$ - $C_{20}$  que contienen 1 doble enlace.

5 En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde ambos de  $-C(O)X-R_1$  y  $-C(O)X'-R_2$  representan grupos oleilo.

En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) donde X es oxígeno.

En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) donde X es nitrógeno.

En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde G es un polioxialquíleno, polivinilpirrolidona, poliacrilamida, polidimetilacrilamida, alcohol polivinílico, dextrano, poli(ácido L-glutámico), anhídrido de estireno maleico, poli-N-(2-hidroxipropilo)metacrilamida, o anhídrido de polidiviniléter maleico.

15 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde el polímero comprende al menos un grupo enlazador entre unidades de polímero.

En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) donde el resto de polímero es un polioxialquíleno.

En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde el peso molecular del polímero es de aproximadamente 200-10 000 Da. Los polímeros preferidos tienen pesos moleculares que varían de aproximadamente 1000 y 5000 Da.

25 En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) donde el resto de polímero comprende al menos un enlazador seleccionado de  $-C(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-O-C(O)-$ ,  $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-NR^3-$ ,  $-NR^3C(O)O-$ ,  $-OC(O)NR^3-$ ,  $-NR^3C(O)-$ ,  $-C(O)NR^3-$ ,  $-NR^3C(O)NR^3-$ , -alquieno- $NR^3C(O)O-$ , -alquieno- $NR^3C(O)NR^3-$ , -alquieno- $OC(O)NR^3-$ , -alquieno- $NR^3-$ , -alquieno- $O-$ , -alquieno- $NR^3C(O)-$ , -alquieno- $C(O)NR^3-$ ,  $-NR^3C(O)O$ -alquieno-,  $-NR^3C(O)NR^3$ -alquieno-,  $-OC(O)NR^3$ -alquieno-,  $-NR^3$ -alquieno-,  $-O$ -alquieno-,  $-NR^3C(O)$ -alquieno-,  $-C(O)NR^3$ -alquieno-, -alquieno- $NR^3C(O)O$ -alquieno-, -alquieno- $NR^3C(O)NR^3$ -alquieno-, -alquieno- $OC(O)NR^3$ -alquieno-, -alquieno- $NR^3$ -alquieno-, -alquieno- $O$ -alquieno-, -alquieno- $NR^3C(O)NR^3$ -alquieno-, - $C(O)NR^3$ -alquieno-,  $-NR^3C(O)O$ -alquienoxi-,  $-NR^3C(O)NR^3$ -alquienoxi-,  $-OC(O)NR^3$ -alquienoxi-,  $-NR^3$ -alquienoxi-,  $-O$ -alquienoxi-,  $-NR^3C(O)$ -alquienoxi-, - $C(O)NR^3$ -alquienoxi-, y -alquienoxi- $NR^3C(O)O$ -alquienoxi-, donde  $R^3$  es como se define anteriormente y



donde



45 se selecciona del grupo que consiste en arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, y D y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O-, CO, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquieno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquieno-NR<sup>3</sup>-, -alquieno-O-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)-, alquieno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquieno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, -NR<sup>3</sup>-alquieno-, -O-alquieno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquieno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquienoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquienoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquienoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquienoxi-, -O-alquienoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquienoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquienoxi-, -alquienoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquienoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquieno-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, -alquieno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, -alquieno-NR<sup>3</sup>-alquieno-, alquieno-O-alquieno-, -alquieno-NR<sup>3</sup>C(O)-alquieno-, y -C(O)NR<sup>3</sup>-alquieno-, donde R<sup>3</sup> es como se define anteriormente.

55 En una modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde el polímero es un polioxietileno donde los grupos oxialquíleno son independientemente grupos polioxialquíleno de cadena lineal o ramificada que tienen de 2-5 átomos de carbono en sus unidades repetitivas.

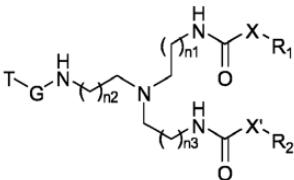
60 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno, un polioxipropileno de cadena lineal o ramificada, o un polioxibutileno de cadena lineal o ramificada.

En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno.

65 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$  son iguales y son 1 o 2;  $X$  y  $X'$  son enlaces; y al menos uno de  $R_1$  y  $R_2$  es un grupo hidrocarbonado  $C_8-C_{25}$  que contiene de 1-4 dobles enlaces.

En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde n1, n2 y n3 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y ambos de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.

- 5 En otra modalidad, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde n1, n2 y n3 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales y representan grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.
- 10 En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde n1, n2 y n3 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales y representan grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-2 dobles enlaces.  
En otra modalidad adicional, la invención proporciona compuestos de fórmula (A) en donde n1, n2 y n3 son 1; X y X' son enlaces; y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales y representan grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 doble enlace.
- 15 En la presente descripción también se describen compuestos de fórmula II,

- 20
- 
  
II
- 25 en donde
- n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;  
X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;  
30 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y  
T es un ligando de direccionamiento; y  
G es un enlace, o un resto de polímero.
- 35 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde n1, n2 y n3 son todos 1, y tanto X como X' son enlaces.
- 40 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es un grupo hidrocarbonado C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contiene de 1-4 dobles enlaces.
- 45 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II en donde ambos de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.  
También se describe en otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen 1 o 2 dobles enlaces.
- 50 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 o 2 dobles enlaces.  
También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 doble enlace.
- 55 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde ambos de -C(O)X-R<sub>1</sub> y -C(O)X'-R<sub>2</sub> representan grupos oleoilo.
- 60 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II en donde G es un resto de polímero.  
También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde G es un polioxialquíleno, polivinilpirrolidona, poliacrilamida, polidimetilacrilamida, alcohol polivinílico, dextrano, poli (ácido L-glutámico, anhídrido de estireno maleico, poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, o anhídrido de polidiviniléter maleico.  
También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde el polímero comprende al menos un grupo enlazador entre unidades de polímero.

También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II donde el resto de polímero es un polioxialquíleno.

5 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II donde el peso molecular del polímero es de aproximadamente 200-10 000 Da. El peso molecular preferido del polímero es de aproximadamente 1000-5000 Da.

10 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II donde el resto de polímero comprende al menos un enlazador seleccionado de -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S-S-, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-, -alquíleno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno, -NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, y -alquílenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, donde R<sup>3</sup> es como se define anteriormente y



donde



30 se selecciona del grupo que consiste en arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, y D y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O-, CO, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-, alquíleno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquílenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -alquílenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, y -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, donde R<sup>3</sup> es como se define anteriormente.

35 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el polímero es un polioxietileno donde los grupos oxialquíleno son independientemente grupos polioxialquíleno de cadena lineal o ramificada que tienen de 2-5 átomos de carbono en sus unidades repetitivas.

40 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno, un polioxipropileno de cadena lineal o ramificada, o un polioxibutileno de cadena lineal o ramificada.

45 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno y el ligando de direccionamiento es una molécula pequeña farmacológicamente activa, un agente endosomolítico, un péptido fusogénico, un agente de permeabilización de la membrana celular, un agente de enmascaramiento de carga, o un ácido nucleico.

50 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el ligando de direccionamiento es una molécula pequeña farmacológicamente activa que tiene actividad antiproliferativa.

55 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno y el ligando de direccionamiento es una molécula pequeña farmacológicamente activa que tiene actividad antiproliferativa.

60 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde el ligando de direccionamiento es un grupo de ácido fólico.

65 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno y el ligando de direccionamiento es un péptido fusogénico.

65 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquíleno es un polioxietileno y el ligando de direccionamiento es un péptido fusogénico.

También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el ligando de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en biotina, galactosa, ácido acetilsalicílico, y naproxeno.

- 5 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula II en donde el polioxialquieno es un polioxietileno y el ligando de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en biotina, galactosa, ácido acetilsalicílico, y naproxeno.
- 10 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II en donde n1, n2 y n3 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es un grupo hidrocarbonado C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contiene de 1-4 dobles enlaces.
- 15 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula II en donde n1, n2, n3, y n4 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y ambos de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.
- 20 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde n1, n2 y n3 son iguales y son 1 o 2; X y X' son enlaces; y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales y representan grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen de 1-2 dobles enlaces.
- 25 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula II en donde n1, n2 y n3 son 1; X y X' son enlaces; y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales y representan grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen 1 doble enlace.

También se describen compuestos de fórmula III:

- 30
- II
- 35 en donde
- 40 n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;  
X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y  
R<sub>N</sub> representa NHR<sub>4</sub>, NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, o N<sup>+</sup>R<sub>4</sub>R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; donde  
R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> representan independientemente grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.
- 45
- 45 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula III en donde n1, n2 y n3 son todos 1, y tanto X como X' son enlaces.
- 50 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula III en donde al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es un grupo hidrocarbonado C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contiene de 1-4 dobles enlaces.
- 55 También se describe otra modalidad de la invención que proporciona compuestos de fórmula III en donde ambos de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen de 1-4 dobles enlaces.
- 60 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula III en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen 1 doble enlace.
- 65 También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula III en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 o 2 dobles enlaces.
- 65 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula III en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> que contienen 1 doble enlace.

También se describe una modalidad de los compuestos de fórmula III en donde ambos de  $-C(O)X-R_1$  y  $-C(O)X'-R_2$  representan grupos oleilo.

- 5 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula III en donde  $R_N$  representa  $NHR_4$  donde  $R_4$  representa un grupo alquilo  $C_1-C_2$ .
- 10 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula III en donde  $R_N$  representa  $NR_4R_5$  donde  $R_4$  y  $R_5$  representan independientemente grupos alquilo  $C_1-C_2$ .
- 15 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula III en donde  $R_N$  representa  $N^+R_4R_5R_6$  donde  $R_4$ ,  $R_5$ , y  $R_6$  representan independientemente grupos alquilo  $C_1-C_2$ .
- 20 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula III en donde  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$  son iguales y son 1 o 2;  $X$  y  $X'$  son enlaces; y al menos uno de  $R_1$  y  $R_2$  es un grupo hidrocarbonado  $C_8-C_{25}$  que contiene de 1-4 dobles enlaces.
- 25 También se describe otra modalidad de los compuestos de fórmula III en donde  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$ , y  $n_4$  son iguales y son 1 o 2;  $X$  y  $X'$  son enlaces; y ambos de  $R_1$  y  $R_2$  son grupos hidrocarbonados  $C_8-C_{25}$  que contienen de 1-4 dobles enlaces.
- 30 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula III en donde  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$  son iguales y son 1;  $X$  y  $X'$  son enlaces; y  $R_1$  y  $R_2$  son iguales y representan grupos hidrocarbonados  $C_8-C_{25}$  que contienen de 1-4 dobles enlaces.
- 35 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula III en donde  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$  son 1;  $X$  y  $X'$  son enlaces;  $R_1$  y  $R_2$  son iguales y representan grupos hidrocarbonados  $C_8-C_{25}$  que contienen 1 doble enlace; y  $R_N$  representa  $N^+R_4R_5R_6$  donde  $R_4$ ,  $R_5$ , y  $R_6$  representan independientemente grupos alquilo  $C_1-C_6$ .
- 40 También se describe otra modalidad adicional de los compuestos de fórmula III en donde  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$  son 1;  $X$  y  $X'$  son enlaces;  $R_1$  y  $R_2$  son iguales y representan grupos hidrocarbonados  $C_8-C_{25}$  que contienen 1 doble enlace; y  $R_N$  representa  $N^+R_4R_5R_6$  donde  $R_4$ ,  $R_5$ , y  $R_6$  representan independientemente grupos alquilo  $C_1-C_2$ .
- 45 En otra modalidad de compuestos de fórmula (A) donde  $X$  y  $X'$  representan ambos un enlace, los restos  $C(O)XR_1$  y  $C(O)X'R_2$  adecuados incluyen grupos derivados de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados que tienen de 10-22 átomos de carbono, preferentemente de 12-20 átomos de carbono, y con mayor preferencia de 14-18 átomos de carbono. Los restos  $C(O)XR_1$  y  $C(O)X'R_2$  representativos incluyen aquellos derivados de, por ejemplo, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido isoesteárico, ácido eládico, ácido petroselínico, ácido eleosteárico, o ácido lauroleíco.
- 50 En otra modalidad de compuestos de fórmula (A) donde  $X$  y  $X'$  representan independientemente tanto nitrógeno como oxígeno, los restos  $R_1$  y  $R_2$  adecuados incluyen grupos derivados de ácidos grasos saturados y poliinsaturados que tienen de 10-22 átomos de carbono, preferentemente de 12-20 átomos de carbono y con mayor preferencia de 14-18 átomos de carbono. Los restos  $R_1$  y  $R_2$  representativos incluyen aquellos derivados de, por ejemplo, tales como aquellos derivados de ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido isoesteárico, ácido eládico, ácido petroselínico, ácido eleosteárico, o ácido lauroleíco.
- 55 Un aspecto de la invención proporciona formulaciones que comprenden un compuesto de fórmula (A).
- 60 Un aspecto de la invención proporciona formulaciones que comprenden un compuesto de fórmula (A) y otra molécula, que puede ser una molécula biológicamente activa, donde la molécula se selecciona del grupo que consiste en:  
ARN ribosomal; polinucleótidos antisentido de ARN o ADN; ribozimas; ARNic; ARNhC; miARN; y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc, o ARNm que codifican una proteína terapéuticamente útil.
- 65 Otro aspecto de la invención proporciona formulaciones que comprenden partículas formadas por los compuestos de fórmula (A) y la molécula biológicamente activa.

Otro aspecto de la invención proporciona una formulación que comprende los compuestos de fórmula (A) y una molécula biológicamente activa, donde la molécula biológicamente activa y el compuesto forman un lipocomplejo.

5 Otro aspecto de la invención proporciona una formulación que comprende los compuestos de fórmula (A) y una molécula biológicamente activa, donde la molécula biológicamente activa se encuentra al menos parcialmente dentro de un liposoma formado por el compuesto.

10 Otro aspecto de la invención proporciona una formulación que comprende los compuestos de fórmula (A) y una molécula biológicamente activa, donde la molécula biológicamente activa se encuentra encapsulada dentro del liposoma.

En una modalidad, la invención proporciona formulaciones donde las partículas tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 500 nm.

15 Se describen métodos para introducir ARNic hacia una célula, que comprenden poner en contacto la célula con una formulación de la invención, donde la formulación comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (A) o I-III y un ARNic.

20 También se describen métodos para introducir ARNhC sintético hacia una célula, que comprenden poner en contacto la célula con una formulación de la invención, donde la formulación comprende un compuesto de cualquiera de las fórmulas (A) o I-III y un ARNhC.

25 Se describen métodos para introducir miARN hacia una célula, que comprenden poner en contacto la célula con una formulación de la invención, donde la formulación comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (A) o I-III y un miARN.

30 También se describen métodos para introducir ácido nucleico antisentido hacia una célula, que comprenden poner en contacto la célula con una formulación de la invención, donde la formulación comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (A) o I-III y un ácido nucleico antisentido.

35 También se describen métodos para modular la expresión de una secuencia diana, dicho método que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación que comprende un compuesto de cualquiera de las fórmulas (A) o I-III y una molécula biológicamente activa.

40 También se describen métodos para administrar ARNic *in vivo*, dicho método que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación de la invención.

45 También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto mamífero, dicho método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación que comprende un compuesto de cualquiera de las fórmulas (A) o I-III y una molécula biológicamente activa.

50 También se describen métodos para inhibir la expresión de un gen, que comprenden poner en contacto una célula con una formulación que comprende una molécula biológicamente activa capaz de inhibir la expresión del gen y un compuesto de cualquiera de las fórmulas (A) o I-III. En una modalidad, la célula es una célula de mamífero, preferentemente una célula humana. Adicionalmente, estos métodos se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*. En una modalidad, la molécula biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en, por ejemplo, ARNic, ARNhC, miARN, ácido nucleico antisentido, ARN ribosómico, polinucleótidos antisentido de ARN o ADN, ribozimas, y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc o ARNm que codifica para una proteína terapéuticamente útil. Tales formulaciones también pueden incluir colesterol, hormonas, antivirales, péptidos, quimioterapéuticos, moléculas pequeñas, vitaminas, cofactores, o proteínas tales como anticuerpos.

55 Las moléculas biológicamente activas que no inhiben la expresión génica, por ejemplo, varios compuestos farmacéuticos de molécula pequeña, se pueden encontrar contenidas en formulaciones con compuestos de la invención para su uso en terapias distintas de aquellas que implican la inhibición de la expresión génica.

60 También se describen dispositivos implantables o inyectables que contienen una formulación de (i) uno o más de los compuestos de cualquiera de las fórmulas (A) o I-III y (ii) una o más moléculas biológicamente activas. En estos dispositivos, la formulación queda atrapada o encapsulada dentro del dispositivo y el dispositivo, además de la formulación, comprende un material de liberación de fármaco biodegradable y/o biocompatible. El dispositivo tendrá un tamaño y forma adecuados para inyección o implantación dentro del cuerpo de un sujeto, preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un sujeto humano.

65 Como se indicó anteriormente, los compuestos particulares de la invención incluyen un resto de polímero G. El grupo de polímeros tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 10 000 Da.

El resto de polímero es preferentemente polioxialquíleno o comprende dos o más grupos o unidades de polioxialquíleno. Se forma un grupo polioxialquíleno al polimerizar monómeros de óxido de alquíleno para proporcionar restos de polímeros de tamaño y peso deseados. Donde el resto de polímero comprende dos o más grupos polioxialquíleno, los grupos polioxialquíleno individuales se encuentran conectados entre sí mediante grupos enlazadores. Los ejemplos de grupos enlazadores adecuados son: -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S-S-, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-, -alquíleno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquílenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, y -alquílenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, donde R<sup>3</sup> es hidrógeno, o alquilo opcionalmente sustituido, y

15



donde

20



se selecciona del grupo que consiste en arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, y D y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O-, CO, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-, -alquíleno-O-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-, -alquíleno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -O-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -O-alquílenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquílenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -alquílenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquílenoxi-, -alquílenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquílenoxi-, -alquíleno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>-alquíleno-, -alquíleno-O-alquíleno-, -alquíleno-NR<sup>3</sup>C(O)-alquíleno-, y -C(O)NR<sup>3</sup>-alquíleno-, donde R<sup>3</sup> es como se define anteriormente.

Los grupos enlazadores preferidos son -C(O)-, -O-, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, y -C(O)NR<sup>3</sup>-, donde cada R<sup>3</sup> es como se define anteriormente.

35

Donde G se forma a partir de una unidad independiente enlazada, por ejemplo, por un grupo amida, la unidad se puede seleccionar entre polímeros de cadena más corta o unidades que tienen un amplio intervalo de tamaños y pesos moleculares. Como se indicó anteriormente, el polímero G puede tener un peso molecular de aproximadamente 200-10 000 Da; este polímero se puede formar a partir de varias unidades más cortas de tamaño independiente. Las unidades pueden tener pesos moleculares que varían independientemente de aproximadamente 50 (es decir, una unidad repetitiva de un polietilenglicol), 200 o 500 Da hasta aproximadamente 3000, 4000 o 5000 Da.

Por tanto, donde un compuesto incluye un resto de polímero G que tiene un peso molecular de aproximadamente 3000 Da, el polímero puede, por ejemplo,

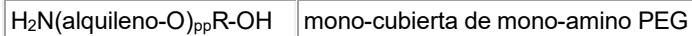
- (a) ser un grupo polioxietileno que tiene un peso molecular de aproximadamente 3000 Da;
- (b) consisten en cuatro grupos de polioxietileno unidos covalentemente entre sí por tres grupos enlazadores de amida (-C(O)NH-), donde cada uno de los grupos de polioxialquíleno tiene un peso molecular de aproximadamente 750 Da, de manera que el resto del polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 3000 Da; o
- (c) consisten en cinco grupos de polioxietileno unidos covalentemente entre sí por cuatro grupos enlazadores de amida (-C(O)NH-), donde los cinco grupos de polioxialquíleno tienen pesos moleculares de aproximadamente 500, 1000, 250, 1000 y 250 Da, respectivamente.

