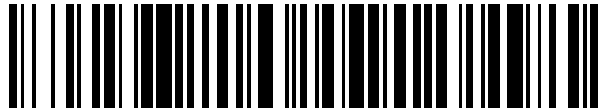


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 191**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016 PCT/US2016/043537**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17015552**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16828602 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3324932**

54 Título: **Composiciones y métodos para formas de liófilos de nanopartículas**

30 Prioridad:

22.07.2015 US 201562195356 P

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

07.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YING, WENBIN;
ADAMI, ROGER;
WANG, YUWEI;
YIN, HAIQING;
WANG, LIPING y
LIU, DONG**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 862 191 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

Composiciones y métodos para formas de liófilos de nanopartículas

5 Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere a los campos de productos biofarmacéuticos y terapéuticos que se componen de moléculas basadas en ácidos nucleicos. Más particularmente, esta invención se refiere a métodos y composiciones para formas de liófilos de composiciones terapéuticas de ácido nucleico.

10

Antecedentes de la invención

Los productos terapéuticos basados en compuestos de ácido nucleico incluyen diversas formas de ARN tales como ARNip, ARN antisentido, microARN, así como diversas formas de ADN y plásmidos, oligonucleótidos híbridos, y aptámeros, entre otros.

15

La transfección de productos terapéuticos de ácido nucleico y otros agentes se ha logrado encapsulando las moléculas activas en nanopartículas lipídicas. Los inconvenientes de esta metodología incluyen la incapacidad de almacenar las composiciones para su uso posterior debido a la degradación de las nanopartículas o su carga encapsulada. Por ejemplo, las composiciones de nanopartículas lipídicas que encapsulan moléculas de ARNip pueden ser estables durante sólo unos pocos minutos u horas a 25°C, y sólo unos pocos días o semanas a 4°C. Los inconvenientes adicionales incluyen la necesidad de almacenamiento a muy baja temperatura de las composiciones de nanopartículas lipídicas.

20

Una manera de proporcionar almacenamiento a largo plazo de una composición terapéutica es preparar una forma de liófilo, que puede almacenarse y reconstituirse para proporcionar una formulación para la administración del producto terapéutico.

25

El documento US2014/288160 A1 describe compuestos al parecer útiles como vehículos de administración liposómicos para facilitar la administración de polinucleótidos encapsulados a células diana y la transfección posterior de dichas células diana.

30

El documento US 2011/237686 A1 describe formulaciones líquidas y liofilizadas de materiales particulados pequeños, particularmente la producción y liofilización de nanopartículas, micropartículas, micelas y liposomas pegiladas para su uso y administración en/a un sujeto.

35

El documento US 2013/115274 A1 describe un método para preparar un liposoma que encapsula de manera eficaz un polímero terapéutico cargado negativamente, por ejemplo, ARNip. El procedimiento implica preparar una mezcla lipídica que comprende un lípido catiónico en un disolvente orgánico miscible en agua, tal como etanol, a una concentración de 2,3 mg/ml, y añadir esta disolución al polímero disuelto en agua hasta una concentración final del 35% de etanol en agua. La razón de carga final de fármaco:lípido es de 1:2,5. Las nanopartículas resultantes tienen un tamaño medio de 50 a 150 nm.

40

El documento US 2005/002998 A1 describe un método para preparar un complejo estable que se dirige a células que comprende un ligando y un liposoma catiónico que encapsula un agente terapéutico o de diagnóstico que comprende (a) combinar el complejo con una disolución que comprende una cantidad estabilizante de sacarosa y (b) liofilizar la disolución resultante para obtener una preparación liofilizada; en el que, tras la reconstitución, la preparación retiene al menos aproximadamente el 80% de su actividad preliofilización.

45

Sin embargo, no ha sido posible en general generar formas de liófilo de nanopartículas lipídicas que contienen agentes de ácido nucleico, de manera que la nanopartícula lipídica puede regenerarse con el agente de ácido nucleico encapsulado para formar una formulación estable. El procedimiento de liofilización puede destruir las nanopartículas y/o los agentes de ácido nucleico. Algunos métodos han implicado la unión de componentes o grupos protectores de manera química a las nanopartículas lipídicas, o al agente de ácido nucleico, lo que no es ventajoso. Otros métodos pueden usar liposomas como adyuvante, sin contemplar la encapsulación de los agentes de ácido nucleico.

50

Existe la necesidad continua de composiciones y métodos para proporcionar formas de liófilo de nanopartículas que pueden reconstituirse con propiedades favorables, incluyendo la actividad de transfección, tamaño de partícula, tiempo de almacenamiento y estabilidad en suero para administrar diversos agentes de ácido nucleico.

60

Lo que se necesita son composiciones y compuestos para formar disoluciones o suspensiones estables de nanopartículas lipídicas que puedan almacenarse en formas de liófilo sólido, en los que las nanopartículas encapsulan agentes de ácido nucleico.

Breve resumen

Esta invención proporciona métodos y composiciones para productos terapéuticos que se componen de moléculas basadas en ácidos nucleicos. Más particularmente, esta invención proporciona métodos y composiciones para formas de liófilo de composiciones terapéuticas basadas en ácidos nucleicos.

Esta invención proporciona además formas de liófilo de nanopartículas que pueden reconstituirse para dar composiciones terapéuticas eficaces, que pueden usarse para administrar agentes terapéuticos de ácido nucleico para transfección.

En algunos aspectos, esta invención proporciona composiciones y compuestos para formar disoluciones o suspensiones de nanopartículas lipídicas terapéuticas que son estables en procedimientos de liofilización. Las nanopartículas lipídicas terapéuticas pueden encapsular agentes de ácido nucleico, y pueden transformarse y almacenarse en formas de liófilo sólido. Las formas de liófilo pueden reconstituirse para proporcionar nanopartículas lipídicas terapéuticas con agentes de ácido nucleico encapsulados. Las nanopartículas lipídicas reconstituidas pueden tener propiedades de transfección sorprendentemente ventajosas, incluyendo el tamaño y distribución de partícula.

Las realizaciones de esta invención incluyen una gama de composiciones y compuestos para formar disoluciones o suspensiones de nanopartículas lipídicas terapéuticas que pueden someterse a un procedimiento de liofilización para proporcionar formas de liófilo sólido estables para el almacenamiento a largo plazo de un producto terapéutico de ácido nucleico.

Las realizaciones de esta invención incluyen las siguientes:

Una composición para elaborar un liófilo sólido de nanopartículas lipídicas que comprende uno o más agentes activos de ácido nucleico, comprendiendo la composición:

una suspensión acuosa de las nanopartículas lipídicas en una disolución farmacéuticamente aceptable, en la que las nanopartículas lipídicas encapsulan el uno o más agentes activos de ácido nucleico;

un compuesto de dextrina; y

un compuesto de azúcar sacárido, en la que la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar es de desde el 2% hasta el 20% (p/v) de la composición, y en la que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 70% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar.

La composición anterior, en la que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 55% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar.

La composición anterior, en la que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 45% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar.

La composición anterior, en la que tras la liofilización y reconstitución de la composición, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del 10% de su tamaño en la composición original.

La composición anterior, en la que tras la liofilización, almacenamiento y reconstitución de la composición, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del 10% de su tamaño en su composición original.

La composición anterior, en la que la composición liofilizada se almacena a 5°C durante al menos un mes.

La composición anterior, en la que la composición liofilizada se almacena a -20°C durante al menos un mes.

La composición anterior, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de desde 45 nm hasta 110 nm.

La composición anterior, en la que la concentración de los agentes activos de ácido nucleico es de desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml, o desde 3 mg/ml hasta 5 mg/ml.

La composición anterior, en la que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son moléculas de iARN capaces de mediar la interferencia de ARN. La composición anterior, en la que las moléculas de iARN son ARNip, ARNhc, ARNdA, ARNIP o ARNipar.

La composición anterior, en la que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son miARN, ARN antisentido, plásmidos, oligonucleótidos híbridos o aptámeros.

La composición anterior, en la que la disolución farmacéuticamente aceptable es un tampón HEPES, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón que contiene tris(hidroximetil)aminometano.

La composición anterior, en la que el compuesto de dextrina es una ciclodextrina.

- 5 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina tiene una o más de las posiciones hidroxilo 2, 3 y 6 sustituidas con grupos sulfoalquilo, bencenosulfoalquilo, acetoalquilo, hidroxialquilo, succinato de hidroxialquilo, malonato de hidroxialquilo, glutarato de hidroxialquilo, adipato de hidroxialquilo, hidroxialquilo, maleato de hidroxialquilo, oxalato de hidroxialquilo, fumarato de hidroxialquilo, citrato de hidroxialquilo, tartatro de hidroxialquilo, malato de hidroxialquilo o citraconato de hidroxialquilo.
- 10 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina es (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina, succinato de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, (2-hidroxiopropil)- γ -ciclodextrina o succinato de 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina.
- 15 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina es sulfobutil éter β -ciclodextrina o sulfobutil éter γ -ciclodextrina.
- La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina es metil- β -ciclodextrina o metil- γ -ciclodextrina.
- 20 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina se une a una cadena o red polimérica.
- 25 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina incluye un compuesto adsorbato.
- 30 La composición anterior, en la que el compuesto de ciclodextrina se selecciona de colesterol, lanosterol, zimosterol, zimostenol, desmosterol, estigmastanol, dihidrolanosterol, 7-deshidrocolesterol, colesterol pegilado, acetato de colesterilo, araquidonato de colesterilo, butirato de colesterilo, hexanoato de colesterilo, miristato de colesterilo, palmitato de colesterilo, behenato de colesterilo, estearato de colesterilo, caprilato de colesterilo, n-decanoato de colesterilo, dodecanoato de colesterilo, nervonato de colesterilo, pelargonato de colesterilo, n-valerato de colesterilo, oleato de colesterilo, elaidato de colesterilo, erucato de colesterilo, heptanoato de colesterilo, linolelaidato de colesterilo, linoleato de colesterilo, beta-sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-estigmasterol y delta-7-avenasterol.
- 35 La composición anterior, en la que el compuesto de azúcar sacárido es un compuesto de azúcar monosacárido o disacárido.
- La composición anterior, en la que el compuesto de azúcar se selecciona de sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, kojibiosa, sakebiosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, isomaltulosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, melibiulosa y xilobiosa.
- 40 Un procedimiento para elaborar un líofilo sólido de uno o más agentes activos de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento liofilizar una composición descrita anteriormente. Esta invención contempla además un líofilo sólido elaborado mediante el procedimiento anterior, así como un producto terminado elaborado reconstituyendo un líofilo sólido anterior.
- 45 Esta invención incluye además un procedimiento para elaborar un producto terminado de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento:
- 50 sintetizar nanopartículas lipídicas, en el que las nanopartículas lipídicas encapsulan uno o más agentes activos de ácido nucleico;
- proporcionar una suspensión acuosa de las nanopartículas lipídicas en una disolución farmacéuticamente aceptable;
- añadir un compuesto de dextrina a la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas;
- añadir un compuesto de azúcar sacárido a la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas;
- 55 liofilizar la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas, formando así un líofilo sólido;
- reconstituir el líofilo en un portador farmacéuticamente aceptable, formando así un producto terminado de ácido nucleico, en el que la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido es de desde el 2% hasta el 20% (p/v) de la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas, y en el que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 70% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido.
- 60 El procedimiento anterior, en el que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 55% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido.
- El procedimiento anterior, en el que el compuesto de dextrina es del 40% al 45% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido.
- 65 El procedimiento anterior, en el que tras la reconstitución, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del

- 10% de su tamaño cuando se sintetizaron.
- El procedimiento anterior, que comprende además almacenar el líófilo antes de la reconstitución.
- 5 El procedimiento anterior, en el que tras el almacenamiento y la reconstitución del líófilo, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del 10% de su tamaño cuando se sintetizaron.
- El procedimiento anterior, en el que el líófilo se almacena a 5°C durante al menos un mes.
- 10 El procedimiento anterior, en el que el líófilo se almacena a -20°C durante al menos un mes.
- El procedimiento anterior, en el que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de desde 45 nm hasta 110 nm.
- 15 El procedimiento anterior, en el que la concentración de los agentes activos de ácido nucleico es de desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml.
- El procedimiento anterior, en el que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son moléculas de iARN capaces de mediar la interferencia de ARN. El procedimiento anterior, en el que las moléculas de iARN son ARNip, ARNhc, ARNdA, ARNiP o ARNiPar.
- 20 El procedimiento anterior, en el que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son miARN, ARN antisentido, plásmidos, oligonucleótidos híbridos o aptámeros.
- 25 El procedimiento anterior, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es agua estéril, agua para inyección, solución salina normal estéril, agua bacteriostática para inyección o una disolución nebulizadora.
- El procedimiento anterior, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es una disolución farmacéuticamente aceptable.
- 30 El procedimiento anterior, en el que la disolución farmacéuticamente aceptable es un tampón HEPES, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón que contiene tris(hidroximetil)aminometano.
- El procedimiento anterior, en el que el compuesto de dextrina es una ciclodextrina.
- 35 El procedimiento anterior, en el que el compuesto de ciclodextrina tiene una o más de las posiciones hidroxilo 2, 3 y 6 sustituidas con grupos sulfoalquilo, bencenosulfoalquilo, acetoalquilo, hidroxialquilo, succinato de hidroxialquilo, malonato de hidroxialquilo, glutarato de hidroxialquilo, adipato de hidroxialquilo, hidroxialquilo, maleato de hidroxialquilo, oxalato de hidroxialquilo, fumarato de hidroxialquilo, citrato de hidroxialquilo, tartatro de hidroxialquilo, malato de hidroxialquilo o citraconato de hidroxialquilo.
- 40 El procedimiento anterior, en el que el compuesto de ciclodextrina es (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina, succinato de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, (2-hidroxipropil)-γ-ciclodextrina o succinato de 2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina.
- 45 El procedimiento anterior, en el que el compuesto de ciclodextrina es sulfobutil éter β-ciclodextrina o sulfobutil éter γ-ciclodextrina.
- El procedimiento anterior, en el que el compuesto de ciclodextrina es metil-β-ciclodextrina o metil-γ-ciclodextrina.
- 50 El procedimiento anterior, en el que el compuesto de ciclodextrina incluye un compuesto adsorbato.
- El procedimiento anterior, en el que el compuesto de azúcar sacárido es un compuesto de azúcar monosacárido o disacárido.
- 55 El procedimiento anterior, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es agua estéril, agua para inyección, solución salina normal estéril, agua bacteriostática para inyección o una disolución nebulizadora.
- El procedimiento anterior, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es una disolución farmacéuticamente aceptable.
- 60 El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico reconstituido tiene menos del 0,001% (p/v) de partículas agregadas con un tamaño mayor de 0,2 μm.
- El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico se reconstituye en un periodo de tiempo de 3 a 30 segundos.
- 65

El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico se reconstituye después de un periodo de tiempo de almacenamiento de seis meses y retiene el 80% de la actividad de los agentes de ácido nucleico.

5 El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico reconstituido tiene menos del 0,001% (p/v) de partículas agregadas con un tamaño mayor de 0,2 μm .

El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico reconstituido tiene activación reducida de citocina.

10 El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico se reconstituye en un periodo de tiempo de 3 a 30 segundos.

El procedimiento anterior, en el que el producto terminado de ácido nucleico se reconstituye después de un periodo de tiempo de almacenamiento de seis meses y retiene el 80% de la actividad de los agentes de ácido nucleico.

15 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: la figura 1 muestra los resultados experimentales para la potencia *in vivo* de un agente de ácido nucleico, que era un ARNip seleccionado como diana para suprimir Hsp47 (GP46), obtenido con un producto terminado final que era una disolución reconstituida de una formulación de nanopartículas liofilizada sólida del ARNip. Las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas se usaron en un modelo de rata con fibrosis hepática inducida por dimetilnitrosamina (DMN). Tal como se muestra en la figura 1, la formulación farmacológica de nanopartículas de ARNip reconstituida presentó una potencia profunda y sorprendente para el silenciamiento génico de Hsp47 (GP46) *in vivo*. La potencia *in vivo* es una prueba rigurosa para determinar la viabilidad de las nanopartículas liofilizadas reconstituidas que contienen un agente de ácido nucleico. La formulación de nanopartículas del ARNip que se liofilizó incluía un contenido de compuesto protector total del 10% (p/v), que estaba compuesto por el 40% (p/v) de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina y el 60% de sacarosa.