Estos restos de polímeros se incluyen solo como ejemplos; los expertos en la técnica reconocerán otros restos de polímeros que se pueden emplear adecuadamente en los compuestos de la invención.

Los ejemplos no limitativos de reactivos útiles para fabricar los restos de polímeros de la invención incluyen los siguientes:

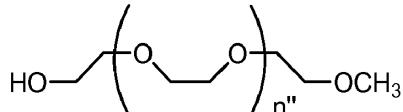
65

HO(alquíleno-O) <sub>pp</sub> R <sup>bb</sup>	mono-cubierta de mono-hidroxi PEG (mPEG)
H <sub>2</sub> N(alquíleno-O) <sub>pp</sub> R <sup>bb</sup>	mono-cubierta de mono-amino PEG
HO(alquíleno-O) <sub>pp</sub> R-OH	mono-cubierta de mono-hidroxi PEG

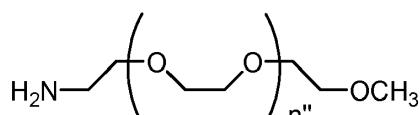


5 donde  $pp$  y alquileno son como se definen en la presente descripción y  $R^{bb}$  se selecciona preferentemente del grupo que consiste en alquilo y alquilo sustituido.

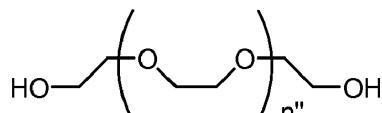
Los ejemplos específicos de tales reactivos incluyen:



mono-cubierta de mono-hidroxi PEG (mPEG),



mono-cubierta de mono-amino PEG, y



no-cubierta de di-hidroxi PEG.

30 En algunas modalidades, las partículas se fabrican al proporcionar una solución acuosa en un primer depósito y una solución de lípidos orgánicos (es decir, una solución de un compuesto de la invención en agua) en un segundo depósito y al mezclar la solución acuosa con la solución de lípidos orgánicos para producir instantáneamente de manera sustancial un liposoma que encapsula, por ejemplo, un ARN de interferencia. En algunas modalidades, las partículas se fabrican mediante la formación de complejos intermediarios hidrófobos ya sea en sistemas en base a detergentes o solventes orgánicos, seguido de la eliminación del detergente o solvente orgánico. Las modalidades preferidas son las de carga neutralizada.

35

40 En una modalidad, el ARN de interferencia se transcribe a partir de un plásmido y el plásmido se combina con lípidos catiónicos en una solución de detergente para proporcionar un complejo recubierto de ácido nucleico-lípido. El complejo se pone en contacto entonces con lípidos no catiónicos para proporcionar una solución de detergente, un complejo lipídico de ácido nucleico y lípidos no catiónicos, y entonces se elimina el detergente para proporcionar una solución de suero de partículas lipídicas de ácido nucleico estable, en el que el plásmido que comprende un molde de ARN de interferencia se encapsula en una bicapa lipídica. Las partículas formadas, por tanto, tienen un tamaño de aproximadamente 50-500 nm.

45

En otra modalidad, las partículas lipídicas estables se forman al preparar una mezcla de lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos en un solvente orgánico; poner en contacto una solución acuosa de ácidos nucleicos que comprende, por ejemplo, ARN de interferencia con la mezcla de lípidos catiónicos y no catiónicos para proporcionar una fase única clara; y eliminar el solvente orgánico para proporcionar una suspensión de partículas lipídicas de ácido nucleico, en las que el ácido nucleico se encuentra encapsulado en una bicapa lipídica, y las partículas son estables en el suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50-500 nm.

55 Las partículas y los complejos de la invención, por ejemplo, los complejos de un compuesto de fórmula (A) con un ARNic, que tienen los tamaños y/o la carga deseados, se pueden obtener pasando mezclas preparadas como anteriormente a través de filtros adecuados. Ver, por ejemplo, los Ejemplos 32 y 33 más abajo.

Las partículas de lípidos de la invención son útiles para el suministro terapéutico de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ARNic. En particular, se describen métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero al regular de forma negativa o silenciar la traducción de una secuencia diana de ácido nucleico. En estos métodos, una molécula de ARNic se formula en una partícula lipídica de ácido nucleico, y las partículas se administran a pacientes que requieren tal tratamiento (por ejemplo, un paciente diagnosticado con una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o sobreexpresión de un gen que comprende la secuencia diana de ácido nucleico). Alternativamente, las células se extraen de un paciente, el ARNic se administra *in vitro*, y las células se reinyectan en el paciente. También se describe en una modalidad un método para introducir una molécula de ARNic en una célula poniendo en contacto una célula con una partícula lipídica de ácido nucleico que

comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación, y un ARNic. También se describe en otra modalidad un método para introducir una molécula de ARNic en una célula poniendo en contacto una célula con una partícula lipídica de ácido nucleico que comprende un lípido catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación, y un ARNic. También se describe en otra modalidad adicional un método para introducir una molécula de ARNic en una célula poniendo en contacto una célula con una partícula lipídica de ácido nucleico que comprende un lípido catiónico y un ARNic.

La partícula lipídica se puede administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, o intraperitoneal. En una modalidad, al menos aproximadamente 10 % de la dosis total que se administra de partículas lipídicas de ácido nucleico se encuentra presente en el plasma aproximadamente 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas después de la inyección. En otras modalidades, más del 20 %, 30 %, 40 % y hasta el 60 %, 70 % u 80 % de la dosis total inyectada de partículas lipídicas de ácido nucleico se encuentra presente en el plasma 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas después de la inyección. En una modalidad, la presencia de un ARNic en células en un tejido diana (es decir, pulmón, hígado, tumor, endotelio vascular o en un sitio de inflamación) es detectable a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración. En una modalidad, la regulación negativa de la expresión de la secuencia diana es detectable a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración. En una modalidad, la regulación negativa de la expresión de la secuencia diana ocurre preferentemente en células tumorales o en células en un sitio de inflamación o cualquier otro tejido patológico. En una modalidad, la presencia de un ARNic en células en un sitio distal al sitio de administración es detectable al menos cuatro días después de la inyección intravenosa de la partícula lipídica de ácido nucleico. En otra modalidad, la presencia de un ARNic en células en un tejido diana (es decir, pulmón, hígado, tumor o en un sitio de inflamación) es detectable al menos cuatro días después de la inyección de la partícula lipídica de ácido nucleico.

Las partículas son adecuadas para su uso en la transferencia intravenosa de ácidos nucleicos ya que son estables en circulación, de un tamaño que se requiere para el comportamiento farmacodinámico que resulta en el acceso a sitios extravasculares y poblaciones de células diana. La invención también proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una partícula lipídica.

Las partículas son adecuadas para su uso en la transferencia intravenosa de ácidos nucleicos ya que son estables en circulación, de un tamaño que se requiere para el comportamiento farmacodinámico que resulta en el acceso a sitios extravasculares y poblaciones de células diana.

Las partículas lipídicas de ácido nucleico estables que se describen en la presente descripción típicamente comprenden un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ARNic o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de ARNic), un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un componente estabilizador de bicapa tal como, por ejemplo, un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas lipídicas. Las partículas lipídicas de la presente invención tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 500 nm y son de manera sustancial no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos encapsulados en las partículas lipídicas de la presente invención son resistentes a la degradación con una nucleasa en solución acuosa.

El componente de ácido nucleico de las partículas lipídicas de ácido nucleico generalmente comprende un ARN de interferencia (es decir, ARNic), que se puede proporcionar en varias formas que incluyen, por ejemplo, uno o más dúplex aislados de ARN de interferencia pequeño (ARNic), ARN de doble cadena más largo (ARNdc) o como ARNic o ARNdc transcritos desde un casete transcripcional en un plásmido de ADN.

Se puede usar una población de ARN para proporcionar ARN precursores largos, o se pueden usar ARN precursores largos que tienen una identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada para fabricar el ARNic. Los ARN se pueden aislar de células o tejidos, sintetizarse y/o clonarse de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El ARN puede ser una población mixta (que se obtiene de células o tejidos, transcrita de ADNc, sustraído, seleccionado, etc.) o puede representar una única secuencia diana. El ARN puede ser de origen natural, por ejemplo, aislado de muestras de tejidos o células, sintetizado *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso de polimerasa T7 o SP6 y productos de PCR o un ADNc clonado; o sintetizados químicamente.

Para formar un ARNdc largo, para los ARN sintéticos, el complemento también se transcribe *in vitro* y se hibrida para formar un ARNdc. Si se usa una población de ARN de origen natural, los complementos de ARN también se proporcionan (por ejemplo, para formar ARNdc para la digestión por ARNse III de *E. coli* o Dicer), por ejemplo, mediante la transcripción de los ADNc correspondientes a la población de ARN, o mediante el uso de ARN polimerasas. Los ARN precursores se hibridan entonces para formar ARN de doble cadena para la digestión. Los ARNdc se pueden encapsular directamente en las partículas lipídicas de ácido nucleico o se pueden digerir *in vitro* antes de la encapsulación.

Alternativamente, uno o más plásmidos de ADN que codifican una o más plantillas de ARNic se encapsulan en una partícula lipídica de ácido nucleico. El ARNic se puede transcribir como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles en horquilla a partir de plantillas de ADN en plásmidos que tienen unidades transcripcionales de ARN polimerasa III, por ejemplo, en base a las unidades de transcripción de origen natural para ARN nuclear pequeño U6 o ARNasa P humana H1 (ver, Brummelkamp, y otros, *Science* 296:550 (2002); Donze, y otros, *Nucleic*

Acids Res. 30:e46 (2002); Paddison, y otros, Genes Dev. 16:948 (2002); Yu, y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 99:6047 (2002); Lee, y otros, Nat. Biotech. 20:500 (2002); Miyagishi, y otros, Nat. Biotech. 20:497 (2002); Paul, y otros, Nat. Biotech. 20:505 (2002); and Sui, y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 99:5515 (2002)). Tipicamente, una unidad o casete transcripcional contendrá una secuencia promotora de la transcripción de ARN, tal como un promotor H1-ARN o U6, ligada operativamente a una plantilla para la transcripción de una secuencia de ARNc deseada y una secuencia de terminación, compuesta por 2 o 3 residuos de uridina y una secuencia de politimidina (T5) (señal de poliadenilación) (Brummelkamp, Science, supra). El promotor seleccionado puede proporcionar una transcripción constitutiva o inducible. Las composiciones y métodos para la transcripción dirigida por ADN de moléculas de interferencia de ARN se describen en detalle en la Patente de los Estados Unidos Número 6,573,099. Preferentemente, el ARNc sintetizado o transcripto tiene salientes 3' de aproximadamente 1-4 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 2-3 nucleótidos y extremos fosfato 5' (Elbashir y otros, Genes Dev. 15:188 (2001); Nykanen, y otros, Cell 107:309 (2001)). La unidad transcripcional se incorpora hacia un plásmido o vector de ADN a partir del cual se transcribe el ARN de interferencia. Se describen en detalle los plásmidos adecuados para la administración *in vivo* de material genético con propósitos terapéuticos en la Patente de los Estados Unidos núm. 5,962,428 y 5,910,488. El plásmido seleccionado puede proporcionar una administración transitoria o estable de una célula diana. Será evidente para los expertos en la técnica que los plásmidos originalmente diseñados para expresar las secuencias génicas deseadas se pueden modificar para contener un casete de unidad transcripcional para la transcripción de ARNc.

Los métodos para aislar ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, fabricar y cribar bibliotecas de ADNc y realizar PCR son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Gubler & Hoffman, Gen 25:263-269 (1983); Sambrook y otros, supra; Ausubel y otros, supra), al igual que los métodos de PCR (ver Patente de los Estados Unidos número 4,683,195 y 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y otros, edición, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los textos básicos adicionales que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2da edición 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y otros, edición, 1994)).

Generalmente, se desea administrar las partículas lipídicas de ácido nucleico para regular de forma negativa o silenciar la traducción (es decir, la expresión) de un producto genético de interés. Las clases adecuadas de productos génicos incluyen, pero no se limitan a, genes asociados con infección viral y supervivencia, genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos en los que el hígado es la diana, y enfermedades y trastornos hepáticos) y trastornos, genes asociados con tumorigénesis y transformación celular, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores, tales como aquellos asociados con respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, genes de receptores de ligandos, y genes asociados con trastornos neurodegenerativos.

Los genes asociados con la infección viral y la supervivencia incluyen aquellos que se expresan por un virus para unirse, entrar y replicarse en una célula. De particular interés son las secuencias virales asociadas con enfermedades virales crónicas. Las secuencias virales de particular interés incluyen secuencias de virus de hepatitis (Hamasaki y otros, FEBS Lett. 543:51 (2003)); Yokota, y otros, EMBO Rep. 4:602 (2003); Schlamai, y otros, Hepatology 37:764 (2003); Wilson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2783 (2003); Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2014 (2003); y FIELDS VIROLOGY (Knipe y otros edición 2001)), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Banerjea y otros, Mol. Ther. 8:62 (2003)); Song, y otros, J. Virol. 77:7174 (2003)); Stephenson JAMA 289:1494 (2003); Qin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 100:183 (2003))), virus del herpes (Jia y otros, J. Virol. 77:3301 (2003))), y virus del papiloma humano (VPH) (Hall, y otros, J. Virol. 77:6066 (2003)); Jiang y otros, Oncogene 21:6041 (2002)). Las secuencias ilustrativas de ácido nucleico del virus de la hepatitis que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a: secuencias de ácido nucleico implicadas en la transcripción y traducción (por ejemplo, En1, En2, X, P), secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, proteínas del núcleo que incluyen proteínas C y relacionadas con C, proteínas de la cápside y de la envoltura que incluyen proteínas S, M y/o L, o fragmentos de las mismas) (ver, por ejemplo, FIELDS VIROLOGY, 2001, supra). Las secuencias ilustrativas de ácido nucleico de la hepatitis C que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a: proteasas serina (por ejemplo, NS3/NS4), helicasas (por ejemplo, NS3), polimerasas (por ejemplo, NS5B), y proteínas de la envoltura (por ejemplo, E1, E2, y p7). Las secuencias de ácido nucleico de la hepatitis A se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_001489; las secuencias de ácido nucleico de la hepatitis B se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_003977; las secuencias de ácido nucleico de la hepatitis C se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_004102; la secuencia de ácido nucleico de la hepatitis D se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_001653; las secuencias de ácido nucleico de la hepatitis E se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_001434; y las secuencias de ácido nucleico de la Hepatitis G se establecen, por ejemplo, en el número de acceso de Genbank NC\_001710. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con la infección viral y la supervivencia se puede usar convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales que se usan para tratar la afección viral.

Los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, trastornos en los que el hígado es la diana y enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen, por ejemplo, genes que se expresan en, por ejemplo, dislipidemia (por ejemplo, receptores X hepáticos (por ejemplo, LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , número de acceso de Genbank

NM\_007121), receptores farnesoides X (FXR) (número de acceso de Genbank NM\_005123), proteína de unión a elementos reguladores de esteroles (SREBP), sitio-1 proteasa (S1P), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A reductasa (coenzima HMG-A reductasa), apolipoproteína (ApoB) y apolipoproteína (ApoE) y diabetes (por ejemplo, glucosa 6-fosfatasa) (ver, por ejemplo, Forman y otros, *Cell* 81:687 (1995); Seol y otros, *Mol. Endocrinol.* 9:72 (1995)), Zavacki

5 y otros, *PNAS USA* 94:7909 (1997); Sakai, y otros, *Cell* 85:1037-1046 (1996); Duncan y otros, *J. Biol. química* 272:12778-12785 (1997); Willy y otros, *Genes Dev.* 9(9):1033-45 (1995); Lehmann y otros, *J. Biol. Chem.* 272 (6): 3137-3140 (1997); Janowski, y otros, *Nature* 383:728-731 (1996); Peet, y otros, *Cell* 93:693-704 (1998)). Un experto en la técnica apreciará que los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos en los que el hígado es una diana y enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen 10 genes que se expresan en el propio hígado, así como también genes que se expresan en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos se puede usar convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales que se usan para tratar la enfermedad o el trastorno.

15 Los ejemplos de secuencias de genes asociadas con la tumorigénesis y la transformación celular incluyen secuencias de translocación tales como genes de fusión MLL, BCR-ABL (Wilda, y otros, *Oncogen*, 21:5716 (2002); Scherr, y otros, *Blood* 101:1566), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO y AML1-MTG8 (Heidenreich, y otros, *Blood* 101:3157 (2003)); secuencias sobreexpresadas tales como genes de resistencia a múltiples fármacos (Nieth y otros, *FEBS Lett.* 545:144 (2003)); Wu y otros, *Cancer Res.* 63:1515 (2003)), ciclinas (Li 20 y otros, *Cancer Res.* 63:3593 (2003)); Zou y otros, *Genes Dev.* 16:2923 (2002)), beta-catenina (Verma y otros, *Clin Cancer Res.* 9:1291 (2003)), genes de telomerasa (Kosciolek y otros, *Mol Cancer Ther.* 2:209 (2003))), c-MYC, N-MYC, BCL-2, ERBB1 y ERBB2 (Nagy, y otros *Exp. Cell Res.* 285:39 (2003)); y secuencias mutadas tales como RAS (revisado en Tuschl y Borkhardt, *Mol. Intervenciones*, 2:158 (2002)). El silenciamiento de secuencias que codifican 25 enzimas de reparación de ADN encuentran uso en combinación con la administración de agentes quimioterapéuticos (Collis y otros, *Cancer Res.* 63:1550 (2003)). Los genes que codifican proteínas asociadas con la migración tumoral también son secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas y metaloproteininas. Los ejemplos anteriores no son exclusivos. Cualquier secuencia génica total o parcial que facilite o promueva la tumorigénesis o la transformación celular, el crecimiento tumoral o la migración tumoral se puede incluir como secuencia molde.

30 Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. De particular interés es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich y otros, *Mol. Vis.* 9:210 (2003)).

35 Los genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunitarias. Los ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen citocinas tales como factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, etc.), interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill y otros, *J. Immunol.* 171:691 (2003))), IL-15, IL-18, IL-20, etc.), interferones (por ejemplo, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , etc.) y TNF. Los genes Fas y Fas Ligando también son secuencias diana inmunomoduladoras de interés (Song y otros, *Nat. Medicina.* 9:347 (2003))). Los genes que codifican moléculas de señalización secundarias en células hematopoyéticas y linfoides 40 también se incluyen en la presente invención, por ejemplo, las quinasas de la familia Tec, tales como la tirosina quinasa de Bruton (Btk) (Heinonen y otros, *FEBS Lett.* 527:274 (2002)).

45 Los ligandos de receptores celulares de la invención pueden ser proteínas o moléculas de esteroides. Los ligandos de receptores celulares incluyen ligandos que se pueden unir a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de insulina, receptor de EPO, receptores acoplados a proteína G, receptores con actividad de tirosina quinasa, receptores de citocina, receptores de factores de crecimiento, etc.), para modular (por ejemplo, inhibir, activar, etc.) la vía fisiológica en donde se encuentra implicado el receptor (por ejemplo, modulación del nivel de glucosa, desarrollo de células sanguíneas, mitogénesis, etc.). Los ejemplos de ligandos de receptores de superficie celular incluyen citocinas, factores de crecimiento, interleucinas, interferones, eritropoyetina (EPO), insulina, glucagón, ligandos de receptores acoplados a proteína G, etc.). Las plantillas que codifican una expansión de 50 repeticiones de trinucleótidos (por ejemplo, repeticiones de CAG) encuentran uso para silenciar secuencias patógenas en trastornos neurodegenerativos causados por la expansión de repeticiones de trinucleótidos, tales como la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (Caplen y otros, *Hum. mol. Gineta.* 11:175 (2002)). Los ligandos de receptores celulares también incluyen ligandos que no se unen a receptores de superficie celular sino a receptores intracelulares (por ejemplo, receptores de esteroides que se ubican en el núcleo, y 55 citoplasma, receptores de fosfato de inositol que se ubican en el retículo endoplásmico). Los ejemplos de ligandos de receptores intracelulares incluyen hormonas lipófilas como hormonas esteroides, trifosfato de inositol, y hormonas peptídicas intracrinias.

#### Definiciones

60 Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo" incluye aquellos grupos alquilo que contienen de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados. Los ejemplos de "alquilo" incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-, sec- y terc-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, 3-metilhexilo, heptilo, octilo, nonilo, 3-65 etilbutilo, y similares. Un grupo alquilo preferido es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los grupos alquilo de la invención se pueden encontrar opcionalmente sustituidos con varios grupos como se proporciona en la presente descripción. Por tanto, cualquier átomo de carbono disponible para la sustitución se puede unir a una variedad de sustituyentes, tales como,

por ejemplo, halógeno, OH, NO<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alcoxi, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alcoxi, oxo, amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, mono- y di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, acilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, tio C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonamida C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, y aminosulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

5 El término "alquileno" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados divalentes que tienen preferentemente de 1 a 5 y con mayor preferencia de 1 a 3 átomos de carbono que son de cadena lineal o ramificada. Este término se exemplifica con grupos tales como metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), iso-propileno (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-) y similares.

10 El término "alquilenoxi" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados divalentes unidos a un oxígeno, donde los grupos hidrocarbilo alifáticos tienen preferentemente de 1 a 5 y con mayor preferencia de 1 a 3 átomos de carbono que son de cadena lineal o ramificada.

15 El término "arilo" se refiere a un sistema de anillos de hidrocarbono aromático que contiene al menos un anillo aromático. El anillo aromático se puede fusionar opcionalmente o unirse de cualquier otra manera a otros anillos de hidrocarbono aromáticos o anillos de hidrocarbono no aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo, antracenilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, indenilo, 2,3-dihidroindenilo, y bifenilo. Los ejemplos preferidos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, y 2,3-dihidroindenilo. Los grupos arilo con mayor preferencia son fenilo y naftilo. El de máxima preferencia es fenilo. Los grupos arilo de la invención se pueden encontrar opcionalmente sustituidos con varios grupos como se proporciona en la presente descripción. Por tanto, cualquier átomo de carbono presente dentro de un sistema de anillos de arilo y disponible para la sustitución se puede unir adicionalmente a una variedad de sustituyentes del anillo, tales como, por ejemplo, halógeno, OH, NO<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alcoxi, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alcoxi, oxo, amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, mono- y di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, acilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, tio C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonamida C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, y aminosulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

20 El término "cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptanilo y ciclooctilo. Con mayor preferencia se encuentran los grupos cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Los grupos cicloalquilo de la invención se pueden encontrar opcionalmente sustituidos con varios grupos como se proporciona en la presente descripción. Por tanto, cualquier átomo de carbono presente dentro de un sistema de anillos de cicloalquilo y disponible para la sustitución se puede unir adicionalmente a una variedad de sustituyentes del anillo, tales como, por ejemplo, halógeno, OH, NO<sub>2</sub>, CN, NH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alcoxi, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alcoxi, oxo, amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, mono- y di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, acilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, tio C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, sulfonamida C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, y aminosulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

25 30 35 El término "heterocicloalquilo" se refiere a un anillo o sistema de anillos que contiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, y azufre, en donde dicho heteroátomo se encuentra en un anillo no aromático y el sistema de anillos se encuentra unido al grupo de origen por un miembro de (uno de) los anillos no aromáticos. El anillo de heterocicloalquilo se encuentra opcionalmente fusionado con otros anillos de heterocicloalquilo y/o anillos de hidrocarbono no aromáticos y/o anillos de fenilo. Por tanto, los grupos heterocicloalquilo adecuados para la invención tienen al menos 3 miembros y pueden tener hasta 20 miembros. Los grupos heterocicloalquilo preferidos tienen de 3 a 10 miembros. Determinados grupos heterocicloalquilo con mayor preferencia tienen de 8-10 miembros.

40 45 50 55 60 Otros grupos heterocicloalquilo con mayor preferencia tienen 5 o 6 miembros. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinilo, 1,2-dihidroquinolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroquinolinilo, benzo[1,4]oxazinilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]oxazinilo, indolinilo, benzo[1,3]dioxolilo, 2H-cromenilo, piperazinilo, morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, piridinonilo, azetidinilo, aziridinilo, y pirazolidinilo. Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, pirrolidinilo, piridinonilo, dihidropirrolidinilo, azetidinilo, aziridinilo, 2,3,4-tetrahidroquinolinilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]oxazinilo, indolinilo, benzo[1,3]dioxolilo, y pirrolidinonilo. Los grupos heterocicloalquilo con mayor preferencia son pirrolidinilo, piperidinilo, azetidinilo, aziridinilo, piperazinilo, morfolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroquinolinilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]oxazinilo, indolinilo, benzo[1,3]dioxolilo, y pirrolidinonilo. Los grupos heterocicloalquilo de la invención se pueden encontrar opcionalmente sustituidos con varios grupos como se proporciona en la presente descripción. Por tanto, cualquier átomo presente dentro de un anillo de heterocicloalquilo y disponible para la sustitución se puede unir adicionalmente a una variedad de sustituyentes del anillo, tales como, por ejemplo, halógeno, OH, NO<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alcoxi, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alcoxi, oxo, amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, mono- y di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo.

65 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos que contiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, y azufre y el sistema de anillos se encuentra unido al grupo de origen por un miembro de (uno de) los anillos aromáticos. El anillo de heteroarilo se puede encontrar fusionado con uno o más anillos de heteroarilo, anillos de hidrocarbono aromáticos o no aromáticos o anillos de heterocicloalquilo. Por tanto, los grupos heteroarilo adecuados para la invención tienen al menos 5 miembros y pueden tener hasta 20 miembros. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, piridina, furano, tienilo, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo y

pirimidinilo. Los grupos heteroarilo preferidos incluyen tienilo, benzotienilo, piridilo, quinolinilo, pirazolilo, pirimidilo, imidazolilo, bencimidazolilo, furanilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, isotiazolilo, bencisotiazolilo, triazolilo, pirrolilo, indolilo, 5,6, dihidroquinazolinilo 4,5,6,7-tetrahidroindolilo, 4,5-dihidro-2H-indazolilo, 5,6-dihidroquinolinilo, pirazolilo, y benzopirazolilo. Los grupos heteroarilo con mayor preferencia son benzotiazolilo, piridilo, pirazolilo, y quinolinilo. Los grupos heteroarilo de la invención se pueden encontrar opcionalmente sustituidos con varios grupos como se proporciona en la presente descripción. Por tanto, cualquier átomo de carbono presente dentro de un sistema de anillos heteroarilo y disponible para la sustitución se puede unir adicionalmente a una variedad de sustituyentes del anillo, tales como, por ejemplo, halógeno, OH, NO<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo, (cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alcoxi, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, halo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alcoxi, oxo, amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, mono- y di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)amino (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo.

Por "actividad antiproliferativa", como se usa en la presente descripción, se entiende actividad biológica frente a cualquier enfermedad, afección, rasgo, genotipo o fenotipo caracterizado por crecimiento o replicación celular no regulados como es conocido en la técnica; lo que incluye leucemias, por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica aguda (ALL), y leucemia linfocítica crónica, cánceres relacionados con el SIDA tales como el sarcoma de Kaposi; cánceres de mama; cánceres de huesos tales como osteosarcoma, condrosarcomas, sarcoma de Ewing, fibrosarcomas, tumores de células gigantes, adamantinomas, y cordomas; cánceres cerebrales tales como meningiomas, glioblastomas, astrocitomas de bajo grado, oligodendroцитomas, tumores pituitarios, schwannomas, y cánceres cerebrales metastásicos; cánceres de cabeza y cuello, lo que incluye varios linfomas, tales como el linfoma de células del manto, el linfoma no Hodgkin, el adenoma, el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de laringe, los cánceres de vesícula biliar y de las vías biliares, los cánceres de retina, tales como el retinoblastoma, los cánceres de esófago, los cánceres gástricos, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (lo que incluye el carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de páncreas, sarcomas, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida, sarcoma endometrial, cánceres de resistencia múltiple a fármacos; y enfermedades y afecciones proliferativas, tales como neovascularización corneal, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración miópica y otras enfermedades y afecciones proliferativas tales como reestenosis y poliquistosis renal, y cualquier otro cáncer o enfermedad proliferativa, afección, rasgo, genotipo o fenotipo que pueda responder a la modulación de la expresión génica relacionada con la enfermedad en una célula o tejido, solo o en combinación con otras terapias.

El término "aptámero" significa un ácido nucleico que se une a otra molécula. Esta interacción de unión no abarca la formación estándar de enlaces de hidrógeno de ácido nucleico/ácido nucleico ejemplificada por la formación de pares de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A se une a U o T y G se une a C), sino que abarca todos los demás tipos de enlaces no covalentes (o en algunos casos enlaces covalentes). Los ejemplos no limitantes de unión no covalente incluyen la formación de enlaces de hidrógeno, la interacción electrostática, la interacción de Van der Waals e interacción hidrófoba. Un aptámero se puede unir a otra molécula por cualquiera o todos estos tipos de interacción, o en algunos casos por interacción covalente. La unión covalente de un aptámero a otra molécula puede ocurrir cuando el aptámero o la molécula diana contiene un resto químicamente reactivo o fotorreactivo. El término "aptámero" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de formar un complejo con una sustancia diana deseada. "Específico a la diana" significa que el aptámero se une a un analito diana con un grado de afinidad mucho más alto que el que se une a los materiales contaminantes.

El término "molécula biológicamente activa", como se usa en la presente descripción, se refiere a compuestos o moléculas que son capaces de provocar o modificar una respuesta biológica en un sistema. Los ejemplos no limitantes de moléculas biológicamente activas incluyen anticuerpos (por ejemplo, monocionales, quiméricos, humanizados, etc.), colesterol, hormonas, antivirales, péptidos, proteínas, quimioterapéuticos, moléculas pequeñas, vitaminas, cofactores, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas, etc.), ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos formadores de tríplex, quimeras A-2,5, ARNdc (por ejemplo, ANic, ARNic, etc.), aloenzimas, aptámeros, señuelos, ARN ribosomal, polinucleótidos antisentido de ARN o ADN o combinaciones de ARN y ADN, miARN, ARNhC y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc, o ARNm que codifican una proteína terapéuticamente útil, y análogos de la misma. Las moléculas biológicamente activas de la invención también incluyen moléculas capaces de modular la farmacocinética y/o la farmacodinámica de otras moléculas biológicamente activas, por ejemplo, lípidos y polímeros tales como poliaminas, poliamidas, polietilenglicol y otros polímeros. En determinadas modalidades, el término molécula biológicamente activa se usa indistintamente con el término "molécula" o "molécula de interés" en la presente descripción.

Por "lípido catiónico", como se usa en la presente descripción, se entiende cualquier compuesto lipófilo que tiene una carga positiva neta a un pH aproximadamente fisiológico, tal como un compuesto que tiene cualquiera de las Fórmulas I-VI.

Por "lípido neutro", como se usa en la presente descripción, se entiende cualquier compuesto lipófilo distinto de un lípido catiónico como se define en la presente descripción que no porta una carga neta a un pH fisiológico. Los compuestos adecuados que no tienen carga neta a un pH fisiológico incluyen zwitteriones.

- 5 Como se usa en la presente descripción, "célula" se usa en su sentido biológico habitual y no se refiere a un organismo multicelular completo, por ejemplo, no se refiere específicamente a un ser humano. La célula se puede encontrar presente en un organismo, por ejemplo, aves, plantas y mamíferos tales como humanos, vacas, ovejas, simios, monos, cerdos, perros, y gatos. La célula puede ser procariótica (por ejemplo, célula bacteriana) o eucariótica (por ejemplo, célula vegetal o de mamífero). La célula puede ser de origen somático o de línea germinal, 10 totipotente o pluripotente, en división o no en división. La célula también se puede derivar o puede comprender un gameto o embrión, una célula madre o una célula completamente diferenciada.

El término "ARN de doble cadena" o "ARNdc", tal como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de ARN de doble cadena capaz de interferir con el ARN, lo que incluye el ARN de interferencia corto (ARNic).

- 15 Por "gen" se entiende un ácido nucleico que codifica ARN, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que incluyen, pero no se limitan a, genes estructurales que codifican un polipéptido. Un gen o gen diana también puede codificar un ARN funcional (ARNf) o un ARN no codificante (ARNnc), tales como ARN temporal pequeño (ARNtp), microARN (miARN), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN de interferencia corto (ARNic), ARN nucleolar pequeño (ARNnp), 20 ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), y precursores de ARN de los mismos.

Por "inhibir" o "inhibición", se entiende que la expresión del gen, o el nivel de moléculas 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 reduce más abajo del que se observa en ausencia de las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de la invención. En una modalidad, la inhibición con una molécula de ANic se encuentra más abajo del nivel que se observa en presencia de una molécula inactiva o atenuada. En otra modalidad, la inhibición con moléculas de ANic se encuentra más abajo del nivel que se observa en presencia de, por ejemplo, una molécula de ANic con secuencia codificada o con desajustes. En otra modalidad, la inhibición de la expresión génica con una molécula de ácido nucleico de la presente invención es mayor en presencia de la molécula de ácido nucleico que en 25 su ausencia. En una modalidad, la inhibición de la expresión génica se encuentra asociada con el silenciamiento postranscripcional, tal como la escisión mediada por ARNi de una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, ARN) o la inhibición de la traducción. En una modalidad, la inhibición se encuentra asociada con el silenciamiento 30 pretranscripcional.

- 35 Los términos "enlazador" y "grupo enlazador" se refieren a restos polivalentes, preferentemente divalentes, que conectan una o más moléculas entre sí. Los ejemplos son fracciones que conectan porciones de un resto de polímero G entre sí o conectan un ligando de direccionamiento T a una fracción de polímero G. Los enlazadores pueden ser biodegradables o bioestables. Los enlazadores biodegradables se encuentran diseñados de manera que su estabilidad se puede modular para un propósito particular, tal como la administración a un tejido o tipo de célula 40 en particular. Los ejemplos de grupos enlazadores adecuados incluyen los siguientes grupos: -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S-S-, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquileno-OC(O)NR<sup>3</sup>-, -alquileno-NR<sup>3</sup>-, -alquileno-O-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)-, -alquileno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquileno-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -NR<sup>3</sup>-alquileno-, -O-alquileno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquileno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquileno-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -alquileno-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -alquileno-NR<sup>3</sup>-alquileno-, -alquileno-O-alquileno-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O) -alquileno-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -O-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquilenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, y -alquilenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, 45 donde R<sup>3</sup> es hidrógeno, o alquilo opcionalmente sustituido, y



donde



se selecciona del grupo que consiste en arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, y D y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O-, CO, -NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)O-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-, -alquileno-OC(O) NR<sup>3</sup>-, -alquileno-NR<sup>3</sup>-, -alquileno-O-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)-, -alquileno-C(O)NR<sup>3</sup>-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquileno-, -NR<sup>3</sup>-alquileno-, -O-alquileno-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquileno-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -OC(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -O-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)-alquilenoxi-, -NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -alquilenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -C(O)NR<sup>3</sup>-alquileno-, -alquileno-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -alquileno-NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -alquilenoxi-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -alquileno-NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -alquilenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, -alquilenoxi-OC(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, -alquilenoxi-NR<sup>3</sup>C(O)O-alquilenoxi-, y -C(O)NR<sup>3</sup>-alquilenoxi-, 60 donde R<sup>3</sup> es como se define anteriormente.

El término "ligando de direccionamiento" se refiere a cualquier compuesto o molécula, tal como un fármaco, péptido, hormona, o neurotransmisor que sea capaz de interactuar con otro compuesto, tal como un receptor, ya sea directa o indirectamente. El receptor que interactúa con un ligando se puede encontrar presente en la superficie de una célula o alternativamente puede ser un receptor intercelular. La interacción del ligando con el receptor puede resultar en una reacción bioquímica, o puede ser simplemente una interacción o asociación física. Los ejemplos no limitantes de ligandos incluyen moléculas pequeñas farmacológicamente activas, agentes endosomolíticos, péptidos fusogénicos, agentes de permeabilización de membrana celular, agentes de enmascaramiento de carga, y ácidos nucleicos. Otros ejemplos no limitantes de ligandos incluyen azúcares y carbohidratos tales como galactosa, galactosamina, y N-acetil galactosamina; hormonas tales como estrógeno, testosterona, progeserona, glucocortisona, adrenalina, insulina, glucagón, cortisol, vitamina D, hormona tiroidea, ácido retinoico, y hormonas de crecimiento; factores de crecimiento tales como VEGF, EGF, NGF, y PDGF; colesterol; ácidos biliares; neurotransmisores tales como GABA, glutamato, acetilcolina; NOGO; trifosfato de inositol; diacilglicerol; epinefrina; norepinefrina; péptidos, vitaminas tales como el folato, la piridoxina, y la biotina, fármacos tales como el ácido acetilsalicílico y el naproxeno, anticuerpos y cualquier otra molécula que puede interactuar con un receptor *in vivo* o *in vitro*. El ligando se puede unir a un compuesto de la invención mediante el uso de una molécula enlazadora, tal como una amida, carbonilo, éster, péptido, disulfuro, silano, nucleósido, nucleósido abásico, poliéter, poliamina, poliamida, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo, éster de fosfato, fosforamidato, tiofosfato, alquilfosfato, o enlazador fotolábil. En una modalidad, el enlazador es un enlazador biodegradable. Las condiciones adecuadas para la escisión pueden incluir, pero no limitarse a, pH, radiación UV, actividad enzimática, temperatura, reacciones de hidrólisis, eliminación y sustitución, y propiedades termodinámicas del enlace.

El término "lípido", como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier compuesto lipófilo. Los ejemplos no limitativos de compuestos lipídicos incluyen ácidos grasos y sus derivados, lo que incluye ácidos grasos de cadena lineal, cadena ramificada, saturados e insaturados, carotenoides, terpenos, ácidos biliares y esteroides, lo que incluye colesterol y derivados o análogos del mismo.