Figura 2: la figura 2 muestra los resultados experimentales para la farmacocinética de concentración en plasma *in vivo* de una formulación de nanopartículas de ARNip liofilizada reconstituida. Un ARNip dirigido contra Hsp47 (GP46) se formuló en nanopartículas liposomales. Las formulaciones de nanopartículas se liofilizaron con una composición protectora que contenía sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. La formulación de nanopartículas del ARNip que se liofilizó incluía un contenido de compuesto protector total del 12,5% (p/v), que estaba compuesto por el 40% (p/v) de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina y el 60% de sacarosa. Los perfiles de PK en plasma se evaluaron en ratas Sprague Dawley tras una administración intravenosa a un nivel de dosis única de la formulación liofilizada en comparación con una formulación congelada. Las concentraciones de ARNip en muestras de plasma se determinaron mediante un método de ELISA basado en hibridación. Tal como se muestra en la figura 2, la farmacocinética de concentración en plasma de la formulación farmacológica de ARNip liofilizada reconstituida fue esencialmente la misma que la de una formulación de control comparativa que sólo se había congelado.

40 **Descripción detallada de la invención**

Esta invención proporciona métodos y composiciones para productos terapéuticos que se componen de moléculas basadas en ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, esta invención proporciona métodos y composiciones para elaborar formas de liófilo de composiciones terapéuticas que contienen agentes de ácido nucleico.

En algunos aspectos, esta invención proporciona formas de liófilo de nanopartículas que pueden reconstituirse para dar composiciones terapéuticas eficaces. Las nanopartículas pueden encapsular agentes de ácido nucleico como carga. Las formas de liófilo de esta invención pueden usarse para recomponer y administrar formulaciones de nanopartículas que encapsulan agentes terapéuticos de ácido nucleico para transfección.

En aspectos adicionales, esta invención proporciona compuestos y métodos para formar disoluciones o suspensiones de nanopartículas lipídicas terapéuticas que son estable en procedimientos de liofilización. Los procedimientos de liofilización de esta invención pueden proporcionar formas de liófilo estables de nanopartículas lipídicas terapéuticas, en los que las nanopartículas pueden encapsular agentes de ácido nucleico. Las formas de liófilo pueden almacenarse durante un periodo de tiempo, y reconstituirse para proporcionar nanopartículas lipídicas terapéuticas con agentes de ácido nucleico encapsulados.

En algunas realizaciones, esta invención incluye una gama de composiciones y compuestos para disoluciones o suspensiones de nanopartículas lipídicas que pueden someterse a un procedimiento de liofilización para proporcionar formas de liófilo sólido estables para almacenamiento a largo plazo de un producto terapéutico de ácido nucleico. Las composiciones y procedimientos de esta invención pueden proporcionar formas de liófilo que pueden reconstituirse y proporcionar actividad, tamaño de partícula, tiempo de almacenamiento y estabilidad en suero ventajosos.

65 En aspectos adicionales, esta invención se refiere a compuestos, composiciones y métodos para proporcionar nanopartículas para administrar y distribuir agentes activos o compuestos farmacológicos a sujetos, tejidos y órganos.

Esta invención proporciona una gama de compuestos lipídicos y compuestos ionizables para administrar agentes activos a células. Los compuestos lipídicos y compuestos ionizables de esta divulgación pueden usarse para formar nanopartículas para administrar y distribuir agentes activos.

5 Esta invención contempla formulaciones farmacológicas de nanopartículas lipídicas que contienen, por ejemplo, agentes de ARNip, que pueden prepararse mediante la liofilización de una suspensión de las nanopartículas, y la reconstitución de las nanopartículas para dar una suspensión.

10 En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas pueden sintetizarse mediante la inyección de alta velocidad de una disolución de lípidos/etanol en una disolución tampón de ARNip. Un segundo tampón puede someterse a diafiltración y usarse como tampón externo a través de cartuchos de TFF para elaborar una suspensión acuosa de producto final.

15 En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden tener un diámetro promedio de desde 45 nm hasta 110 nm. La concentración de los agentes activos de ácido nucleico puede ser de desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml.

Se encontró sorprendentemente que las nanopartículas lipídicas pueden soportar la liofilización de la suspensión, cuando la suspensión se realiza en una composición protegida.

20 A reserva de las reivindicaciones adjuntas, una composición protegida de esta invención puede estar compuesta por una suspensión acuosa de las nanopartículas lipídicas en una disolución farmacéuticamente aceptable, un compuesto de dextrina y un compuesto de azúcar sacárido. Las nanopartículas lipídicas encapsulan uno o más agentes activos de ácido nucleico.

25 La liofilización de la suspensión protegida puede proporcionar un producto de líofilo sólido que puede reconstituirse para dar una suspensión de nanopartículas lipídicas.

30 La suspensión reconstituida puede contener nanopartículas lipídicas que encapsulan el agente activo y son comparables a las nanopartículas lipídicas antes de la liofilización.

En determinadas realizaciones, la suspensión reconstituida puede proporcionar actividad del agente encapsulado, que es comparable a la de la suspensión antes de la liofilización.

35 En aspectos adicionales, la suspensión reconstituida puede proporcionar nanopartículas estables comparables a las de la suspensión antes de la liofilización. En determinados aspectos, el tamaño de partícula promedio de las nanopartículas puede ser casi igual al tamaño de las nanopartículas en la suspensión antes de la liofilización.

40 Las composiciones y procedimientos de esta invención pueden proporcionar una actividad y estabilidad sorprendentes de una suspensión reconstituida que se compone de nanopartículas que tienen un agente encapsulado.

45 La suspensión protegida, que puede liofilizarse y reconstituirse, contiene una composición protectora para la liofilización. Una composición protectora de esta invención se compone de un compuesto de dextrina y un compuesto de azúcar sacárido. La cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar es de desde el 2% hasta el 20% (p/v) de la suspensión protegida.

50 El compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 70% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar en la composición protectora. En determinadas realizaciones, el compuesto de dextrina puede ser de desde el 40% hasta el 55% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar en la composición protectora. En realizaciones adicionales, el compuesto de dextrina puede ser de desde el 40% hasta el 45% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar en la composición protectora. Estas composiciones pueden proporcionar de manera inesperada propiedades ventajosas de una suspensión de nanopartículas reconstituida, por ejemplo, un cambio insignificante del tamaño o la actividad de las nanopartículas.

55 En algunos aspectos, tras la liofilización y reconstitución de una suspensión protegida de nanopartículas, el tamaño promedio de las nanopartículas puede estar dentro del 10% de su tamaño en la composición original, antes de la liofilización. En determinados aspectos, tras la liofilización y reconstitución de una suspensión protegida de nanopartículas, el tamaño promedio de las nanopartículas puede estar dentro del 5% de su tamaño en la composición original, antes de la liofilización.

60 Esta invención contempla formulaciones farmacológicas de nanopartículas lipídicas que contienen, por ejemplo, agentes de ARNip, que pueden prepararse mediante la liofilización de una suspensión de las nanopartículas, y la reconstitución de las nanopartículas para dar una suspensión después de un periodo de almacenamiento. La suspensión reconstituida puede proporcionar una actividad del agente encapsulado, que es comparable a la de la suspensión antes de la liofilización.

65

La suspensión reconstituida, preparada después de un periodo de almacenamiento, puede contener nanopartículas lipídicas que encapsulan el agente activo y son comparables a las nanopartículas lipídicas antes de la liofilización.

5 En determinadas realizaciones, la suspensión reconstituida, preparada después de un periodo de almacenamiento, puede proporcionar una actividad del agente encapsulado que es comparable con la de la suspensión antes de la liofilización.

10 En aspectos adicionales, la suspensión reconstituida, preparada después de un periodo de almacenamiento, puede proporcionar nanopartículas estables comparables a las de la suspensión antes de la liofilización. En determinados aspectos, el tamaño de partícula promedio de las nanopartículas puede ser casi igual al tamaño de las nanopartículas en la suspensión antes de la liofilización.

15 En algunas realizaciones, la composición liofilizada puede almacenarse a 5°C durante al menos un mes. En realizaciones adicionales, la composición liofilizada puede almacenarse a -20°C durante al menos un mes.

Agentes activos

20 Las composiciones y métodos de esta invención pueden usarse para distribuir agentes para suprimir la expresión génica. Los ejemplos de un agente para suprimir la expresión génica incluyen moléculas de ácido nucleico inhibitoras, que incluyen ribozimas, ácidos nucleicos antisentido y moléculas de interferencia de ARN (moléculas de iARN).

25 Las composiciones terapéuticas de esta invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico inhibitoras. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico capaces de mediar la interferencia de ARN incluyen moléculas activas en interferencia de ARN (moléculas de iARN), incluyendo un ARN dúplex tal como un ARNip (ARN de interferencia pequeño), miARN (micro ARN), ARNhc (ARN en horquilla corto), ARNdA (ARN dirigido a ADN), ARNiP (ARN de interacción con Piwi) o ARNipar (ARN asociado con repetición) y formas modificadas de los mismos.