El término "partícula lipídica" o "composición de partículas lipídicas" se refiere a una composición que comprende una o más moléculas biológicamente activas independientemente o en combinación con un lípido catiónico, un lípido neutro y/o un conjugado de polietilenglicol-diacilglicerol (es decir, polietilenglicol diacilglicerol (PEG-DAG), PEG-colesterol, o PEG-DMB). Una composición molecular formulada puede comprender además colesterol o un derivado de colesterol. El lípido catiónico de la invención puede comprender un compuesto que tiene cualquiera de las Fórmulas I-VI, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diesteril-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-(2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), 1,2-dioleoilcarbamilo-3-dimetilamonio-propano (DOCDAP), 1,2-dilinoil-3-dimetilamonio-propano (DLINDAP), 3-Dimetilamino-2-(cholest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(*cis,cis*-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(cholest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetilo-1-(*cis,cis*-9',12'-octadecadienoxi)propano (CpLin DMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA) y/o una mezcla de los mismos. El lípido neutro puede comprender dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, y/o una mezcla de los mismos. El conjugado de PEG puede comprender un PEG-dilaurilglicerol (C12), un PEG-dimiristilglicerol (C14), un PEG-dipalmitoilglicerol (C16), un PEG-disterilglicerol (C18), un PEG-dilaurilglicerol (C12), un PEG-dimiristilglicerol (C14), un PEG-dipalmitoilglicamida (C16), un PEG-disterilglicamida (C18), un PEG-colesterol, o un PEG-DMB. El componente lipídico catiónico puede comprender de aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 45 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 %, o de aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 % del lípido total presente en la formulación. El componente de lípido neutro puede comprender de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 20 % a aproximadamente 85 % del lípido total presente en la formulación. El conjugado de PEG-DAG (por ejemplo, polietilenglicol diacilglicerol (PEG-DAG), PEG-colesterol, o PEG-DMB) puede comprender de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, o de aproximadamente 4 % a aproximadamente 15 % de los lípidos totales presentes en la formulación. El componente de colesterol puede comprender de aproximadamente 10 % a aproximadamente 60 %, o de aproximadamente 20 % a aproximadamente 45 % del lípido total presente en la formulación. En una modalidad, una composición molecular formulada de la invención comprende un componente lipídico catiónico que comprende aproximadamente 7,5 % del lípido total presente en la formulación, un lípido neutro que comprende aproximadamente 82,5 % del lípido total presente en la formulación, y un conjugado de PEG que comprende aproximadamente 10 % de los lípidos totales presentes en la formulación. En una modalidad, una composición molecular formulada de la invención comprende una molécula biológicamente activa, DODMA, DSPC, y un conjugado de PEG-DAG. En una modalidad, el conjugado de PEG-DAG es PEG-dilaurilglicerol (C12), PEG-dimiristilglicerol (C14), PEG-dipalmitoilglicerol (C16), o PEG-disterilglicerol (C18). En otra modalidad, la composición molecular formulada también comprende colesterol o un derivado de colesterol.

Por "nanopartícula" se entiende una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros. Las nanopartículas de la invención varían típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 999 nm de diámetro, y pueden incluir una molécula biológicamente activa encapsulada o encerrada.

Por "PEG" se entiende cualquier polietilenglicol u otro éter de polialquílico o polímero equivalente.

Los términos "ácido nucleico de interferencia corto", "ARNic", "ARN de interferencia corto", "ARNic" y "molécula de ácido nucleico de interferencia corto", tal como se usan en la presente descripción, se refieren a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de inhibir o regular de forma negativa la expresión génica o la replicación viral al mediar la interferencia de ARN "ARNi" o el silenciamiento génico de una manera específica de secuencia. Por ejemplo, el ANic puede ser una molécula de ácido nucleico de doble cadena que comprende regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma y la región con sentido que tiene secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma. El ANic se puede ensamblar a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena con sentido y la otra es la cadena antisentido, en donde las cadenas antisentido y sentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena; tal como cuando la cadena antisentido y la cadena sentido forman una estructura dúplex o de doble cadena, por ejemplo, en donde la región de doble cadena es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, por ejemplo, de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases; la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma y la cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma (por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o más nucleótidos de la molécula de ANic son complementarios al ácido nucleico diana o una porción del mismo). Alternativamente, el ANic se ensambla a partir de un solo oligonucleótido, donde las regiones sentido y antisentido autocomplementarias del ANic se encuentran unidas por medio de un enlazador en base a ácido nucleico o no basado en ácido nucleico. El ANic puede ser un polinucleótido con una estructura secundaria dúplex, dúplex asimétrico, en horquilla o en horquilla asimétrica, que tiene regiones sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana separada o una porción de la misma y la región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma. El ANic puede ser un polinucleótido de una única cadena circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma y la región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma, y en donde el polinucleótido circular se puede procesar ya sea *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de ANic activa capaz de mediar en el ARNi. El ANic también puede comprender un polinucleótido de una única cadena que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma (por ejemplo, cuando tal molécula de ANic no requiere la presencia dentro de la molécula de ANic de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma), en donde el polinucleótido de una única cadena puede comprender además un grupo fosfato terminal, tal como un fosfato 5' (ver, por ejemplo, Martínez y otros, 2002, Cell., 110, 563-574 y Schwarz y otros, 2002, Molecular Cell, 10, 537-568), o difosfato 5',3'. En determinadas modalidades, la molécula de ANic de la invención comprende secuencias o regiones con sentido y antisentido separadas, en donde las regiones con sentido y antisentido se encuentran enlazadas covalentemente por moléculas enlazadoras de nucleótidos o no nucleótidos como es conocido en la técnica, o se encuentran alternativamente enlazadas de forma no covalente por interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der waals, interacciones hidrófobas, y/o interacciones de apilamiento. En determinadas modalidades, las moléculas de ANic de la invención comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen diana. En otra modalidad, la molécula de ANic de la invención interactúa con la secuencia de nucleótidos de un gen diana de una manera que provoca la inhibición de la expresión del gen diana. Como se usa en la presente descripción, las moléculas de ANic no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que adicionalmente abarcan nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. En determinadas modalidades, las moléculas de ácido nucleico de interferencia cortos de la invención carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). El solicitante describe en determinadas modalidades ácidos nucleicos de interferencia cortos que no requieren la presencia de nucleótidos que tienen un grupo 2'-hidroxi para mediar en el ARNi y, como tales, las moléculas de ácido nucleico de interferencia cortas de la invención opcionalmente no incluyen ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tienen un grupo 2'-OH). Sin embargo, tales moléculas de ANic que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula de ANic para soportar ARNi pueden tener un enlazador o enlazadores u otros grupos, restos, o cadenas unidos o asociados que contienen uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, las moléculas de ANic pueden comprender ribonucleótidos en aproximadamente el 5, 10, 20, 30, 40, o 50 % de las posiciones de los nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico de interferencia cortas modificadas de la invención también se pueden denominar oligonucleótidos de interferencia cortos modificados. Como se usa en la presente descripción, el término ANic pretende ser equivalente a otros términos que se usan para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar ARNi específico de secuencia, por ejemplo, ARN de interferencia corto (ARNic), ARN de doble cadena (ARNdc), micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNic modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt), y otros. Los ejemplos no limitativos de moléculas de ANic de la invención se muestran en el documento USSN

11/234,730, presentado el 23 de septiembre de 2005, incorporado por referencia en su totalidad en la presente descripción. Tales moléculas de ANic son distintas de otras tecnologías de ácidos nucleicos conocidas en la técnica que median la inhibición de la expresión génica, tales como ribozimas, antisentido, formadores de tríplex, aptámeros, quimera 2,5-A, u oligonucleótidos señuelo.

5 Por "diana", como se usa en la presente descripción, se entiende cualquier proteína, péptido, o polipéptido diana codificado por un gen diana. El término "diana" también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican cualquier proteína, péptido, o polipéptido diana que tiene actividad diana, tal como la codificada por el ARN diana. El término "diana" también pretende incluir otra secuencia codificante de la diana, tales como otras isoformas diana, genes mutantes diana, variantes de empalme de genes diana, y polimorfismos de genes diana.

10 Composiciones Farmacéuticas

15 Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral, por inhalación o aerosol o por vía rectal en formulaciones de dosificación unitarias que contienen portadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular o intratecal, y similares. Además, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Uno o más compuestos de la invención se pueden encontrar presentes en asociación con uno o más portadores y/o diluyentes y/o adyuvantes no tóxicos farmacéuticamente aceptables y si se desea otros ingredientes activos. Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención se pueden encontrar en una forma adecuada para su uso por vía oral, por ejemplo, como tabletas, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.

20 25 Las composiciones destinadas para su uso por vía oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de las composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Las tabletas se pueden encontrar sin recubrir o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas. En algunos casos tales recubrimientos se pueden preparar mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de esta manera proporcionan una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

30 35 40 45 Las formulaciones para su uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina duras en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

50 55 60 65 Las formulaciones para su uso oral también se pueden presentar como pastillas para chupar.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, metilcelulosa de hidroxipropilo, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátilo de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquíleno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etíleno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación de óxido de etíleno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación del óxido de etíleno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo etil, o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular mediante la suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes y saborizantes para proporcionar preparaciones orales agradable al paladar. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

- 5 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes o los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por aquellos que se mencionan anteriormente. Los excipientes adicionales, por ejemplo los agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes, también se pueden encontrar presentes.
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden encontrar en forma de emulsiones aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábiga o goma tragacanto; fosfátidos de origen natural, por ejemplo, frijol de soya, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxetileno sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.
- 15 Los jarabes y elíxires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, o glucosa o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y agente saborizante y colorante. Las composiciones farmacéuticas se pueden encontrar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión o solución inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como solventes o medios de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo suave se puede emplear incluyendo los mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tal como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de los inyectables.
- 20 La composición de la invención también se puede administrar en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar al mezclar el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicos.
- 25 Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía parenteral en un medio estéril. El fármaco, en dependencia del vehículo y concentración que se usa, se puede encontrar ya sea suspendido o disuelto en el vehículo. De manera ventajosa, los adyuvantes tales como anestésicos locales, agentes conservantes y tamponantes se pueden encontrar disueltos en el vehículo.
- 30 Para los trastornos de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferentemente como un gel, aerosol, ungüento o crema tópicos, o como un supositorio, que contiene los ingredientes activos en una cantidad total de, por ejemplo, 0,075 a 30 % p/p, preferentemente 0,2 a 20 % p/p y con la máxima preferencia 0,4 a 15 % p/p. Cuando se formulan en un ungüento, los ingredientes activos se puede emplear ya sea con una base de ungüento soluble en agua o parafínica.
- 35 Alternativamente, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de la crema puede incluir, por ejemplo, al menos 30 % p/p de un alcohol polihídrico tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol, polietilenglicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir convenientemente un compuesto que potencia la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de tales potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. Los compuestos de esta invención también se pueden administrar por un dispositivo transdérmico. La administración tópica preferentemente se logrará mediante el uso de un parche del tipo membrana porosa o depósito, o de una variedad matriz sólida. En cualquier caso, el agente activo se administra continuamente desde el depósito o las microcápsulas a través de una membrana hacia el agente activo adhesivo permeable, que se encuentra en contacto con la piel o la mucosa del receptor. Si el agente activo se absorbe a través de la piel, se administra al receptor un flujo controlado y predeterminado del agente activo. En el caso de las microcápsulas, el agente de encapsulación también puede funcionar como membrana. El parche transdérmico puede incluir el compuesto en un sistema de solvente adecuado con un sistema adhesivo, tal como una emulsión acrílica, y un parche de poliéster. La fase oleosa de las emulsiones de esta invención se puede encontrar constituida a partir de ingredientes conocidos de manera conocida. Mientras la fase puede comprender meramente un emulsionante, puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como un aceite. Preferentemente, un emulsionante hidrófilo se incluye junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizador. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el (los) emulsionante(s) con o sin estabilizador(es) produce(n) la denominada cera emulsionada, y la cera junto con el aceite y la grasa producen la denominada base de ungüento emulsionada que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema. Los emulsionantes y estabilizadores de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetoestearílico,

alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo, y laurilsulfato de sodio, entre otros. La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites es probable que se use en formulaciones farmacéuticas en emulsión es muy baja. Por tanto, la crema debe ser preferentemente un producto no graso, que no manche y lavable con 5 consistencia adecuada para evitar fugas de los tubos u otros recipientes. Se pueden ésteres de alquilo mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada, tal como diisoádipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 10 2-ethylhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada. Estos se pueden usar solos o en combinación en dependencia de las propiedades que se requieren. Alternativamente, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica al ojo también incluyen gotas para los ojos en donde los 15 ingredientes activos se disuelven o suspenden en un portador adecuado, especialmente un solvente acuoso para los ingredientes activos. Los ingredientes activos antiinflamatorios se encuentran preferentemente presentes en tales formulaciones en una concentración de 0,5 a 20 %, de manera ventajosa de 0,5 a 10 % y particularmente aproximadamente 1,5 % p/p. Para propósitos terapéuticos, los compuestos activos de esta invención de combinación se combinan normalmente con uno o más adyuvantes apropiados a la vía de administración indicada. Si se administra por vía oral, los compuestos se pueden mezclar con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de 20 celulosa de ácidos alcanoicos, ésteres de alquil celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de los ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y/o alcohol de polivinilo, y entonces se fabrican tabletas o cápsulas para su administración conveniente. Tales cápsulas o tabletas pueden contener una formulación de liberación controlada que se puede proporcionar en una dispersión del compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa. Las formulaciones para la 25 administración parenteral se pueden encontrar en forma de soluciones o suspensiones acuosas y no acuosas para inyección isotónica estéril. Estas soluciones y suspensiones se pueden preparar a partir de polvos estériles o gránulos que tienen uno o más de los portadores o diluyentes que se mencionan para su uso en las formulaciones para administración oral. Los compuestos se pueden disolver en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro de sodio y/o varios tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien y ampliamente conocidos en la técnica 30 farmacéutica.

Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente (aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los 35 materiales portadores para producir una única forma de dosificación variará en dependencia del huésped tratado y el modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación contendrán generalmente de entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo. La dosis diaria se puede administrar de una a cuatro dosis por día. En el caso de afecciones de la piel, puede ser preferible aplicar una preparación tópica de compuestos de esta invención en el área afectada de dos a cuatro veces al día.

40 Se entenderá que, sin embargo, el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.

#### 45 Procedimiento general

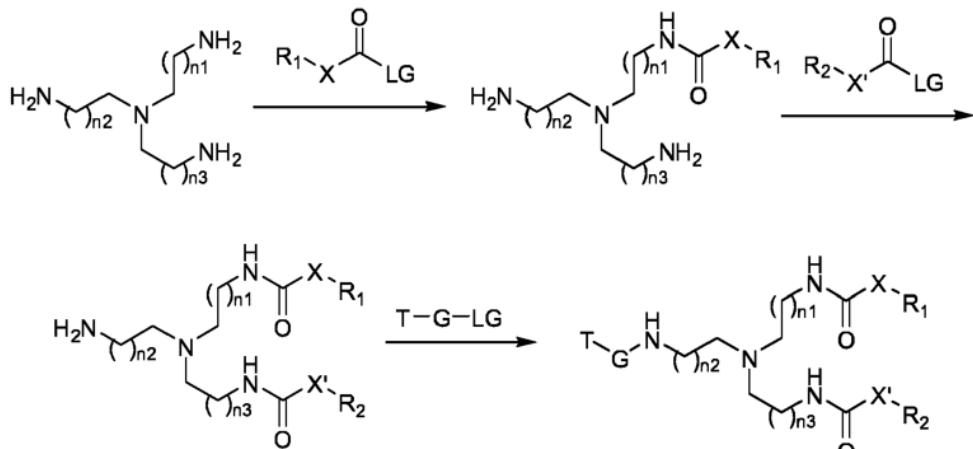
Los procedimientos de síntesis representativos para la preparación de los compuestos de la invención se describen 50 más abajo en los siguientes esquemas. Los expertos en la técnica reconocerán que los materiales de partida y las condiciones de reacción pueden variar, la secuencia de las reacciones se puede alterar, y se pueden emplear etapas adicionales para producir los compuestos deseados. En algunos casos, puede ser necesaria la protección de determinadas funcionalidades reactivas para alcanzar algunas de las transformaciones anteriores. En general, la necesidad de tales grupos protectores, así como también las condiciones necesarias para unir y eliminar tales grupos, resultará evidente para los expertos en la técnica de la síntesis orgánica.

55 A menos que se indique de cualquier otra manera, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, X, X', G, T, n1, n2 y n3 llevan las definiciones que se establecen anteriormente en relación con las fórmulas (A) y I-III. La variable LG representa un grupo saliente adecuado que incluye, pero no se limita a, halógeno, toluenosulfonilo, metanosulfonilo, trifluorometanosulfonilo, 2,2,2-trifluoroetoxi, N-hidroxisuccinimidilo, y similares.

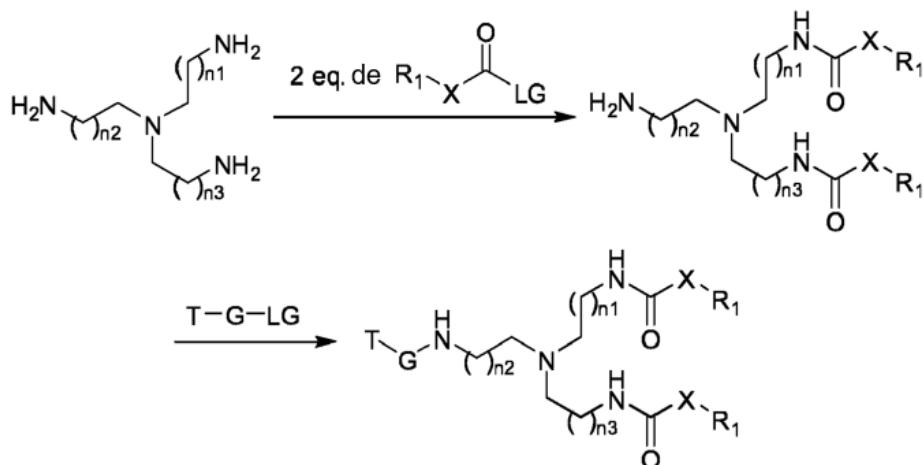
60

65

Esquema 1



Esquema 2

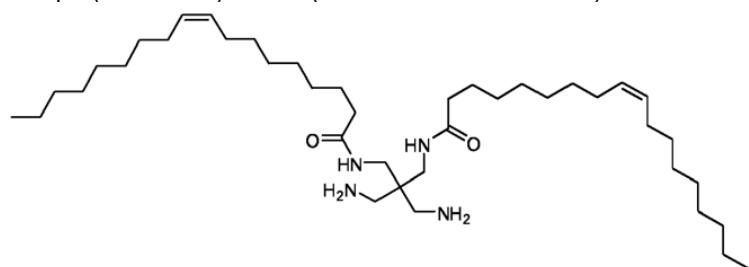


#### 40 Ejemplos

La preparación de los compuestos de la invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos siguientes. Los métodos representativos para sintetizar los compuestos de la invención se presentan más abajo. Se entiende que la naturaleza de los sustituyentes que se requieren para el compuesto diana deseado a menudo determina el método preferido de síntesis.