30 Los ejemplos de productos terapéuticos activos de esta invención incluyen ADN, plásmidos, oligonucleótidos híbridos o aptámeros.

35 La concentración de las moléculas activas de ácido nucleico en una formulación preliofilización de esta divulgación puede ser de desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de las moléculas activas de ácido nucleico en la formulación de esta divulgación puede ser de desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, o desde 2 mg/ml hasta 4 mg/ml.

Formulaciones de nanopartículas lipídicas preliofilización

40 Las realizaciones de esta invención pueden proporcionar composiciones de nanopartículas lipídicas, composiciones que contienen un compuesto protector para un procedimiento de liofilización.

Las nanopartículas lipídicas pueden tener cualquier composición conocida en la técnica. Las nanopartículas lipídicas pueden sintetizarse y cargarse con una carga encapsulada mediante cualquier procedimiento, incluyendo procedimientos conocidos en la técnica.

45 En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas pueden prepararse mediante un procedimiento de inyección por inmersión. Algunos ejemplos de procedimientos para nanopartículas lipídicas se proporcionan en el documento US 2013/0115274.

50 Algunos ejemplos para preparar liposomas se proporcionan en Szoka, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980); Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983, capítulo I.

55 En general, las nanopartículas lipídicas pueden sintetizarse mezclando los componentes lipídicos en un disolvente orgánico con una disolución tampón acuosa que contiene agente activos de ácido nucleico. Los liposomas pueden clasificarse por tamaño mediante filtración o extrusión. La suspensión o disolución de liposomas puede transformarse además mediante diafiltración.

60 Una composición de nanopartículas lipídicas de esta invención, que se estabiliza para un procedimiento de liofilización, puede contener nanopartículas lipídicas que encapsulan uno o más agentes activos, tales como agentes de ácido nucleico, en una suspensión. La suspensión puede ser acuosa, y puede contener un disolvente miscible en agua, tal como etanol. La composición, que se estabiliza para un procedimiento de liofilización, puede contener además compuestos protectores para estabilizar los liposomas en el procedimiento de liofilización.

65 El tamaño promedio de las nanopartículas lipídicas tal como se sintetizan puede ser de desde 40 nm hasta 120 nm, o desde 45 nm hasta 110 nm, o desde 85 nm hasta 105 nm.

La concentración del agente activo en una composición de nanopartículas lipídicas de esta invención puede oscilar

desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo en una composición de nanopartículas lipídicas de esta invención puede ser de desde 0.5 mg/ml hasta 8 mg/ml, o desde 1 mg/ml hasta 6 mg/ml, o desde 2 mg/ml hasta 5 mg/ml o desde 3 mg/ml hasta 4 mg/ml.

5 Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen maltodextrinas, y beta-ciclodextrinas y gamma-ciclodextrinas.

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen compuestos metilados de beta-ciclodextrinas y gamma-ciclodextrinas, y compuestos de sulfoalquil éter beta-ciclodextrinas y gamma-ciclodextrinas.

10 Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen compuestos de ciclodextrina que tienen una o más de las posiciones hidroxilo 2, 3 y 6 sustituidas con grupos sulfoalquilo, bencenosulfoalquilo, acetoalquilo, hidroxialquilo, succinato de hidroxialquilo, malonato de hidroxialquilo, glutarato de hidroxialquilo, adipato de hidroxialquilo, hidroxialquilo, maleato de hidroxialquilo, oxalato de hidroxialquilo, fumarato de hidroxialquilo, citrato de hidroxialquilo, tartatro de hidroxialquilo, malato de hidroxialquilo o citraconato de hidroxialquilo.

15 Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina, succinato de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, (2-hidroxipropil)-γ-ciclodextrina y succinato de 2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina.

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen hidroxietil-β-ciclodextrina.

20

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen dimetil-β-ciclodextrina y trimetil-β-ciclodextrina.

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen sulfobutil éter β-ciclodextrina y sulfobutil éter γ-ciclodextrina.

25 Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen metil-β-ciclodextrina y metil-γ-ciclodextrina.

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen hidroxipropil-sulfobutil-β-ciclodextrina.

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen ciclodextrina H107 SIGMA (Sigma-Aldrich Corp.).

30

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen ciclodextrinas CAVAMAX, CAVASOL y CAVATRON (Ashland Inc.).

Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen ciclodextrinas KLEPTOSE y CRYSMEB (Roquette America Inc.).

35 Los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen ciclodextrinas CAPTISOL (Ligand Pharmaceuticals, Inc.).

En algunas realizaciones, los ejemplos de compuestos de dextrina incluyen compuestos de dextrina unidos a una cadena o red polimérica. Por ejemplo, las moléculas de ciclodextrina pueden unirse a polímeros de poli(ácido acrílico). En realizaciones adicionales, las moléculas de ciclodextrina pueden unirse junto con compuestos de reticulación tales como grupos acrilóilo. En determinadas realizaciones, pueden usarse formas de hidrogel de acrilato de vinilo con compuestos de ciclodextrina unidos.

40

En algunos aspectos, un compuesto de dextrina que va a usarse en una composición de nanopartículas lipídicas de esta invención puede combinarse con un compuesto adsorbato antes de introducirse en la composición de nanopartículas lipídicas. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, la preadsorción de un compuesto de esteroide por el compuesto de dextrina puede formar un complejo de inclusión que puede impedir una pérdida de actividad del agente activo en el producto terminado reconstituido.

45

Los ejemplos de compuestos adsorbato incluyen colesterol, lanosterol, zimosterol, zimostenol, desmosterol, estigmastanol, dihidrolanosterol, 7-deshidrocolesterol.

50

Los ejemplos de compuestos adsorbato incluyen colesteroles pegilados y compuestos de colestano-3-oxo-acilo (C1-22), por ejemplo, acetato de colesteroide, araquidonato de colesteroide, butirato de colesteroide, hexanoato de colesteroide, miristato de colesteroide, palmitato de colesteroide, behenato de colesteroide, estearato de colesteroide, caprilato de colesteroide, n-decanoato de colesteroide, dodecanoato de colesteroide, nervonato de colesteroide, pelargonato de colesteroide, n-valerato de colesteroide, oleato de colesteroide, elaidato de colesteroide, erucato de colesteroide, heptanoato de colesteroide, linoleilaidato de colesteroide y linoleato de colesteroide.

55

Los ejemplos de compuestos adsorbato incluyen fitoesteroides, beta-sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-estigmasterol y delta-7-avenasterol.

60

Los ejemplos de compuestos de azúcar protectores incluyen monosacáridos tales como aldosas C(5-6) y cetosas, así como disacáridos tales como sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, kojibiosa, sakebiosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, isomaltulosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, melibiulosa y xilobiosa.

65

Los ejemplos de compuestos de sacárido protectores incluyen polisacáridos tales como ficol.

5 La concentración de compuestos protectores en la formulación preliofilización es de desde el 2% (p/v) hasta el 20% (p/v), o desde el 4% (p/v) hasta el 16% (p/v), o desde el 5% (p/v) hasta el 15% (p/v), o desde el 6% (p/v) hasta el 14% (p/v), o desde el 8% (p/v) hasta el 12% (p/v).

10 En determinadas realizaciones, la concentración de compuestos protectores en la formulación preliofilización puede ser del 6% (p/v), o el 8% (p/v), o el 10% (p/v), o el 12% (p/v), o el 14% (p/v), o el 16% (p/v), o el 18% (p/v), o el 20% (p/v), o el 22% (p/v), o el 24% (p/v).

Procedimientos de liofilización

15 Los procedimientos de liofilización pueden llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado, tal como recipientes de vidrio, o, por ejemplo, viales de vidrio o recipientes de doble cámara, tal como se conocen en las técnicas farmacéuticas.

20 Una composición de nanopartículas lipídicas estabilizada de esta invención que contiene un compuesto protector puede introducir en el recipiente de vidrio. El volumen de la composición añadido al recipiente puede ser desde 0,1 hasta 20 ml, o desde 1 hasta 10 ml.

Puede usarse cualquier procedimiento de liofilización, incluyendo los conocidos en las técnicas farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1990).

25 El procedimiento de liofilización puede incluir congelar la composición de nanopartículas lipídicas estabilizada por compuesto protector a una temperatura de desde aproximadamente -40°C hasta aproximadamente -30°C. La composición congelada puede secarse a partir de una composición liofilizada.

30 En algunas realizaciones, la etapa de congelación puede variar en rampa la temperatura desde ambiental hasta la temperatura final a lo largo de varios minutos. La rampa de temperatura puede ser de aproximadamente 1°C/minuto.

35 En algunas realizaciones, la etapa de secado puede realizarse a una presión de aproximadamente 0-250 mTorr, o 50-150 mTorr, a una temperatura de desde aproximadamente -15°C hasta aproximadamente -38°C. La etapa de secado puede continuarse a una temperatura mayor, hasta temperatura ambiental, a lo largo de un periodo de hasta varios días. El nivel de agua residual en el liófilo sólido puede ser de menos de aproximadamente el 5%, o menos del 4%, o menos del 3%, o menos del 2% o menos del 1% (p/v).

40 Las composiciones de nanopartículas lipídicas estabilizadas por compuesto protector de esta invención pueden reconstituirse, después de la liofilización, mediante métodos conocidos en las técnicas farmacéuticas.

En algunos aspectos, esta invención proporciona métodos para inhibir el nivel de partículas agregadas en un producto terminado reconstituido, elaborado a partir de una composición de nanopartículas lipídicas estabilizada por compuesto protector de esta invención después de la liofilización.

45 En algunas realizaciones, el producto terminado reconstituido, elaborado a partir de una composición de nanopartículas lipídicas estabilizada por compuesto protector de esta invención puede tener niveles reducidos de partículas agregadas después de la liofilización.

50 En determinadas realizaciones, el producto terminado reconstituido, elaborado a partir de una composición de nanopartículas lipídicas estabilizada por compuesto protector de esta invención puede tener niveles reducidos de partículas agregadas con un tamaño mayor de aproximadamente 0,2 µm, o mayor de aproximadamente 0,5 µm, o mayor de aproximadamente 1 µm, después de la liofilización.

Producto terminado reconstituido

55 El liófilo puede reconstituirse en un portador farmacéuticamente aceptable.

60 Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen agua estéril, agua para inyección, solución salina normal estéril, agua bacteriostática para inyección y una disolución nebulizadora.

Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen una disolución farmacéuticamente aceptable.

65 Los ejemplos de una disolución farmacéuticamente aceptable incluyen tampón HEPES, tampones fosfato, tampones citratos y un tampón que contiene tris(hidroximetil)aminometano.

Los ejemplos de disoluciones farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones de tampón farmacéuticamente

aceptables.

Los ejemplos de una disolución farmacéuticamente aceptable incluyen disoluciones tampón de ácido maleico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético, bicarbonato de sodio y glicina.

5 El liófilo reconstituido puede usarse como producto terminado.

El liófilo reconstituido puede diluirse adicionalmente con solución salina isotónica u otros excipientes para proporcionar una concentración predeterminada para la administración.

10 Los ejemplos de excipientes incluyen tonicificadores.

Los ejemplos de excipientes incluyen estabilizadores tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, α -caseína, globulinas, α -lactalbúmina, LDH, lisozima, mioglobina, ovalbúmina y ARNasa A.

15 Los ejemplos de excipientes incluyen tampones tales como acetato de potasio, acetato de sodio y bicarbonato de sodio.

20 Los ejemplos de excipientes incluyen aminoácidos tales como glicina, alaninas, arginina, betaína, leucina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina, 4-hidroxiprolina, sarcosina, ácido γ -aminobutírico, alanopina, octopina, estrombina y N-óxido de trimetilamina.

Los ejemplos de excipientes incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero 407.

25 Los ejemplos de excipientes incluyen agentes de dispersión tales como fosfotidilcolina, etanolamina, triptofanato de acetilo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, etilenglicol, glicerina, glicerol, propilenglicol, sorbitol, xilitol, dextrano y gelatina.

30 Los ejemplos de excipientes incluyen antioxidantes tales como ácido ascórbico, cisteína, tioglicerol, ácido tioglicólico, tiosorbitol y glutatión.

Los ejemplos de excipientes incluyen agentes reductores tales como ditiotreititol, tioles y tiofenos.

35 Los ejemplos de excipientes incluyen agentes quelantes tales como EDTA, EGTA, ácido glutámico y ácido aspártico.

En algunas realizaciones, el liófilo puede reconstituirse usando una aguja de jeringa a través de un vial con tapón. El liófilo puede reconstituirse con o sin agitación del vial.

40 El tiempo para la reconstitución puede ser de desde 3 hasta 30 segundos, o más largo.

En algunas realizaciones, el producto terminado de ácido nucleico reconstituido puede tener menos del 0,001% (p/v) de partículas agregadas con un tamaño mayor de 0,2 μ m.

45 En determinados aspectos, el producto terminado de ácido nucleico reconstituido puede tener activación reducida de citocina.

En aspectos adicionales, el producto terminado de ácido nucleico puede reconstituirse después de un periodo de tiempo de almacenamiento de seis meses y retiene el 80% de actividad de los agentes de ácido nucleico.

50 En algunas realizaciones, el producto terminado de ácido nucleico puede reconstituirse después de un periodo de tiempo de almacenamiento de seis meses y el tamaño de partícula promedio de las nanopartículas lipídicas puede ser menos del 25% mayor que antes de la liofilización.

55 En determinadas realizaciones, el producto terminado de ácido nucleico puede reconstituirse después de un periodo de tiempo de almacenamiento de 24 meses y retener el 90% de actividad de los agentes de ácido nucleico.

60 En realizaciones adicionales, el producto terminado de ácido nucleico puede reconstituirse después de un periodo de tiempo de almacenamiento de 24 meses y el tamaño de partícula promedio de las nanopartículas lipídicas puede ser menos del 25% mayor que antes de la liofilización.

Moléculas de iARN

65 La cantidad del componente que induce interferencia de ARN activa formulado en la composición de la presente invención puede ser una cantidad que no provoca un efecto adverso que exceda el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, o una prueba

en un animal o mamífero de modelo tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, etc., y tales métodos de prueba son conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de esta invención pueden ser aplicables a cualquier animal, incluyendo humanos.

- 5 La cantidad de principio activo formulado puede variar según la manera en la que se administra el agente o la composición. Por ejemplo, cuando se usa una pluralidad de unidades de la composición para una administración, la cantidad de principio activo que va a formularse en una unidad de la composición puede determinarse dividiendo la cantidad de principio activo necesaria para una administración entre dicha pluralidad de unidades.
- 10 Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención pueden proporcionarse o administrarse a una célula, tejido, órgano o sujeto mediante aplicación directa de las moléculas en formulaciones de liposomas para ayudar, promover o facilitar la entrada en una célula.
- 15 Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención pueden complejarse con lípidos catiónicos, envasarse dentro liposomas y administrarse a células o tejidos diana. El ácido nucleico o complejos de ácido nucleico pueden administrarse *ex vivo* de manera local a tejidos relevantes o *in vivo* a través de aplicación dérmica, aplicación transdérmica o inyección directas.
- 20 Una composición o molécula de ácido nucleico inhibidora de esta invención puede administrarse en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional puede emplearse para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar los compuestos a pacientes que padecen una enfermedad. Puede emplearse cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intratumoral, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intrahepática, intracapsular, intratecal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, por aerosol, por supositorio o administración oral.
- 25 Las composiciones y métodos de esta divulgación pueden incluir un vector de expresión que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una molécula de iARN de esta invención de una manera que permita la expresión de la molécula de ácido nucleico.
- 30 Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención pueden expresarse a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales.
- 35 Por ejemplo, el vector puede contener secuencias que codifican para ambas cadenas de una molécula de iARN de un dúplex, o una única molécula de ácido nucleico que es autocomplementaria y, por tanto, forma una molécula de iARN. Un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica para dos o más moléculas de ácido nucleico.
- 40 Una molécula de ácido nucleico puede expresarse dentro de células a partir de promotores eucariotas. Los expertos en la técnica comprenden que cualquier ácido nucleico puede expresarse en células eucariotas a partir del vector de ADN/ARN apropiado.
- 45 Las formulaciones lipídicas pueden administrarse a animales mediante inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, o por vía oral o mediante inhalación u otros métodos tal como se conocen en la técnica.
- Se conocen y pueden usarse las formulaciones farmacéuticamente aceptables para administrar oligonucleótidos.
- 50 En una realización del método anterior, la molécula de ácido nucleico inhibidora se administra a una dosificación de aproximadamente 5 a 500 mg/m²/día, por ejemplo, 5, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 ó 300 mg/m²/día.
- En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico inhibidoras de esta invención se administran de manera sistémica en dosificaciones de desde aproximadamente 1 hasta 100 mg/kg, por ejemplo, 1, 5, 10, 20, 25, 50, 75 ó 100 mg/kg.
- 55 En realizaciones adicionales, la dosificación puede oscilar desde aproximadamente 25 hasta 500 mg/m²/día.
- Métodos conocidos en la técnica para elaborar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa., 2000.
- 60 Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Pueden usarse polímero de lactida, copolímero de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno biodegradables y biocompatibles para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para las moléculas de ácido nucleico inhibidoras incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser disoluciones acuosas que contienen,
- 65

por ejemplo, polioxietilen-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser disoluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

5 Las formulaciones pueden administrarse a pacientes humanos en cantidades terapéuticamente eficaces (por ejemplo, cantidades que previenen, eliminan o reducen un estado patológico) para proporcionar terapia para una enfermedad o afección neoplásica. La dosificación preferida de un oligómero de nucleótido de la invención puede depender de tales variables como el tipo y grado del trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la formulación de los excipientes del compuesto, y su vía de administración.