##### 45 Ejemplo 1 (Referencia)

###### 50 Síntesis de N,N'-dioleoil tetraakis(aminometil)metano ("dioleoil amina reticulada")



60 dioleoil amina reticulada (1)

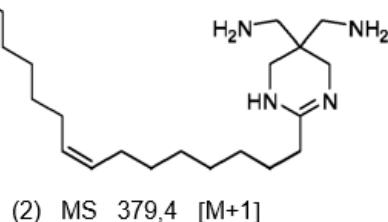
65 El tetraakis(aminometil)metano se prepara mediante un procedimiento conocido (Adil, K. y otros, Solid State Sciences, 6 (2004), 1229-1235). Un matraz de 50 ml se encuentra equipado con un condensador de refluxo y un agitador magnético. El matraz se carga con tetracloruro de tetraakis(aminometil)metano (800 mg, 2,88 mmol), metanol (10 ml) y solución de NaOMe/MeOH (2,10 g de 5,457 M, 11,50 mmol). La mezcla se agita y se somete a

reflujo por 4 horas, entonces se enfría. La solución de metanol se decanta de las sales inorgánicas, y las sales se vuelven a suspender en etanol absoluto (15 ml). La suspensión se centrifuga, y los compuestos orgánicos combinados se concentran *al vacío*. El residuo se disuelve en cloruro de metileno (15 ml) y se filtra mediante el uso de una jeringa (filtro de 0,45 micras) de las sales inorgánicas restantes. La concentración de los filtrados proporciona tetraquis(aminometil)metano libre con un rendimiento cuantitativo como un material semisólido blanco (el alcohol residual se estima por RMN). RMN ( $D_2O$ )  $\delta$  2,9 (s,  $CH_2$ )

5 El tetraquis(aminometil)metano que se obtiene (420 mg, 90 % de pureza, 2,86 mmol) se disuelve en etanol absoluto (15 ml) y se añade ácido trifluoroacético (400 mg, 3,50 mmol), seguido de oleato de 2,2,2-trifluoroetilo (2,08 g, 5,72 mmol) [vide infra, Ejemplo 3]. La mezcla homogénea se deja reaccionar por 72 horas a temperatura ambiente, y se concentra *al vacío*. El residuo se disuelve en MeOH/agua (10 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %) (40 ml) y el pH se ajusta a aproximadamente pH 2 con ácido trifluoroacético. El residuo se purifica por cromatografía sobre sílice modificada C-8, mediante el uso de MeOH/agua (10 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %) como eluyente. Se aísla N,N'-dioleoil tetraquis(aminometil)metano ("dioleoil amina reticulada") como sal bistrifluoroacética (0,9 g). EM (sal de TFA) 661 [M+1]; RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,5 (br. 6H), 8,05 (br, 2H), 5,37 (m, 4H), 3,07 y 2,95 (pobremente disuelto, 4H cada uno); 2,15 (t, 4H), 2,01 (m, 8H), 1,35 (m, 48H), 0,9 (t, 6H)

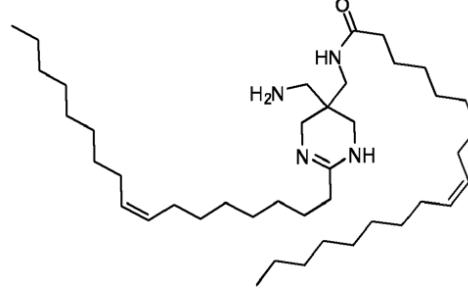
10 Se producen cantidades menores de 2, 3, y 4 cuando la reacción se lleva a cabo a un pH más alto (por ejemplo, sin ácido trifluoroacético o en presencia de NaOMe), y se pueden eliminar fácilmente (por ejemplo, mediante 15 cromatografía):

25



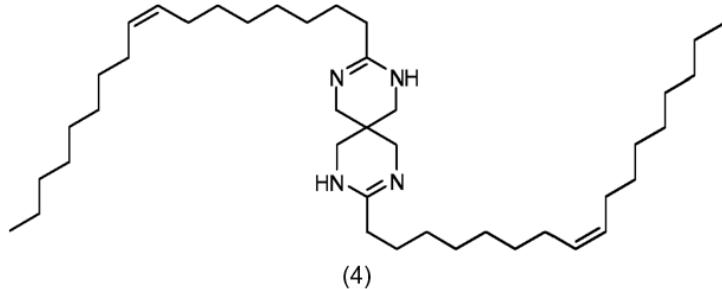
30

35



40

45

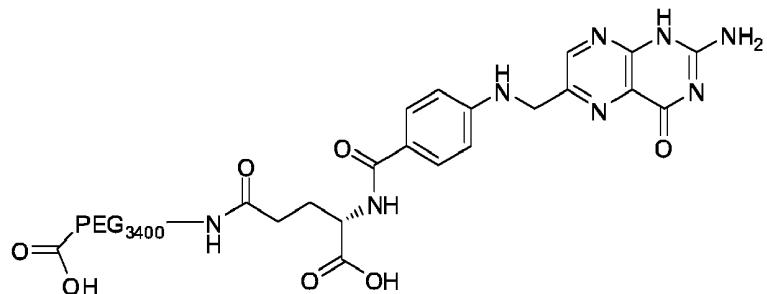


50

60 Ejemplo 2 (Referencia)

2.1. Folato-PEG3400-COOH

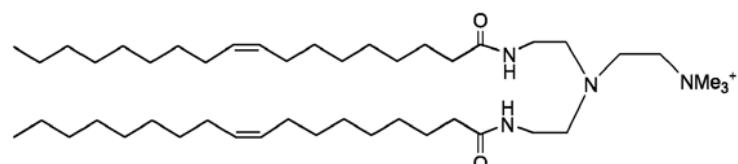
65



Se disuelve tris-(2-aminoetil)amina (1,45 g, 10 mmol) en 20 ml de etanol. A esta solución se añade oleato de 2,2,2-trifluoroetilo (5,6 g), y la mezcla de reacción se somete a reflujo por 24 horas. La mezcla se concentra *al vacío*, el residuo se disuelve en acetonitrilo al 90 %/agua al 10 % y se acidifica a pH 2-3 con ácido trifluoroacético (TFA). La cromatografía de fase inversa de esta solución sobre sílice C8 (eluyente acetonitrilo 89,9 %/agua al 10 %/TFA al 0,1 %) proporciona 1,8 g de N,N'-dioleoil tris(aminoetil)amina ("dioleoil monoamina") como su sal trifluoroacética. EM (sal de TFA) 675 [M+1]; RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,4 (br, 2H), 5,37 (m, 4H), 3,55, 3,37 y 3,05 (pobremente disuelto, 12H en total), 2,15 (t, 4H), 2,01 (m, 8H), 1,35 (m, 48H), 0,9 (t, 6H).

## Ejemplo 3A (Referencia)

## Preparación de dioleoil monoamina de metilo (6.1)

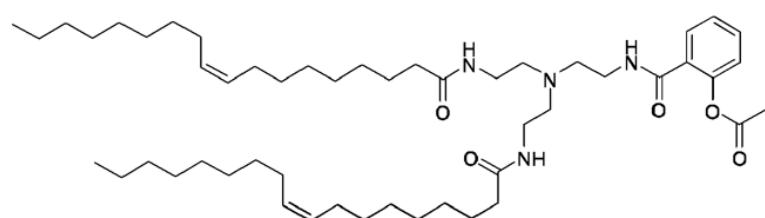


dioleoil monoamina de metilo (6.1)

El compuesto del título se prepara por metilación del producto del Ejemplo 3, N,N'-dioleoil tris(aminoetil)amina ("dioleoil monoamina"), con un exceso de yodometano.

## Ejemplo 4 (Referencia)

## Síntesis de N,N'-dioleoil-N"-acetilsaliciloil tris(aminoetil)amina (7)

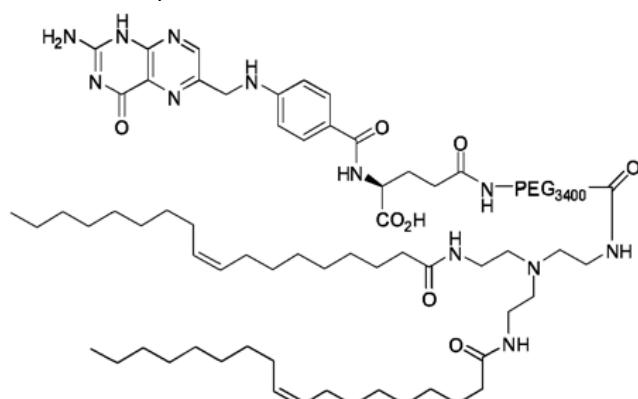


(7)

Se disuelve trifluoroacetato de N,N'-dioleoil-tris(aminoetil)amina (80 mg, 100  $\mu$ l) en 5 ml de cloroformo y se trata con 3 ml de solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  acuosa al 10 %. La fase orgánica se separa, se seca y se concentra *al vacío* para proporcionar N,N'-dioleoil-tris(aminoetil)amina como base libre. Este material se disuelve en 3 ml de cloroformo seco y la solución se trata con cloruro de acetilsaliciloilo (20 mg, 100  $\mu$ mol) para proporcionar el compuesto del título.

## Ejemplo 5 (Referencia)

## Acoplamiento con Folato-PEG3400-COOH para obtener "folato-PEG-dioleoil monoamina" (8)



folato-PEG-dioleoil monoamina (8)

El Folato-dioleil monoamina se obtiene esencialmente como se describe en el ejemplo 2 a partir de folato-PEG3400-COOH y dioleil monoamina.

5 Ejemplo 6 (Referencia)

Complejo de dioleoil monoamina y ARNic; formación de nanopartículas

El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcríto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. El lípido catiónico que se usa es dioleoil monoamina. Las soluciones de ARNic (3 mg/ml) y dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección, y posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % a 0,3 mg/ml para ARNic y 1,5 mg/ml para dioleoil monoamina. El ARNic en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

15 Ejemplo 7 (Referencia)

Complejo de dioleoil monoamina y ADN; formación de nanopartículas

20 El ácido nucleico que se usa es un ADN plasmídico que codifica el gen de la luciferasa y el lípido catiónico que se usa es dioleoil monoamina. Las soluciones de ADN plasmídico (3 mg/ml) y dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección, y posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % hasta 0,3 mg/ml para el ADN plasmídico y 1,5 mg/ml para el dioleoil monoamina. El ADN plasmídico en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

25 Ejemplo 8 (Referencia)

30 Preparación de complejos de transfección de ARNic con dioleoil monoamina con coformulantes

El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcríto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. La dioleoil monoamina se formula con otros lípidos en una relación molar de (4:1). Los lípidos que se usan son 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550], 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-lactosilo, y colesterol. Los coformulantes se añaden a dioleoil monoamina en cloroformo. Los liposomas se preparan como se describe previamente en el Ejemplo 6. Las soluciones de ARNic (3 mg/ml) y dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección, y posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % a 0,3 mg/ml para ARNic y 1,9 mg/ml para dioleoil monoamina. El ARNic en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

45 Ejemplo 9 (Referencia)

45 Preparación de complejos de transfección de ADN con dioleoil monoamina

El ácido nucleico que se usa es un ADN plasmídico que codifica el gen de la luciferasa y el lípido dioleoil monoamina. Las soluciones de ADN plasmídico (3 mg/ml) y dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección y posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % hasta 0,3 mg/ml para ADN plasmídico y 1,9 mg/ml para dioleoil monoamina. El ADN plasmídico en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

55 Ejemplo 10 (Referencia)

Preparación de complejos de transfección de ADN con dioleoil monoamina con coformulantes

60 El ácido nucleico que se usa es un ADN plasmídico que codifica el gen de la luciferasa y el lípido catiónico que se usa es dioleoil monoamina. El lípido catiónico que se usa en este ejemplo es dioleoil monoamina formulada con otros lípidos en una relación molar de (4:1). Los lípidos que se usan son 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550], 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-lactosilo, y colesterol. Los coformulantes se añaden a una solución de cloroformo de dioleoil monoamina. Los liposomas se preparan como se describe previamente en el Ejemplo 6. Las soluciones de coformulantes de ADN (3 mg/ml) y dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección, y posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % a 0,3 mg/ml para ADN y 1,9 mg/ml para dioleoil monoamina. El ADN

en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

5 Ejemplo 11

Preparación de complejos de transfección de ARNic con dioleoil monoamina coformulados con folato-PEG-dioleoil monoamina

10 El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. El lípido catiónico que se usa es dioleoil monoamina coformulado con folato-PEG-dioleoil monoamina en diferentes relaciones molares (1:1), (2:1), (4:1), o (10:1). El coformulante se añade a la solución de cloroformo de dioleoil monoamina. Los liposomas se preparan como se describe previamente en el Ejemplo 6. Las soluciones de ARNic (3 mg/ml) y dioleoil monoamina/folato-PEG-dioleoil monoamina (5 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección y, posteriormente se diluyen en dextrosa al 5 % hasta 0,3 mg/ml para ARNic y 1,9 mg/ml para dioleoil monoamina. El ARNic en solución de dextrosa se añade a la dioleoil monoamina en solución de dextrosa mediante el uso de una micropipeta a una relación de carga de 5:1 (positiva: negativa). La formulación se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos.

20 Ejemplo 12 (Referencia)

Preparación de ARNic encapsulado con liposomas de dioleoil monoamina

25 El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. El lípido catiónico que se usa es dioleoil monoamina. Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria, lo que produce una fina película de lípidos en las paredes de un matraz redondo. El 30 cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. El ARNic que se disuelve en agua se añade a la solución de liposomas/etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatoria. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas.

35 Ejemplo 13

Preparación de ARNic encapsulado con liposomas de folato-PEG-dioleoil monoamina

40 El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. El lípido catiónico que se usa es folato-PEG-dioleoil monoamina. Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria, lo que produce una fina película de lípidos en las paredes de un matraz redondo. 45 El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. El ARNic que se disuelve en agua se añade a la solución de liposomas/etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatoria. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas.

50 Ejemplo 14 (Referencia)

Actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil amina reticulada

55 Este ejemplo ilustra la encapsulación liposomal de ARNic mediante el uso de dioleoil monoamina, dioleoil amina reticulada, o una mezcla de ambos agentes catiónicos. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. Los lípidos catiónicos que se usan son dioleoil monoamina (Ejemplo 3), dioleoil amina reticulada (Ejemplo 1), o una mezcla de ambos. Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria, lo que produce una fina película de lípidos en las paredes de un matraz redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. El ARNic que se disuelve en agua se añade a los liposomas en solución de etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatoria. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas. Las 60 células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. 65

Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic en complejo en ausencia o presencia de FBS en un volumen total de 250 µl de DMEM. Cuando concluye el período de incubación de las células que carecen de FBS en su medio, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. A las células con FBS en su medio de transfección, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 10 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, la reducción de la proteína mVEGF y el transcripto se evalúan y se miden en el medio de cultivo celular (proteína) o lisado celular (transcritos). Para la medición de los niveles de proteína mVEGF, el medio de cultivo celular se analiza directamente mediante el ensayo ELISA de mVEGF. Para el análisis de transcritos de mVEGF, las células se lisan mediante el uso del reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel del transcripto de mVEGF mediante el uso del estuche de detección PCR-TRq.

Ejemplo 15 (Referencia)

Actividad de transfección de ARNic encapsulado con folato-PEG-dioleoil amina reticulada

Este ejemplo ilustra la encapsulación liposomal de ARNic mediante el uso de folato-PEG-dioleoil monoamina, folato-PEG-dioleoil amina reticulada, o una mezcla de ambos agentes catiónicos. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. Los lípidos catiónicos que se usan son folato-PEG-dioleoil monoamina (Ejemplo 5), liposomas de folato-PEG-dioleoil amina reticulada (Ejemplo 2), o mezcla de ambos. Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria, lo que produce una fina película de lípidos en las paredes de un matraz redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. El ARNic que se disuelve en agua se añade a los liposomas en solución de etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatoria. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas. Las células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic en complejo en ausencia o presencia de FBS en un volumen total de 250 µl de DMEM. Cuando concluye el período de incubación de las células que carecen de FBS en su medio, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. A las células con FBS en su medio de transfección, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 10 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, la reducción de la proteína mVEGF y el transcripto se evalúan y se miden en el medio de cultivo celular (proteína) o lisado celular (transcritos). Para la medición de los niveles de proteína mVEGF, el medio de cultivo celular se analiza directamente mediante el ensayo ELISA de mVEGF. Para el análisis de los transcritos de mVEGF, las células se lisan en primer lugar, mediante el uso del reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel del transcripto de mVEGF mediante el uso de la detección por PCR-TRq.

Ejemplo 16 (Referencia)

Reducción de la proteína VEGF uterina después de la administración intravaginal de dioleoil monoamina en complejo con ARNic.

Dos días antes de la administración de ARNic a ratones hembra ICR (17-22 gramos) son dadas dos administraciones subcutáneas diarias de progesterona (0,5 mg que se disuelven en aceite de sésamo) para normalizar el ciclo estral en los animales. A los ratones entonces se les administra por vía intravaginal ARNic formulado de direccionamiento al transcripto de VEGF o un control de ARNic sin direccionamiento. El ARNic forma un complejo con dioleoil monoamina en una relación de carga N:P de 5:1. Se administra un total de 9 µg de ARNic en un volumen final de 30 µl (0,3 mg/ml). A las 48 horas después de la administración, los animales se sacrifican y la vagina/cuello uterino y el útero (lo que incluye los cuernos uterinos) se extraen, se diseccionan libre otros tejidos y se almacenan congelados en N<sub>2</sub> líquido. Solo se usan para el análisis tejidos de animales que tenían una apariencia macroscópica consistente con el tratamiento con progesterona. El tejido se homogeneiza en tampón de lisis y se realizan determinaciones de proteínas VEGF por ELISA.

Ejemplo 17 (Referencia)

Reducción de proteínas después de la transfección *in vitro* de ARNic en complejo con reactivos de administración de dioleoil monoamina y dioleoil monoamina de metilo.

Se determina *in vitro* la actividad de transfección de complejos de ARNic con los reactivos de administración de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) o dioleoil monoamina de metilo (Ejemplo 3A). Los complejos de transfección que contienen la construcción de ARNic de simVEGF se preparan mediante métodos que se describen previamente. Las células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic en complejo en un volumen total de 250 µl de DMEM.

Cuando concluye el período de incubación, se añaden 250  $\mu$ l de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, se realizan determinaciones de proteína sobrenadante de mVEGF como se describe anteriormente. Los resultados indican una reducción significativa (~95 %) de la proteína VEGF (Figura 2).

5 Ejemplo 18  
 Reducción de proteínas y transcripciones después de la transfección *in vitro* de ARNic en complejo con folato-PEG-dioleoil monoamina

10 Se determina *in vitro* la actividad de transfección de ARNic y complejos conjugados de folato-PEG-dioleoil monoamina. Los complejos de transfección que contienen la construcción de ARNic de simVEGF se preparan mediante métodos que se describen previamente. Las células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5  $\mu$ g de ARNic en complejo en ausencia o presencia de sustrato de folato a concentraciones variables en un volumen total de 250  $\mu$ l de DMEM. Cuando concluye el período de incubación, se añaden 250  $\mu$ l de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, los niveles de proteína mVEGF y del transcripto de mVEGF se miden en el medio de cultivo celular y en los lisados celulares, respectivamente. Para la medición de los niveles de proteína mVEGF, el medio de cultivo celular se analiza directamente mediante el ensayo ELISA de mVEGF. Para el análisis de transcriptos de mVEGF, las células se lisan mediante el uso del reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel del transcripto de mVEGF mediante el uso del estuche de detección PCR-TRq. Se calcula el porcentaje de proteína VEGF y la reducción del transcripto ocurre con relación a las células que han sido transfectadas con ARNic de control sin silenciamiento.

15 25 Ejemplo 19 (Referencia)  
 Reducción del transcripto de Caveolina-1 en pulmón e hígado después de la administración de ARNic en complejo con reactivo de administración de dioleoil monoamina.

20 30 A ratones ICR hembra (17-22 gramos) se les inyecta por vía intravenosa ARNic formulado de direccionamiento al transcripto de Caveolina-1 (Cav-1) o un control de ARNic sin direccionamiento. El ARNic forma un complejo con el reactivo de administración de dioleoil monoamina en una relación 10:1. Se inyecta un total de 100  $\mu$ g de ARNic en un volumen final de 200  $\mu$ l (0,5 mg/ml). A las 48 horas después de la inyección, los animales se sacrifican y los pulmones y los hígados se recolectan para el análisis de la transcripción de Cav-1 mediante el uso de PCR-TRq. Los niveles de transcripción se normalizan a  $\beta$ -actina como control interno. Los resultados (Figura 3) indican una disminución significativa en los niveles de transcripción de Cav-1 específicos de la diana en ambos pulmones (76 % de reducción) e hígados (62 % de reducción). Para cada grupo, n=5.

35 40 Ejemplo 20 (Referencia)  
 Reducción del transcripto de VEGF que resulta en la inhibición del tumor después de la inyección de siVEGF formulado con dioleoil monoamina en tumores subcutáneos en ratones.