10 Ejemplos de composiciones lipídicas

En determinadas realizaciones, los cuatro componentes de tipo lípido, es decir una o más moléculas de lípido ionizables, un lípido estructural, uno o más lípidos estabilizadores, y uno o más lípidos para reducir la inmunogenicidad de la composición, pueden ser el 100% de los componentes lipídicos de la composición.

15

En la tabla 1 se muestran ejemplos de composiciones de nanopartículas lipídicas.

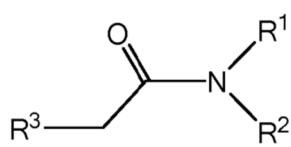
Tabla 1: composiciones de componentes lipídicos (cada uno en % en moles del total)

Ionizable	Catiónico	Estructural	Estabilizador	Reduce la inmun.
17	0	35	40	8
20	0	35	40	5
25	0	35	39	1
25	0	35	35	5
25	0	30	40	5
25	0	40	30	5
30	0	25	40	5
35	0	25	35	5
40	0	30	25	5
25	5	30	35	5
25	10	30	30	5
25	15	25	30	5

20

Moléculas de tipo lípido ionizables

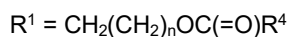
Los ejemplos de una molécula ionizable incluyen los compuestos que tienen la estructura mostrada en la fórmula I



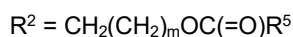
Fórmula I

25

en la que R¹ y R² son



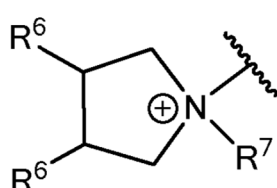
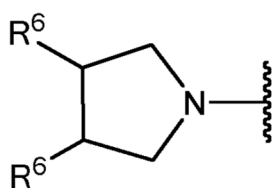
30

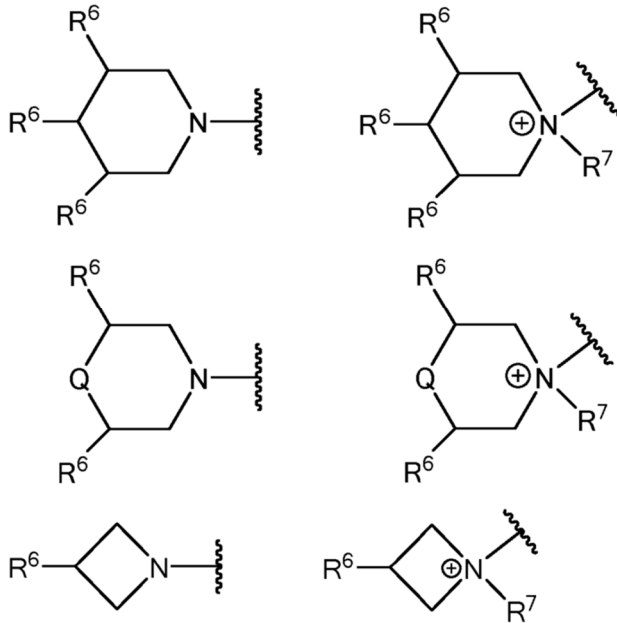


en la que n y m son cada uno independientemente desde 1 hasta 2; y R⁴ y R⁵ son independientemente para cada caso un grupo alquilo C(12-20) o un grupo alquenilo C(12-20);

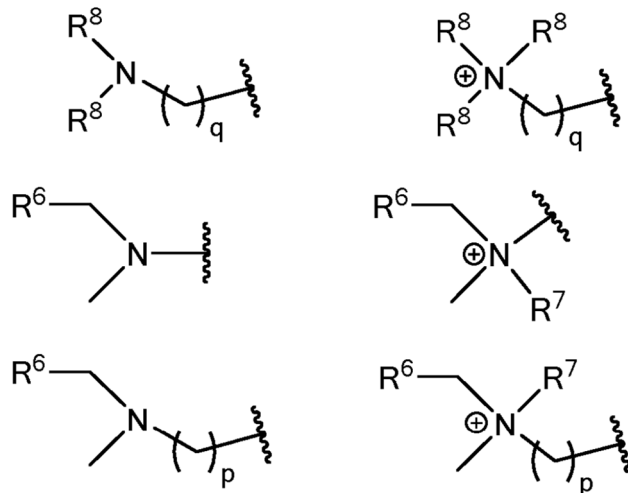
35

en la que R³ se selecciona de 1-azetidinas, 1-pirrolidinas, 1-piperidinas, 4-morfolinas y 1,4-piperazinas en las que los anillos pueden sustituirse en cualquier posición de átomo de carbono





y también puede seleccionarse de grupos amino y aminoalquilo, que pueden estar sustituidos,



5

en las que

10 cada R^6 se selecciona independientemente de H, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxilo, alcoxialcoxilo y aminoalquilo;

cada R^7 se selecciona independientemente de H, alquilo, hidroxialquilo y aminoalquilo;

15 cada R^8 se selecciona independientemente de H, alquilo, hidroxialquilo y aminoalquilo, y dos R^8 cualquiera pueden formar un anillo;

q es desde cero hasta cuatro;

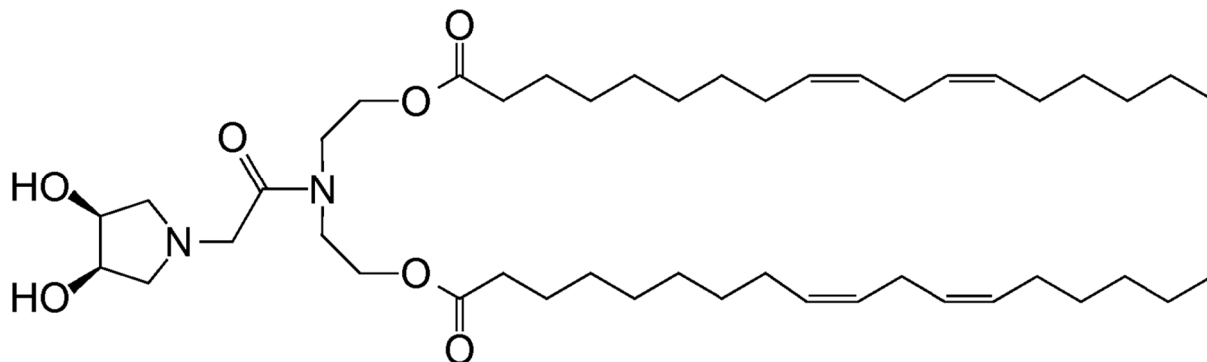
20 Q es O o NR^7 ;

p es desde 1 hasta 4.

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

25

COMPUESTO A6

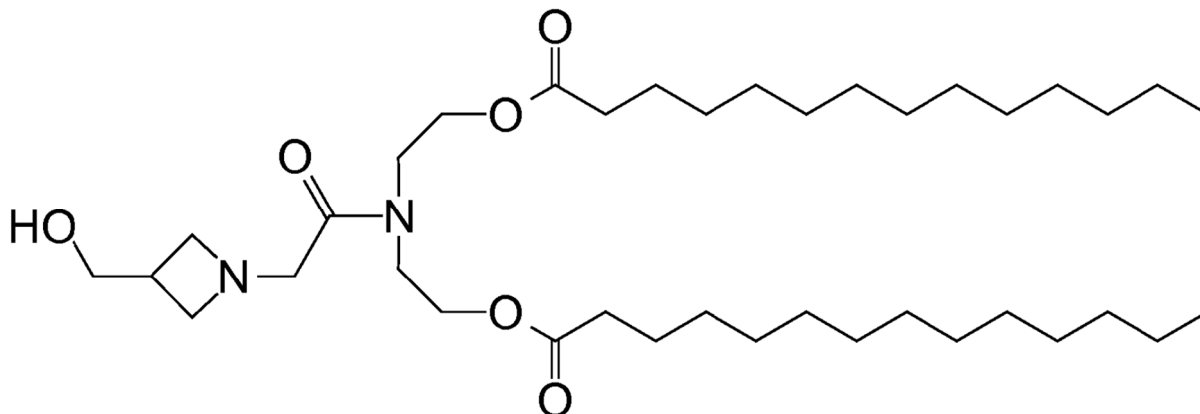


que es (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato) de ((2-((3S,4R)-3,4-dihidroxirolidin-1-il)acetil)azanediil)bis(etano-2,1-diilo).

5

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

COMPUESTO A9



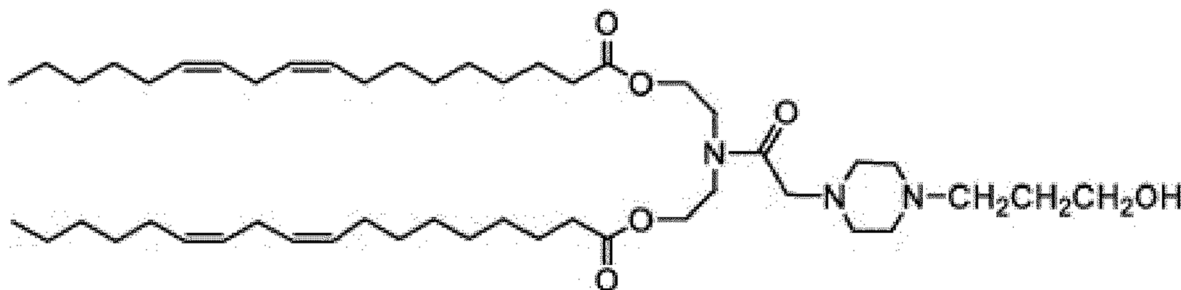
10

que es ditetradecanoato de ((2-(3-(hidroximetil)azetidín-1-il)acetil)azanediil)bis(etano-2,1-diilo).

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

15

COMPUESTO AA

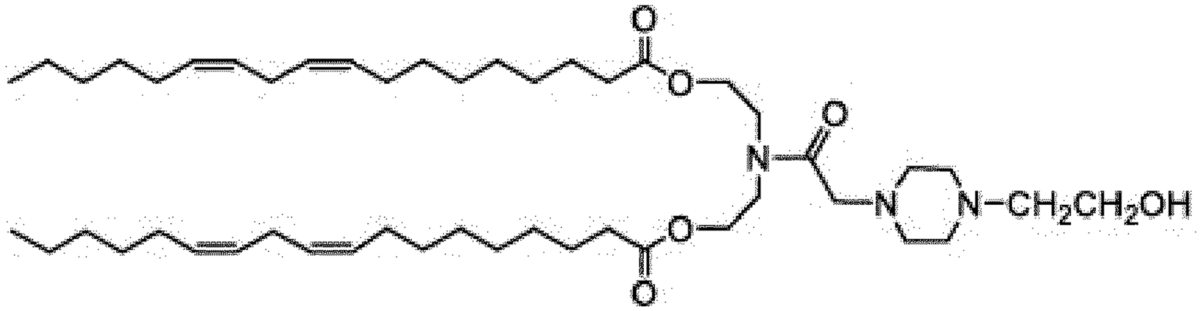


20 que es (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato) de ((2-(4-(2-hidroxiopropil)piperazin-1-il)acetil)azanediil)bis(etano-2,1-diilo).

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

25

COMPUESTO AB

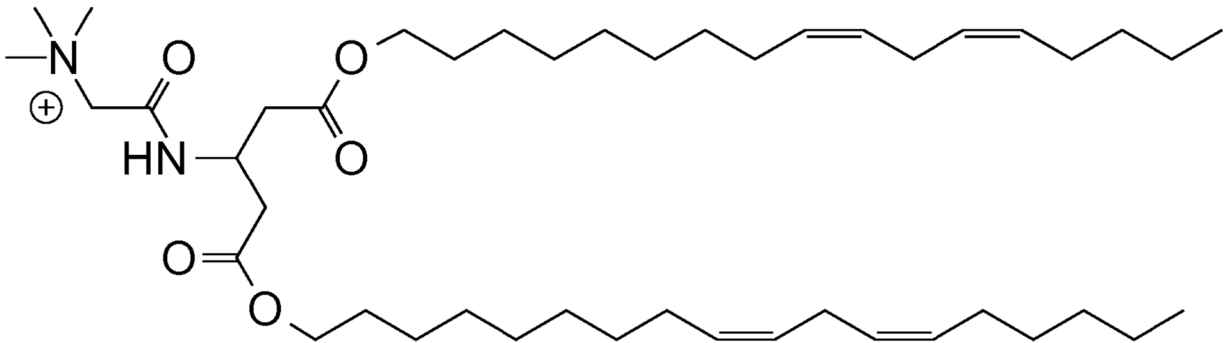


que es (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato) de ((2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)acetil)azanediil)bis(etano-2,1-dilo).

5

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

COMPUESTO C2



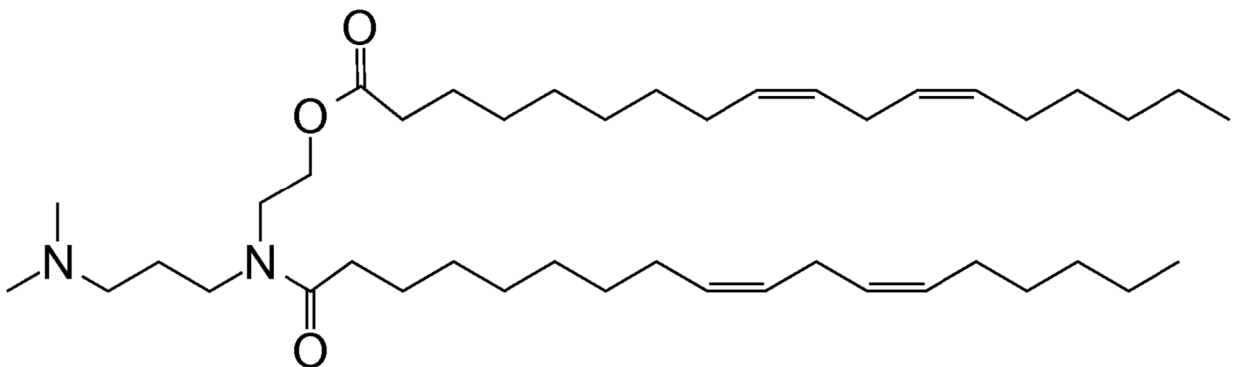
10

que es 2-((1-(((9Z,12Z)-heptadeca-9,12-dien-1-il)oxi)-5-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)oxi)-1,5-dioxopentan-3-il)amino)-N,N,N-trimetil-2-oxoetan-1-aminio.

15

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

COMPUESTO F5



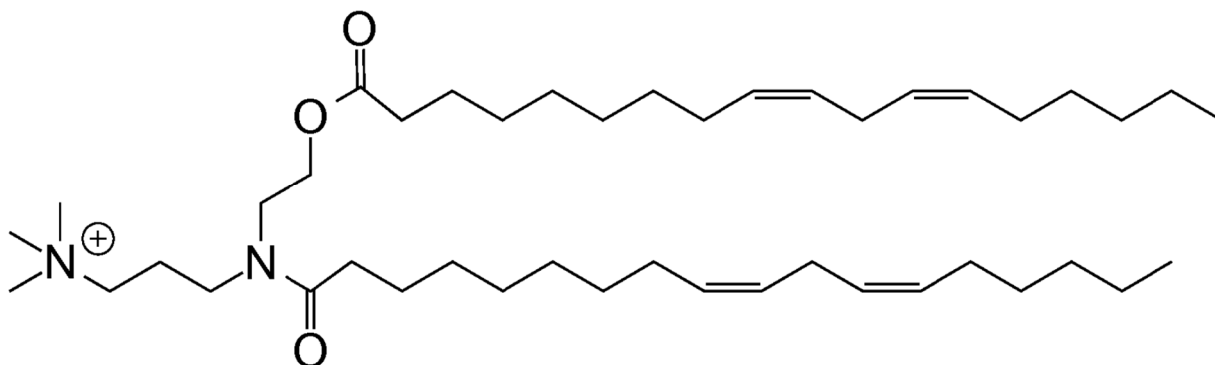
20

que es (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 2-((9Z,12Z)-N-(3-(dimetilamino)propil)octadeca-9,12-dienamido)etilo.