45 50 En este ejemplo, se implantaron tumores en los flancos traseros de ratones CH3 al inyectar  $5 \times 10^5$  células de carcinoma de células escamosas. Se permitió que los tumores crecieran hasta que alcanzaron un tamaño de ~40  $\text{mm}^3$ . Los tumores se inyectaron entonces con un ARNic comercialmente disponible de direccionamiento a VEGF que se formuló con dioleoil monoamina en una relación N:P de 5:1 o con un ARNic de control sin silenciamiento formulado de manera similar. La concentración final de ARNic fue de 0,3 mg/ml. Se inyectó un total de 30  $\mu$ l de la solución de ARNic formulada en los tumores y las inyecciones se repitieron cada 3-4 días para un total de 6 inyecciones. Los tumores de algunos animales se recolectaron 48 horas después de la segunda inyección de ARNic formulada para el análisis de transcripción. Los resultados de este estudio (Figura 4) indican que la administración del ARNic de VEGF resultó en una disminución del 32 % en el transcripto de VEGF con relación al grupo de control sin silenciamiento. Una semana después de la última inyección en el tumor hubo una disminución del 31 % en el volumen del tumor en el grupo de ARNic de VEGF con relación al ARNic sin silenciamiento y una disminución del 57 % con relación a los animales de control sin tratar. Los tratamientos con ARNic de VEGF resultaron adicionalmente en una mejora del 13 % en la mediana de supervivencia de los animales con relación al control sin silenciamiento (siNON) o los grupos sin tratar.

55 60 Ejemplo 21 (Referencia)  
 Preparación de complejos de transfección de ARNic concentrados con dioleoil monoamina por filtración

65 El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción del transcripto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. Los liposomas de los lípidos catiónicos se preparan como se describe previamente en el Ejemplo 6. Las soluciones de ARNic (20 mg/ml) y dioleoil monoamina (6,4 mg/ml) se preparan por separado en agua para inyección. Se combinan 25  $\mu$ l del

ARNic con 500  $\mu$ l de solución de dioleoil monoamina. Posteriormente, el complejo se diluye en dextrosa al 5 % hasta 0,03 mg/ml de ARNic. El complejo diluido se transfiere a una unidad de filtro centrífugo de 25-50 kDa y se centrifuga por varios minutos para alcanzar la concentración de ARNic deseada en el retentado.

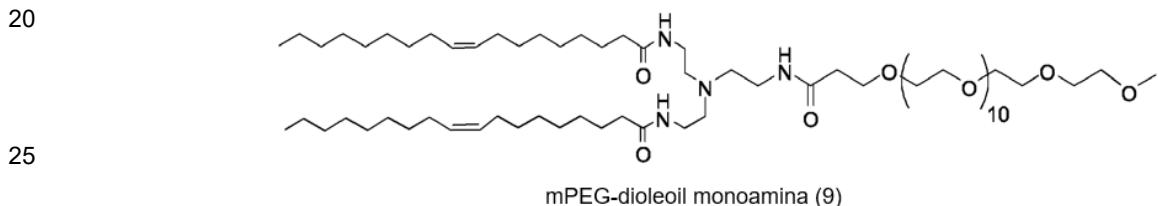
5 Ejemplo 22 (Referencia)

Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta de nanopartículas

10 Los complejos de dioleoil monoamina/ARNic se formulan como en el Ejemplo 6, y se diluyen en NaCl 50 mM a concentraciones apropiadas. Las muestras se añaden entonces a una cubeta de poliestireno y se mide el tamaño de partícula y el potencial zeta mediante el uso de un medidor de partículas 90Plus/BI-MAS. Los tamaños de partícula que se observan se encuentran entre 80 y 400 nm y los potenciales zeta que se observan se encuentran entre +10 y +40 mV.

15 Ejemplo 23

Síntesis de una di-[2-(oleoilamino)etil][2-[(metoxidodecaetilenglicolcarbonilamino)etil]amina "mPEG-dioleoil monoamina" (9)



30 Se disuelve metoxi(dodecaetilenglicol) (MW 550, polidisperso, que contiene aproximadamente 12 unidades de etilenglicol, 720 mg, 1,30 mmol) en 8 ml de tolueno seco. A esta solución de fosgeno en tolueno (4 ml de una solución 2 M, 8 mmol) se añade. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 3 horas, y entonces se concentra al vacío a temperatura ambiente, lo que proporciona 810 mg (1,31 mmol) de cloroformiato de metoxi(dodecaetilenglicol) bruto.

35 El cloroformiato de metoxi(dodecaetilenglicol) anterior (810 mg, 1,31 mmol) se disuelve en 6,313 g de cloruro de metileno seco. La dioleoil monoamina se convierte en la base libre por tratamiento con carbonato de potasio y extracción con cloruro de metileno. La fase orgánica se seca para dar un material oleoso seco (700 mg, 1,04 mmol), que se vuelve a disolver en 6 ml de cloruro de metileno seco. Se añaden 5,66 g de la solución de cloroformiato de metoxi(dodecaetilenglicol) (1,04 mmol de cloroformiato de mPEG) con agitación a la solución de base libre de dioleoil monoamina. La mezcla se agita por 3 horas a temperatura ambiente, y entonces se concentra y purifica cromatográficamente mediante el uso de gel de sílice (3 a 15 % de metanol en gradiente de elución de cloruro de metileno). La purificación proporciona PEG-dioleoil monoamina (830 mg, 0,664 mmol).

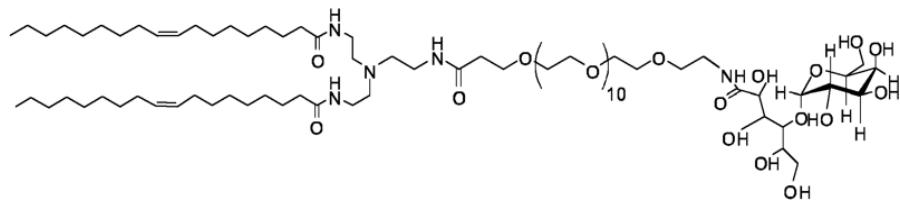
45 Ejemplo 24

45 Preparación de un marcador fluorescente que lleva monoamina

50 El cloruro de acilo de sulforrodamina B [Fluka, 115 mg, 0,2 mmol] se disuelve en 7 ml de cloroformo seco. Esta solución se añade a la solución bien agitada de base libre de dioleoil monoamina [140 mg, aproximadamente 0,2 mmol, que se prepara como antes por tratamiento de la solución de cloroformo de su sal de TFA con carbonato de potasio] en 5 ml de cloroformo seco. La mezcla se agita por 3 horas a temperatura ambiente, y entonces se concentra y se purifica cromatográficamente mediante el uso de una placa preparativa de gel de sílice de capa de 2000 micrómetros de espesor [eluciones posteriores en metanol del 3 al 15 % en cloruro de metileno]. La purificación proporciona [rodamina B sulfonil]dioleoil monoamina (120 mg, 0,1 mmol).

55 Ejemplo 25

60 Síntesis de  $\alpha$ -lactobionilamido- $\omega$ -ácido propiónico undecaetilenglicol-di-[2-(oleoilamino)etil] (2-aminoetil)amina "lactobionil-dioleoil monoamina" (10)



15 Se disuelven el enlazador Fmocamino- $\omega$ -ácido propiónico-undecaacetilenglicol (Fmoc-PEG<sub>11</sub>-COOH) (100 mg, 0,119 mmol) y el p-nitrofenol (18 mg, 0,129 mmol) en 1 ml de cloruro de metíleno. Se disuelve DCC (27 mg, 0,131 mmol) en 1 ml de cloruro de metíleno y se añade a la solución de PEG/p-nitrofenol en agitación. Se deja que la reacción prosiga a temperatura ambiente por 3 horas, después de lo cual se retira la DCU mediante el uso de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ m. La dioleoil monoamina se convierte en la base libre por tratamiento con carbonato de potasio y extracción con cloruro de metíleno. La fase orgánica se seca para dar 75 mg (0,111 mmol) de material seco que se vuelve a disolver en 0,5 ml de cloruro de metíleno. Esta solución se añade a la solución de  $\alpha$ -Fmocamino- $\omega$ -ácido propiónico-ácido undecaacetilenglicol activado con p-nitrofenol. Se deja que la reacción prosiga por 18 horas a temperatura ambiente. El material bruto se seca y se vuelve a disolver en 1,8 ml de dimetilformamida a la que se añaden 200  $\mu$ l de piperidina. Se deja que prosiga la escisión de Fmoc por 15 minutos, después de lo cual se eliminan la dimetilformamida y la piperidina bajo alto vacío. Se aísla  $\alpha$ -amino- $\omega$ -ácido propiónico-undecaacetilenglicol-di-[2-(oleoilamino)etil](2-aminoetil)amina por separación en una columna de gel de sílice que contiene 80 % de cloruro de metíleno en metanol, seguido de 75 %. Las fracciones apropiadas se secan, dando 75 mg (0,59 mmol) de un material aceitoso marrón.

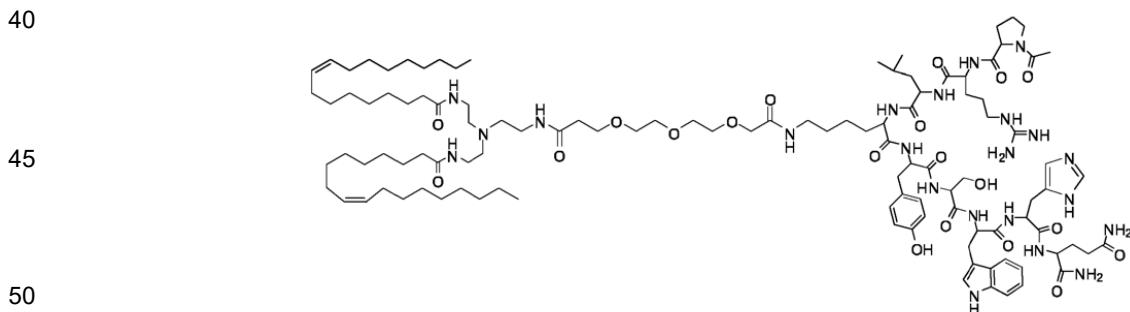
20

25

30 El ácido lactobiónico se convierte primero en la lactona correspondiente por deshidratación a 50 °C en metanol que contiene una gota de ácido trifluoroacético. Se disuelve  $\alpha$ -amino- $\omega$ -ácido propiónico-undecaacetilenglicol-di-[2-(oleoilamino)etil](2-aminoetil)amina (50 mg, 0,039 mmol) en 1,5 ml de metanol que contiene 15  $\mu$ l de diisopropiletilamina. A esta solución en agitación se añade lactobionolactona seca (15 mg, 0,044 mmol). El matraz se sella y la reacción se agita a 60 °C por 20 horas. Se elimina una pequeña cantidad de precipitado mediante filtración con jeringa y el  $\alpha$ -lactobionilamido- $\omega$ -ácido propiónico-undecaacetilenglicol-di-[2-(oleoilamino)etil](2-aminoetil)amina se seca bajo alto vacío para dar 57 mg (0,035 mmol) de material puro.

35 Ejemplo 26

Síntesis de di-[2-(oleoilamino)etil] [2-[ $\omega$ -propionil-LHRH-octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina "LHRH-dioleoil monoamina" (11)



LHRH-dioleoil monoamina (11)

55 Se disuelve ácido octaetilenglicoldipropiónico (347 mg, 0,675 mmol) en 8 ml de cloruro de metíleno seco. A esto se le añade p-nitrofenol (210 mg, 1,5 mmol), seguido de diciclohexilcarbodiimida (DCC) (313 mg, 1,52 mmol). Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra de la diciclohexilurea precipitada, el filtrado se concentra y el compuesto del título se purifica mediante cromatografía sobre sílice (primero, elución con éter para eliminar el p-nitrofenol que no ha reaccionado, y entonces con metanol/cloruro de metíleno al 4 %).

60

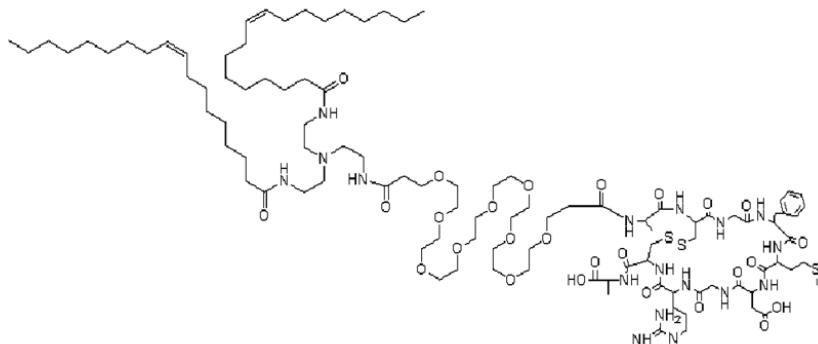
65 El éster di-p-nitrofenílico del ácido octaetilenglicoldipropiónico anterior (510 mg, 0,68 mmol) se disuelve en 6 ml de cloruro de metíleno seco. La di-[2-(oleoilamino)etil](2-aminoetil)amina se convierte en la base libre mediante tratamiento con carbonato de potasio y extracción con cloruro de metíleno. La fase orgánica se seca para dar un material oleoso seco (390 mg, 0,58 mmol), que se vuelve a disolver en 3 ml de cloruro de metíleno. La mezcla se agita durante toda la noche, y entonces se purifica cromatográficamente, mediante el uso del mismo procedimiento que para el éster di-p-nitrofenílico que se menciona anteriormente. Despues de la fracción de di-[2-

(oleoilamino)etil](2-aminoetil)amina sin reaccionar, se recolecta p-nitrofenolato de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -ácido propiónico octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina (268 mg, 0,207 mmol).

5 El péptido LHRH comercial (secuencia: Ac-QHWSYKLRP-Am, 98 mg de sal de TFA, 0,078 mmol) se disuelve en 2 ml de dimetilformamida seca y la solución se evapora a alto vacío para secar el péptido. El residuo se disuelve en 1 ml de dimetilformamida seca; se añade la solución del p-nitrofenolato de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -ácido propiónico octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina anterior (135 mg, 0,104 mmol) en 1 ml de dimetilformamida, seguido de la adición de trietilamina (0,028 ml, 0,201 mmol). La mezcla de reacción que se agita se mantiene a temperatura ambiente por 17 horas y entonces se concentra *al vacío*. La purificación del material diana se logra mediante 10 cromatografía preparativa de fase inversa mediante el uso de una columna C8 y elución en gradiente de acetonitrilo/agua [acetonitrilo al 30 %/agua (TFA al 0,1 %) al 90 % por 15 minutos] proporciona 97 mg de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -propionil-LHRH octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina.

15 Ejemplo 27

Síntesis de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -propionil-RGD-octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina "RGD-dioleoil monoamina" (12)



RGD-dioleoil monoamina (12)

35 Se disuelve ácido octaetilenglicoldipropiónico (347 mg, 0,675 mmol) en 8 ml de cloruro de metileno seco. A esto se le añade p-nitrofenol (210 mg, 1,5 mmol), seguido de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (313 mg, 1,52 mmol). Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra de la dicitclohexilurea precipitada, el filtrado se concentra y el compuesto del título se purifica mediante cromatografía sobre sílice (primero, elución con éter para eliminar el p-nitrofenol que no ha reaccionado y entonces con metanol al 4 %/cloruro de metileno).

40 El éster di-p-nitrofenílico del ácido octaetilenglicoldipropiónico anterior (510 mg, 0,68 mmol) se disuelve en 6 ml de cloruro de metileno seco. La dioleoil monoamina se convierte en la base libre por tratamiento con carbonato de potasio y extracción con cloruro de metileno. La fase orgánica se seca para dar un material oleoso seco (390 mg, 0,58 mmol) que se vuelve a disolver en 3 ml de cloruro de metileno. La mezcla se agita durante toda la noche y 45 entonces se purifica cromatográficamente mediante el uso del mismo procedimiento que para el éster di-p-nitrofenílico que se menciona anteriormente. Después de la fracción de dioleoil monoamina sin reaccionar, se recolecta p-nitrofenolato de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -ácido propiónico octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina (268 mg, 0,207 mmol).

50 Péptido RGD comercial [secuencia: A\*CRGDMFG\*CA (puente disulfuro 2-9), 117 mg de sal de TFA, [0,100 mmol] se disuelve en 3 ml de dimetilformamida seca y la solución se evapora a alto vacío para secar el péptido. El residuo se disuelve en 3 ml de metanol seco; se añade la solución del p-nitrofenolato de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -ácido propiónico octaetilenglicol-propionilamino)etil]amina anterior (135 mg, 0,104 mmol) en 3 ml de cloruro de metileno, seguido de la adición de base de Hunig (0,065 ml, 0,370 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 72 horas y entonces se concentra al vacío. La purificación del material diana se logra mediante 55 cromatografía preparativa de fase inversa mediante el uso de una columna C8 y elución en gradiente de acetonitrilo/agua que proporciona 43 mg (0,020 mmol) de di-[2-(oleoilamino)etil][2-[ $\omega$ -propionil-RGD-octaetilenglicolpropionilamino)etil]amina.

60 Ejemplo 28

Preparación de ARNic en complejo con dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina

65 El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción de la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) endógeno y los niveles de proteína. Los lípidos catiónicos que se usan son mezclas de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) y mPEG-dioleoil monoamina (Ejemplo 23).

Para preparar los liposomas, los lípidos se disuelven y mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria lo que produce una película delgada de lípidos en las paredes de un matraz de fondo redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz de fondo redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se rehidrata con agua destilada a la concentración deseada y se agita vigorosamente por varios minutos. La solución se coloca en un baño de ultrasonidos por 1 hora y entonces se filtra a través de un filtro de jeringa estéril de 200 nm para dar la solución liposomal final. Se añade ARNic disuelto en agua a la solución de liposomas.

5 Ejemplo 29

10 Preparación de ARNic encapsulado con dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina

Este ejemplo ilustra la encapsulación liposomal de ARNic mediante el uso de mPEG-dioleoil monoamina. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción de los niveles de 15 proteínas y transcritos diana endógenos. Los lípidos catiónicos que se usan son mezclas de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) y mPEG-dioleoil monoamina (Ejemplo 23). Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria lo que produce una película delgada de lípidos en las paredes de un matraz de fondo redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz de fondo redondo en una bomba de vacío durante toda 20 la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. Se añade ARNic disuelto en agua a los liposomas en solución de etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatorio. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas.

25 Ejemplo 30

Actividad de transfección ARNic y dioleoil monoamina/mPEG-complejos de dioleoil monoamina

30 Se determina *in vitro* la actividad de transfección de ARNic y complejos de dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina como sigue. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción de los niveles del transcripto endógeno de Caveolina-1 (Cav-1). Los lípidos catiónicos que se usan son mezclas de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) y mPEG-dioleoil monoamina (Ejemplo 23). Para preparar los liposomas, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria lo que produce una película delgada de lípidos en las paredes de un 35 matraz de fondo redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz de fondo redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se rehidrata con agua destilada a la concentración deseada y se agita vigorosamente por varios minutos. La solución se coloca en un baño de ultrasonidos por 1 hora y entonces se filtra con una jeringa estéril a través de un filtro de jeringa de 200 nm para dar la solución liposomal final. Se añade ARNic disuelto en agua a la solución de liposomas. Las nanopartículas 40 resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic en complejo. Las células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic en complejo en ausencia o presencia de FBS en un volumen total de 250 µl de DMEM. Cuando concluye el período de incubación de las células 45 que carecen de FBS en su medio, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. A las células con FBS en su medio de transfección, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 10 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, se mide la reducción del transcripto de Cav-1 en los lisados celulares. Para realizar el análisis de la transcripción de Cav-1, las células se lisan mediante el uso de reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel de transcripción de Cav-1 mediante el uso de un estuche de detección de PCR-TRq. 50 La transcripción de Cav-1 se inhibe hasta en un 90 % en comparación con un control sin silenciamiento (Figura 5A).

Ejemplo 31

Actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina

55 Se determina *in vitro* la actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina como sigue. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción de los niveles del transcripto endógeno de Caveolina-1 (Cav-1). Los lípidos catiónicos que se usan son mezclas de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) y mPEG-dioleoil monoamina (Ejemplo 23). Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea. El solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria lo que produce una película delgada de 60 lípidos en las paredes de un matraz de fondo redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz de fondo redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. Se añade ARNic disuelto en agua a los liposomas en solución de etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatorio. Las nanopartículas resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas. Las células SCCVII ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas

de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic encapsulado en ausencia o presencia de FBS en un volumen total de 250 µl de DMEM. Cuando concluye el período de incubación de las células que carecen de FBS en su medio, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. A las células con FBS en su medio de transfección, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 10 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, se mide la reducción del transcripto de Cav-1 en los lisados celulares. Para el análisis del transcripto de Cav-1, las células se lisan mediante el uso del reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel del transcripto de VEGF mediante el uso de un estuche de detección de PCR-TRq. El transcripto de Cav-1 se inhibe hasta un 45 % en comparación con un control sin silenciamiento (ver Figura 5B).

5 Ejemplo 32

10 Reducción del transcripto de Caveolina-a en el pulmón después de la administración de ARNic en complejo con dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina

15 A ratones hembra ICR (17-22 g) se les inyectan por vía intravenosa (IV) 200 µl de ARNic previamente formulado de direcciónamiento al transcripto de Caveolina-1 (Cav-1). Los complejos de ARNic contienen una mezcla 10:1 de dioleoil monoamina y mPEG-dioleoilmonoamina con 100, 60, 40, 20, o 10 µg de ARNic (relación N:P 20:1) (Ejemplo 20 de referencia 9). A las 48 horas después de la inyección, se sacrifica a los animales y se recolectan los pulmones para el análisis del transcripto diana de Cav-1 y la cuantificación del ARNic mediante el uso de PCR-TRq. Los niveles del transcripto de CAV-1 (normalizados a β-actina como control interno) se expresan como un porcentaje de expresión con relación a los animales de control sin tratar. Los resultados indican una reducción dependiente de la dosis de los niveles de transcripto de Cav-1 en los pulmones de los animales que varían de >60 % en animales que recibieron 100 µg de ARNic a ~13 % en animales que recibieron 10 µg de ARNic. La cuantificación del ARNic que se inyecta indica un aumento dependiente de la dosis en la cantidad absoluta de ARNic que se distribuye a los pulmones (Figura 6). En la dosis inferior, ~5 % del ARNic que se inyecta se distribuye a los pulmones. En la dosis más alta, ~50 % del ARNic que se inyecta se distribuye a los pulmones. El número de animales ("n") es 6 para cada grupo.

30 Ejemplo 33

Actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil monoamina/lactobionil-dioleoil monoamina

35 Se determina *in vitro* la actividad de transfección de ARNic encapsulado con dioleoil monoamina/lactobionil-dioleoil monoamina como sigue. El ARNic que se usa es una secuencia de nucleótidos de doble cadena destinada a producir una reducción de los niveles de transcripto de β-actina. Los lípidos catiónicos que se usan son mezclas de dioleoil monoamina (Ejemplo 3) y lactobionil-dioleoil monoamina (Ejemplo 24). Para preparar los liposomas de encapsulación, los lípidos se disuelven y se mezclan en cloroformo para asegurar una mezcla homogénea. El 40 solvente orgánico se elimina por evaporación rotatoria lo que produce una película delgada de lípidos en las paredes de un matraz de fondo redondo. El cloroformo se evapora adicionalmente al colocar el matraz de fondo redondo en una bomba de vacío durante toda la noche. La película lipídica resultante se disuelve inicialmente en etanol al 100 % y entonces se lleva al 50 %. Se añade ARNic disuelto en agua a los liposomas en solución de etanol. El etanol se evapora de la mezcla de liposomas/ARNic mediante un sistema de evaporación rotatoria. Las nanopartículas 45 resultantes se suspenden en dextrosa al 5 % al añadir una cantidad igual de dextrosa al 10 % a las partículas de ARNic encapsuladas. Las células Hepa16 ( $0,5 \times 10^5$  células/pocillo) se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en FBS al 10 %. Cada pocillo se incuba por 6 horas con 0,5 µg de ARNic encapsulado en ausencia o presencia de FBS en un volumen total de 250 µl de DMEM. Cuando concluye el período de incubación de las células 50 que carecen de FBS en su medio, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 20 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. A las células con FBS en su medio de transfección, se añaden 250 µl de DMEM suplementado con FBS al 10 % a las células transfectadas y se incuban adicionalmente por otras 40 horas. Al final del período de incubación, se mide la reducción del transcripto de β-actina en los lisados celulares. Para el análisis del transcripto, las células se lisan mediante el uso del reactivo Tri y entonces se cuantifica el nivel de transcripto de β-actina mediante el uso de un estuche de detección de PCR-TRq. El transcripto de β-actina 55 se inhibe en un 90 % en comparación con un control sin silenciamiento, mientras que las muestras que contienen partículas idénticas que carecían del ligando LBA mostraron solo una inhibición del 57 % en comparación con un control sin silenciamiento (Figura 7).

60 Ejemplo 34

65 Liberación controlada de ARNic en complejo con dioleoil monoamina de gel reticulado.

Se formula un ARNic en complejo con dioleoil monoamina como se describe en el Ejemplo 28 que contiene 50 µg de ARNic de Cav-1 y 1,4 µg de dioleoil monoamina en un volumen de 50 µl. El alginato de sodio (Tipo A) se disuelve en agua para dar una solución al 2 %. Se añade una solución de alginato (100 µl) a un único pocillo de una placa de 96 pocillos seguido de 50 µl de la solución de ARNic de dioleoil monoamina/Cav-1. Después de mezclar

cuidadosamente, se añaden 50  $\mu$ l de una solución de CaCl 0,68 M<sub>2</sub> a la mezcla anterior para reticular el gel. Se añaden entonces cien  $\mu$ l de agua o EDTA 0,1 M (que sirve para descomponer el gel al formar complejos con los iones de Ca<sup>2+</sup>) para asegurar la inmersión completa del gel en la solución acuosa. En los puntos de tiempo prescritos, se eliminan los sobrenadantes (200  $\mu$ l) y se reemplazan con 200  $\mu$ l de agua fresca o EDTA 0,1 M. Despues de 84 horas, todas las muestras que se recolectaron se analizan para determinar el contenido de ARNic de Cav-1 mediante el uso de PCR-TRq. Las cantidades de ARNic que se recolectaron en cada punto de tiempo se suman para determinar la cantidad que se libera con el tiempo. En muestras que tienen la adición de EDTA, el 100 % del ARNic formulado con dioleoil monoamina cargada se libera despues de 84 horas. En las muestras que no contienen EDTA, se observó una cinética de liberación significativamente más lenta con menos del 20 % del ARNic total cargado liberado a las 84 horas (Figura 8).

### Ejemplo 35

Reducción del transcripto de Caveolina-1 en pulmón e hígado después de la administración de ARNic en complejo con dioleoil monoamina y mPEG-dioleil monoamina en comparación con ARNic en complejo con otros lípidos catiónicos y sistemas poliméricos catiónicos disponibles comercialmente

A ratones hembra ICR (17-22 g) se les inyectan por vía intravenosa (IV) 200  $\mu$ l de un ARNic previamente formulado de direccionamiento al transcripto de Caveolina-1 (Cav-1). Los complejos de ARNic contienen una mezcla 10:1 de dioleoil monoamina y mPEG-dioleoil monoamina con 40  $\mu$ g de ARNic (relación N:P 20:1) (Ejemplo de referencia 28). Además, el ARNic se formula con DOTAP:DOPE (1:1) en una relación N:P de 20:1, o con PEI ramificado de 25 kDa (10:1). Se inyecta IV un total de 40  $\mu$ g de ARNic formulado con DOTAP:DOPE (en 200  $\mu$ l) en ratones o se inyecta IV un total de 20  $\mu$ g de ARNic formulado con PEI ramificado (en 100  $\mu$ l). La PEI ramificada se usa en una cantidad inferior con el fin de tratar de mitigar las toxicidades conocidas asociadas con esta formulación. A las 48 horas después de la inyección, los animales se sacrifican y los pulmones y los hígados se recolectan para el análisis del transcripto diana de Cav-1 y la cuantificación de ARNic mediante el uso de PCR-TRq. Los niveles del transcripto de CAV-1 (normalizados a  $\beta$ -actina como control interno) se expresan como un porcentaje de expresión con relación a los animales de control sin tratar. El número de animales ("n") es 5 para cada grupo. Los resultados indican una reducción significativa del transcripto (~60 %) en la expresión de CAV-1 en el tejido pulmonar y una reducción del transcripto de ~33 % en el hígado (Figura 9). No se observó una reducción significativa de la transcripción para el ARNic formulado con DOTAP:DOPE. Para el ARNic formulado con PEI ramificado, los animales murieron debido a la toxicidad asociada con la formulación antes de la recolección del tejido y, por lo tanto, no se pudieron analizar; el ARNic formulado con dioleoil monoamina/mPEG-dioleoil monoamina y el ARNic formulado con DOTAP:DOPE se administraron con poca toxicidad.

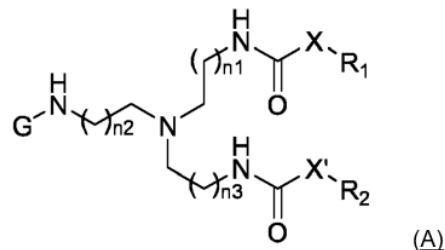
### Ejemplo 36 (Referencia)

Actividad de transfección de ARNic encapsulado con aptámero de direccionamiento a dioleoil amina reticulada/PSMA

## REIVINDICACIONES

- ### 1. Un compuesto de la Fórmula (A):

5



15

en donde

n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;

X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;

20 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y G es un resto de polímero.

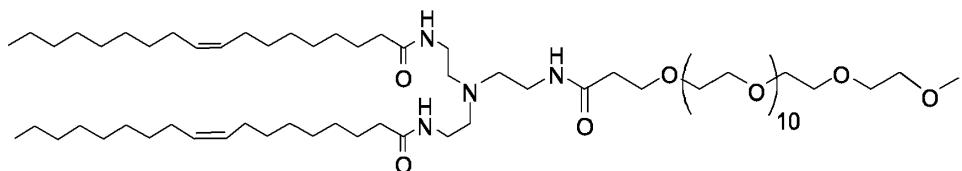
G es un resto de polímero.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el resto de polímero es un polioxialquíleno.

25 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el peso molecular del resto de polímero es de 200-10 000 Da.

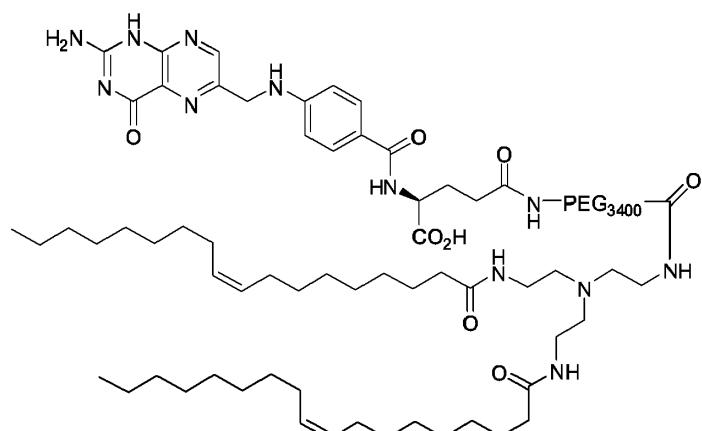
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, que es:

30



5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es:

40



6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde ambos de  $-C(O)X-R_1$  y  $-C(O)X'-R_2$  representan

3. Una formulación que comprenda un compromiso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

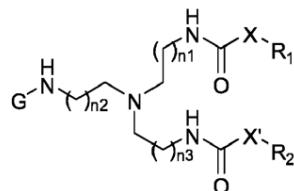
8 Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además una molécula:

65 (a) seleccionada del grupo que consiste en ARN ribosómico; polinucleótidos antisentido de ARN o ADN; aptámeros; ribozimas; ARNc; ARNh; miARN; y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc o ARNm que codifican una proteína terapéuticamente útil; o

(b) seleccionada del grupo que consiste en proteínas, péptidos, colesterol, hormonas, antivirales, quimioterapéuticos, vitaminas y cofactores.

- 5 9. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende uno o más compuestos de fórmula (IV) en asociación con uno o más portadores y/o diluyentes y/o adyuvantes no tóxicos farmacéuticamente aceptables;

10



15

IV

en donde

- 20 n1, n2 y n3 son independientemente 1, 2, 3 o 4;  
 X y X' son independientemente un enlace, oxígeno o nitrógeno;  
 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupos hidrocarbonados C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> que contienen opcionalmente de 1-4 dobles o triples enlaces; y  
 G es hidrógeno o un resto de polímero; y
- 25 en donde al menos uno de los compuestos de fórmula (IV) es el compuesto de la fórmula (A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 10. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mamífero, en donde la formulación es para administración a dicho sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- 35 11. Una formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la molécula se selecciona del grupo que consiste en ARN ribosómico; polinucleótidos antisentido de ARN o ADN; aptámeros; ribozimas; ARNic; ARNh; miARN; y polinucleótidos de ADN genómico, ADNc o ARNm que codifican una proteína terapéuticamente útil.
- 40 12. Una formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que se usa para la absorción preferencial de un fármaco por el tejido pulmonar y conduce a una reducción preferencial de transcritos en el pulmón con relación al hígado.
- 45 13. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el suministro *in vivo* de ARNic o ADN de plásmido a un sujeto mamífero, en donde la formulación es para la administración al sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.

45

Figura 1

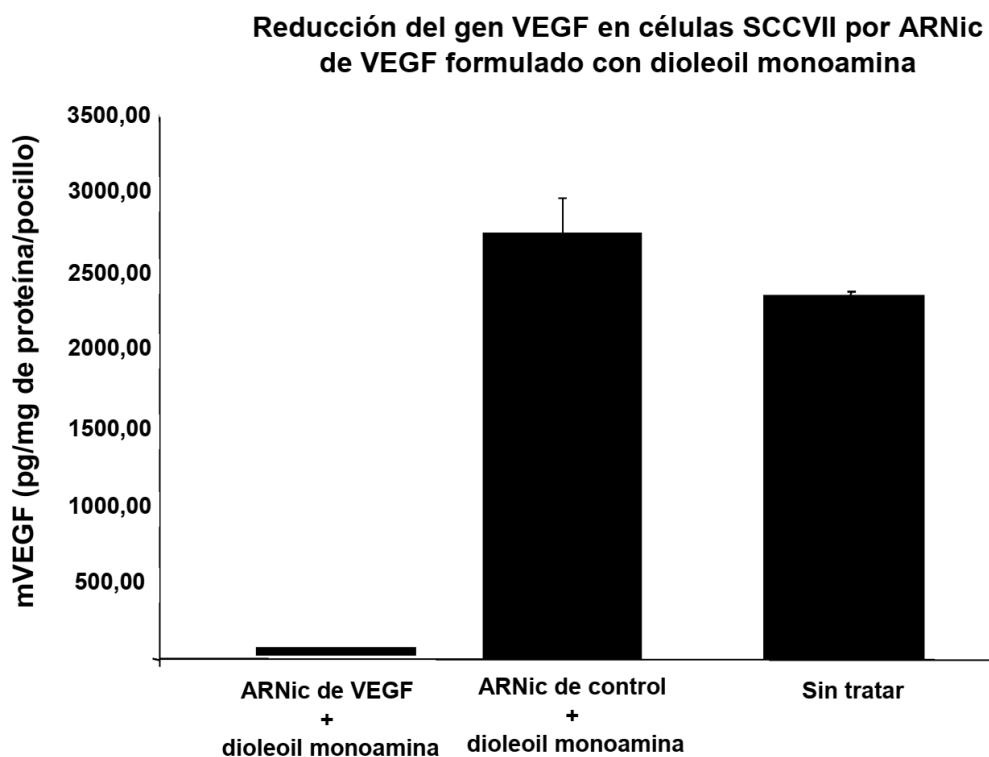


Figura 2

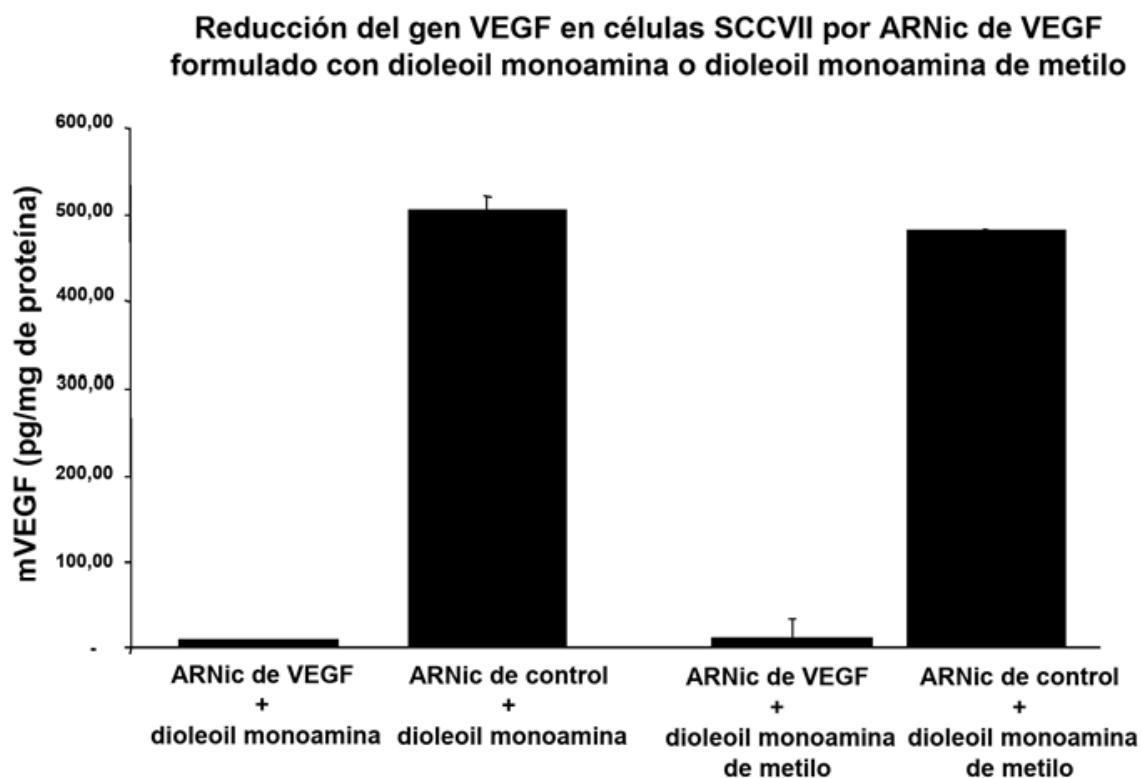
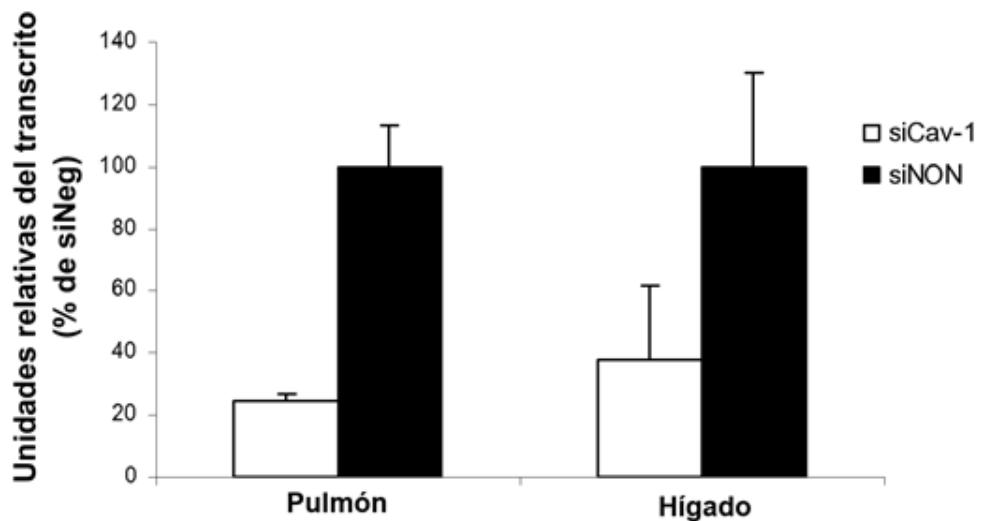


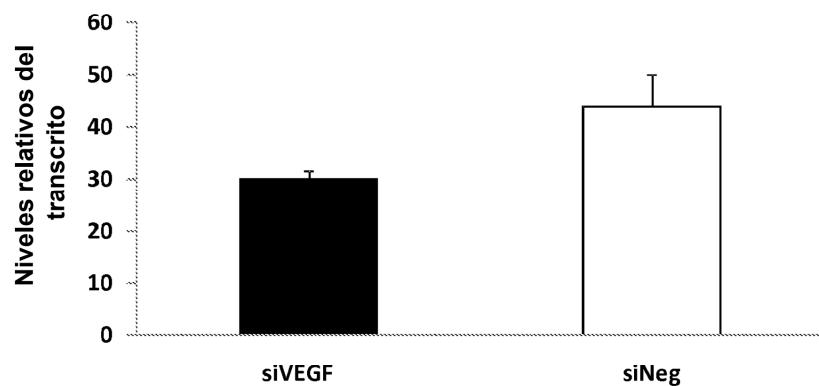
Figura 3

Niveles del transcripto de Caveolin-1 en pulmón e hígado

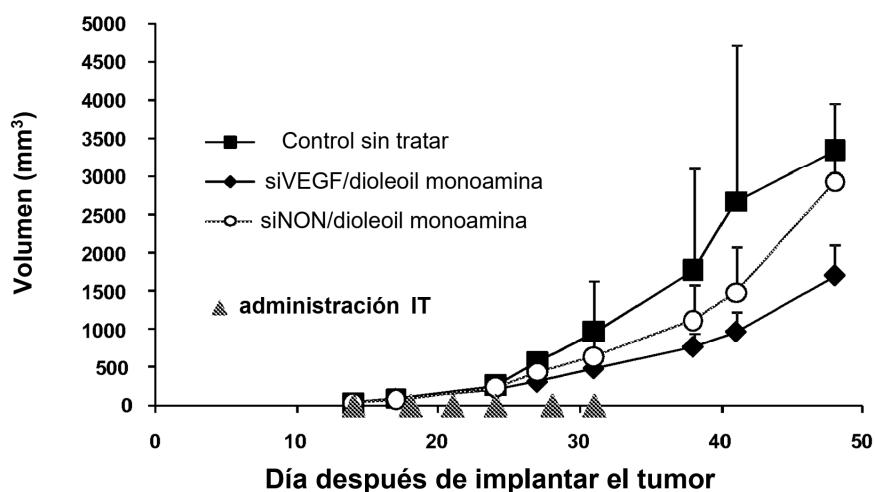


## Figura 4A y Figura 4B

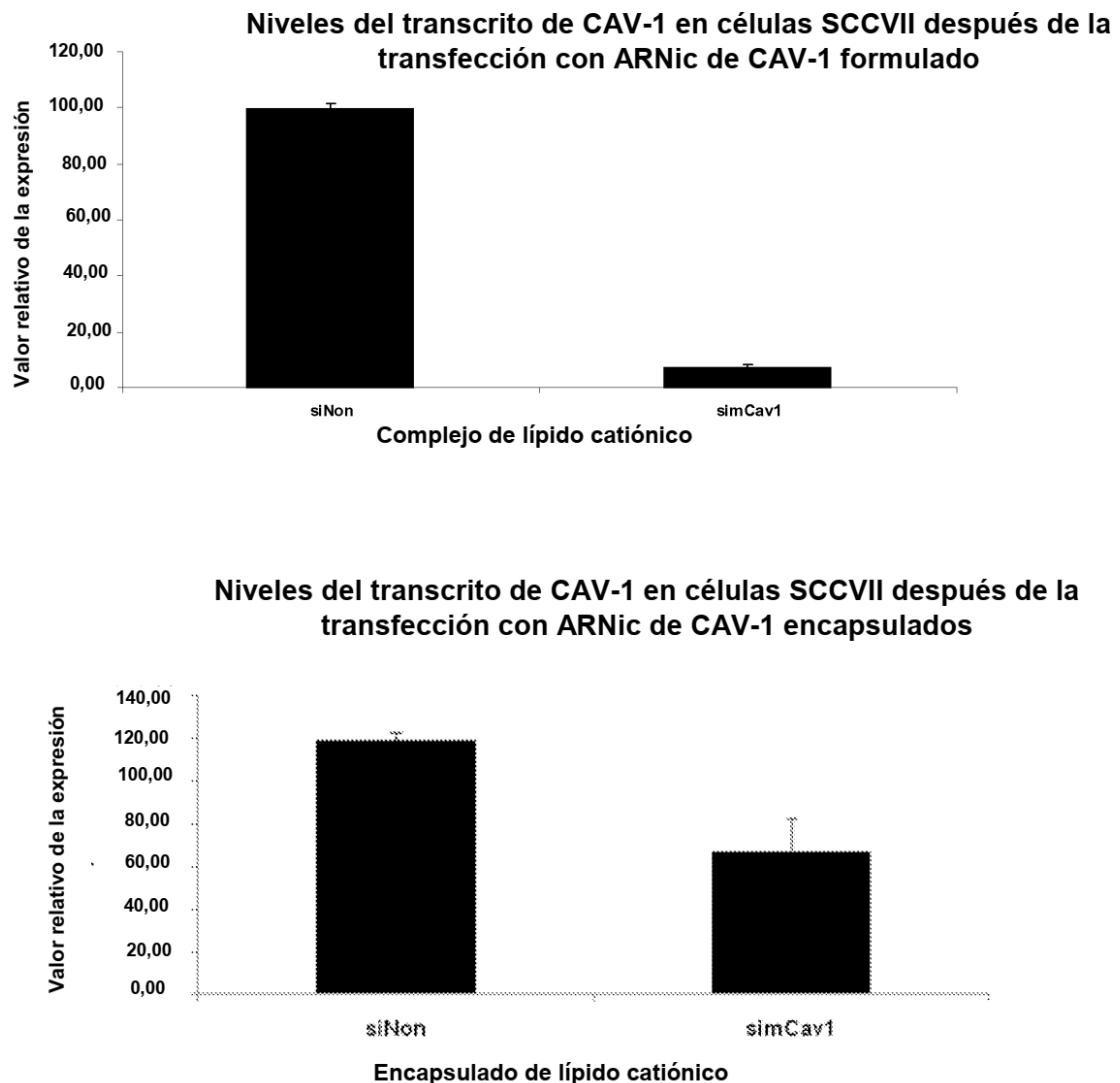
**Nivel de expresión de mVEGF en tumores SCCVII después de dos inyecciones IT con ARNic formulado con dioleoil monoamina**



**Volumen del tumor SCCVII después de la administración repetida de ARNic de VEGF formulado**



## Figura 5A y Figura 5B



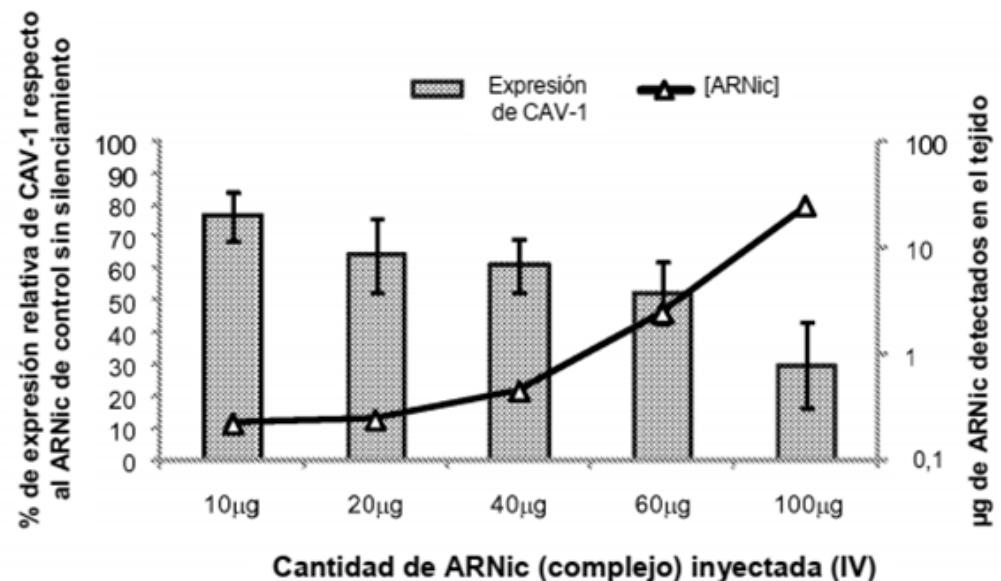
**Figura 6****Reducción de CAV-1 dependiente de la dosis y distribución de ARNic**

Figura 7

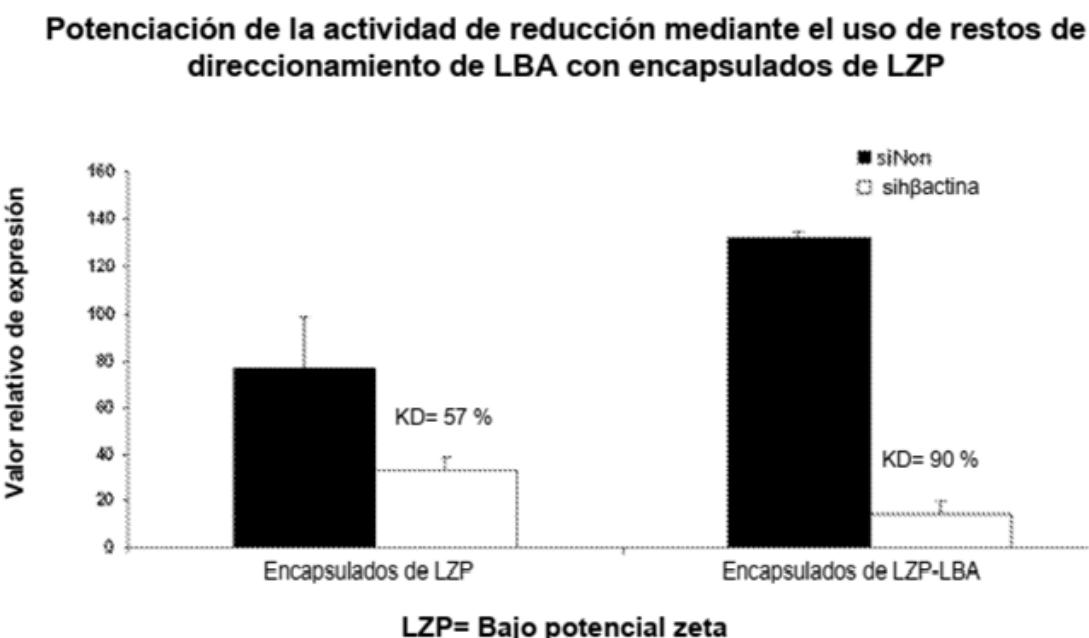


Figura 8

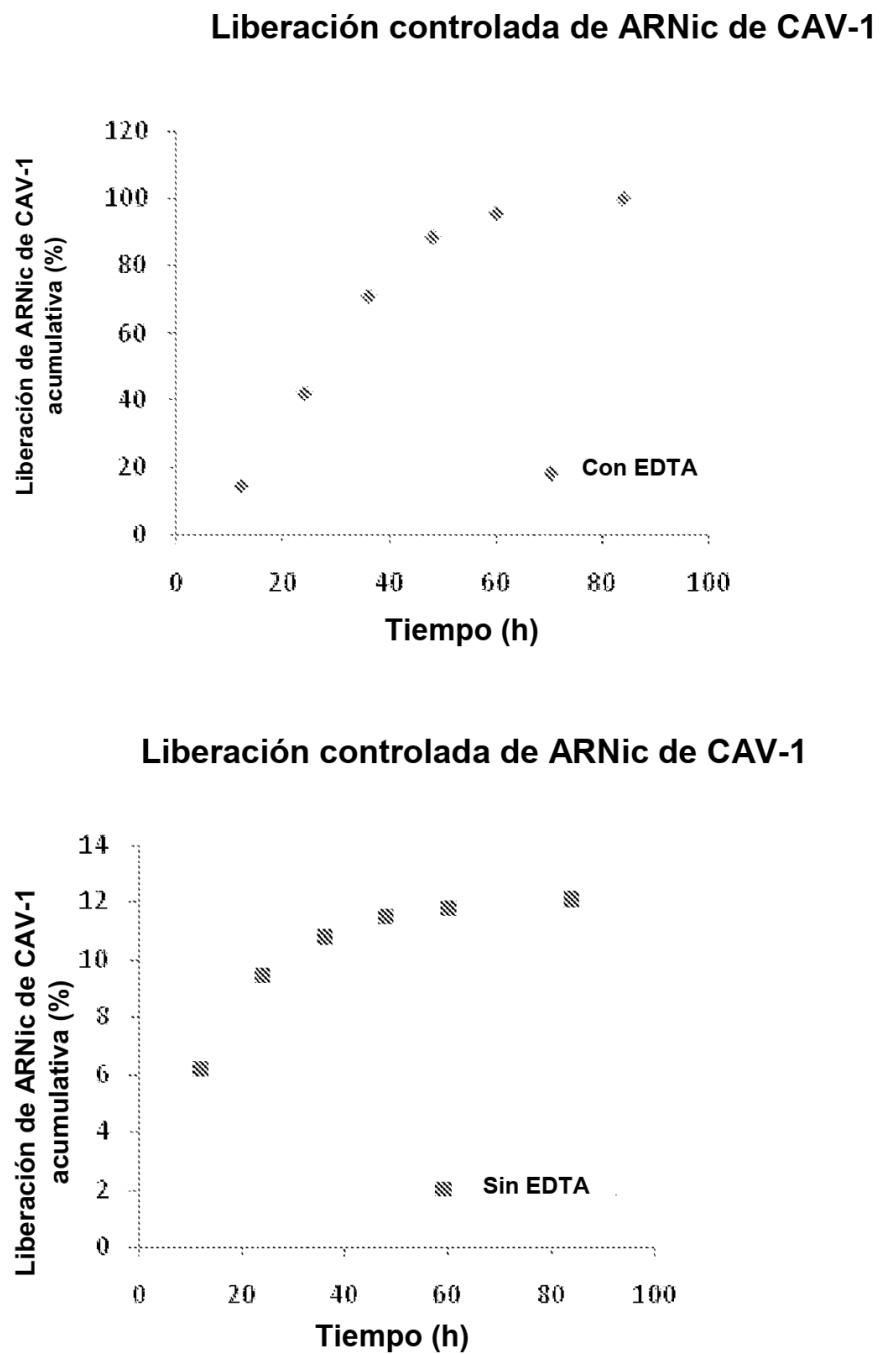
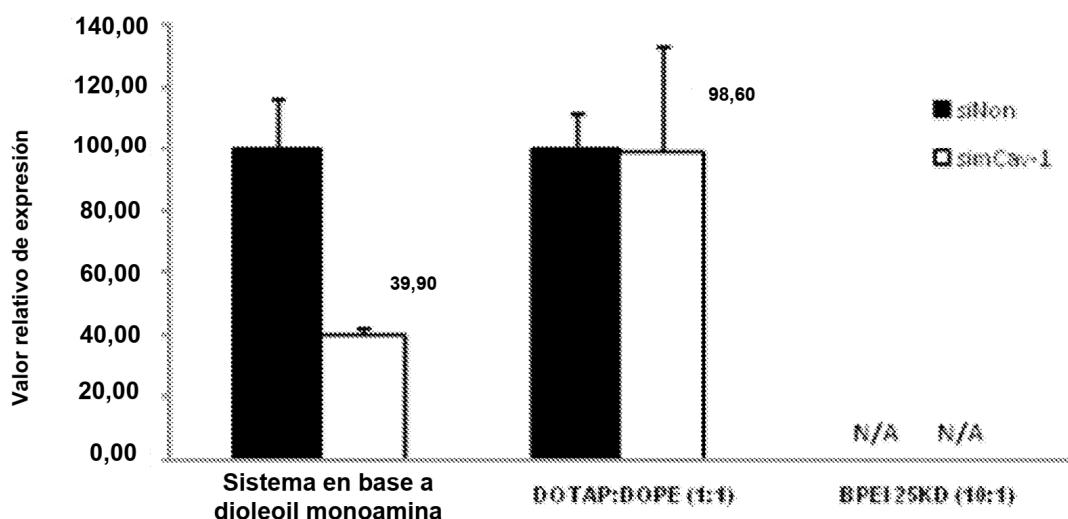


Figura 9

**Nivel de expresión de mCAV-1 en los pulmones después de la inyección IV de varias formulaciones de ARNic**



**Nivel de expresión de mCAV-1 en el hígado después de la inyección IV de varias formulaciones de ARNic**

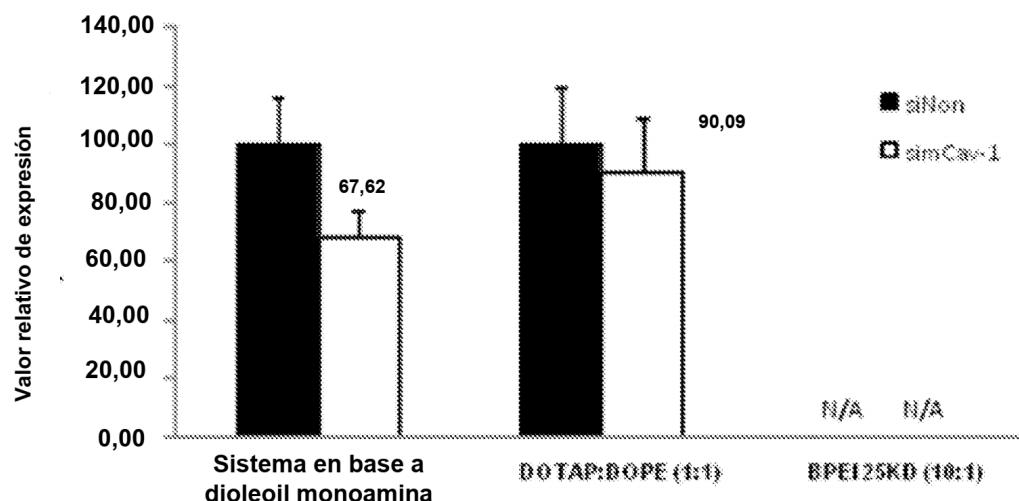


Figura 10