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

25

COMPUESTO F7

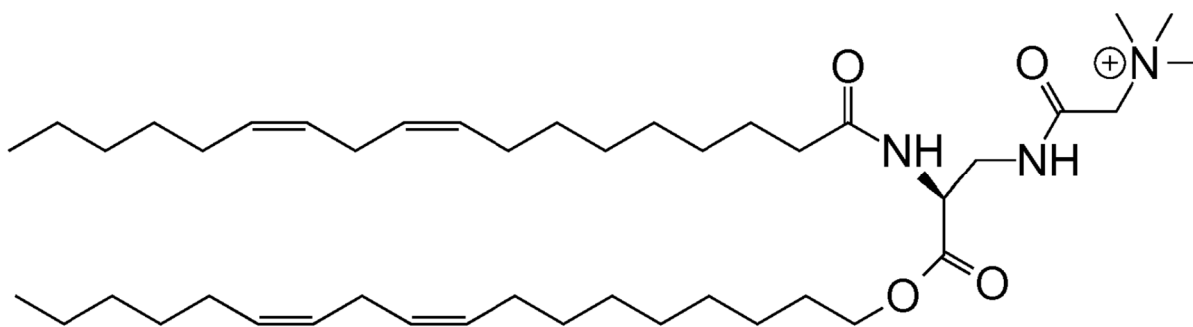


que es *N,N,N*-trimetil-3-((9Z,12Z)-*N*-(2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)etil)octadeca-9,12-dienamido)propan-1-amino.

5

Los ejemplos de un lípido ionizable incluyen el siguiente compuesto:

COMPUESTO C24



10

que es *N,N,N*-trimetil-2-(((*S*)-3-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)oxi)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienamido)-3-oxopropil)amino)-2-oxoetan-1-amino.

15 Lípidos estructurales

Los ejemplos de lípidos estructurales incluyen colesteroles, esteroides y esteroides.

20 Los ejemplos de lípidos estructurales incluyen colanos, colestanos, ergostanos, campestanos, poriferastanos, estigmastanos, gorgostanos, lanostanos, gonanos, estranos, androstanos, pregnanos y cicloartanos.

Los ejemplos de lípidos estructurales incluyen esteroides y zoosteroides tales como colesterol, lanosterol, zimosterol, zimostenol, desmosterol, estigmastanol, dihidrolanosterol y 7-deshidrocolesterol.

25 Los ejemplos de lípidos estructurales incluyen colesteroles pegilados y compuestos de colestano-3-oxo-acilo (C1-22), por ejemplo, acetato de colestero, araquidonato de colestero, butirato de colestero, hexanoato de colestero, miristato de colestero, palmitato de colestero, behenato de colestero, estearato de colestero, caprilato de colestero, n-decanoato de colestero, dodecanoato de colestero, nervonato de colestero, pelargonato de colestero, n-valerato de colestero, oleato de colestero, elaidato de colestero, erucato de colestero, heptanoato de colestero, linoleilaidato de colestero y linoleato de colestero.

30 Los ejemplos de lípidos estructurales incluyen esteroides tales como fitoesteroides, betasitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-estigmasterol y delta-7-avenasterol.

35 Lípidos estabilizadores

Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen lípidos zwitteriónicos.

40 Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen compuestos tales como fosfolípidos.

40

Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoileoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoileoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina y dilinoleoilfosfatidilcolina.

5 Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen compuestos de fosfatidiletanolamina y compuestos de fosfatidilcolina.

Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).

10 Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen difitanoilfosfatidiletanolamina (DPhPE) y 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPhPC).

Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

15 Los ejemplos de lípidos estabilizadores incluyen 1,2-dilauroil-sn-glicerol (DLG); 1,2-dimiristoil-sn-glicerol (DMG); 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol (DPG); 1,2-distearoil-sn-glicerol (DSG); 1,2-diarquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC); 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC); 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC); 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-O-etil-3-fosfocolina (DPePC); 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE); 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE); 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE); 1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina; 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC); 1-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (P-Liso-PC); y 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S-Liso-PC).

Lípidos para reducir la inmunogenicidad

25 Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen compuestos poliméricos y conjugados polímero-lípido.

30 Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen lípidos pegilados que tienen regiones de polietilenglicol (PEG). Las regiones de PEG pueden ser de cualquier masa molecular. En algunas realizaciones, una región de PEG puede tener una masa molecular de 200, 300, 350, 400, 500, 550, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 3500, 4000 o 5000 Da.

35 Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen compuestos que tienen una región de metoxipolietilenglicol.

Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen compuestos que tienen una región de carbonil-metoxipolietilenglicol.

40 Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen compuestos que tienen una región de PEG multiramificada.

Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen compuestos que tienen una región de poliglicerina.

45 Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen lípidos poliméricos tales como DSPE-mPEG, DMPE-mPEG, DPPE-mPEG y DOPE-mPEG.

Los ejemplos de lípidos para reducir la inmunogenicidad incluyen PEG-fosfolípidos y PEG-cerámidas.

Lípido catiónicos

50 Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen compuestos de HEDC descritos en el documento US 2013/022665 A1, y otros compuestos descritos en los documentos US 2013/0330401 A1 y US 2013/0115274 A1. Ejemplos adicionales de lípidos catiónicos son conocidos en la técnica.

Formulaciones de nanopartículas

Las realizaciones de esta invención pueden proporcionar composiciones de nanopartículas liposómicas.

60 En determinadas realizaciones, una molécula ionizable de esta invención puede usarse para formar composiciones liposómicas, que pueden tener una bicapa de moléculas de tipo lípido.

Una composición de nanopartículas puede tener una o más de las moléculas ionizables de esta invención en una estructura liposomal, una estructura bicapa, una micela, una estructura laminar o una mezcla de las mismas.

65 En algunas realizaciones, una composición puede incluir uno o más componentes de vehículos líquidos. Un vehículo

líquido adecuado para administrar los agentes activos de esta invención puede ser un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable. Un vehículo líquido puede incluir un disolvente orgánico o una combinación de agua y un disolvente orgánico.

5 Las realizaciones de esta invención pueden proporcionar nanopartículas lipídicas que tienen un tamaño de desde 10 hasta 1000 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas liposómicas pueden tener un tamaño de desde 10 hasta 150 nm.

10 En determinadas realizaciones, las nanopartículas liposómicas de esta invención pueden encapsular la molécula de iARN y retener al menos el 80% de las moléculas de iARN encapsuladas después de 1 hora de exposición a suero humano. Esta invención puede proporcionar una composición para su uso en la distribución de agente activo en células, tejidos u órganos, organismos, y sujetos, en la que la composición incluye una o más moléculas de lípido ionizable de esta invención.

15 Las composiciones de esta invención pueden incluir una o más de las moléculas de lípido ionizable, junto con un lípido estructural, uno o más lípidos estabilizadores, y uno o más lípidos para reducir la inmunogenicidad de la composición.

20 Una molécula de lípido ionizable de esta invención puede ser cualquier % en moles de una composición de esta invención.

25 Las moléculas de lípido ionizable de una composición de esta invención pueden ser desde el 15% en moles hasta el 40% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, las moléculas de lípido ionizable de una composición pueden ser desde el 20% en moles hasta el 35% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En realizaciones adicionales, las moléculas de lípido ionizable de una composición pueden ser desde el 25% en moles hasta el 30% en moles de los componentes lipídicos de la composición.

30 El lípido estructural de una composición de esta invención puede ser desde el 25% en moles hasta el 40% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, el lípido estructural de una composición puede ser desde el 30% en moles hasta el 35% en moles de los componentes lipídicos de la composición.

35 La suma de los lípidos estabilizadores de una composición de esta invención puede ser desde el 25% en moles hasta el 40% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, la suma de los lípidos estabilizadores de una composición puede ser desde el 30% en moles hasta el 40% en moles de los componentes lipídicos de la composición.

40 En algunas realizaciones, una composición de esta invención puede incluir dos o más lípidos estabilizadores, en la que cada uno de los lípidos estabilizadores puede ser individualmente desde el 5% en moles hasta el 35% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, una composición de esta invención puede incluir dos o más lípidos estabilizadores, en la que cada uno de los lípidos estabilizadores puede ser individualmente desde el 10% en moles hasta el 30% en moles de los componentes lipídicos de la composición.

45 En determinadas realizaciones, la suma del uno o más lípidos estabilizadores puede ser desde el 25% en moles hasta el 40% en moles de los lípidos de la composición, en la que cada uno de los lípidos estabilizadores puede ser individualmente desde el 5% en moles hasta el 35% en moles.

50 En determinadas realizaciones, la suma del uno o más lípidos estabilizadores puede ser desde el 30% en moles hasta el 40% en moles de los lípidos de la composición, en la que cada uno de los lípidos estabilizadores puede ser individualmente desde el 10% en moles hasta el 30% en moles.

55 El uno o más lípidos para reducir la inmunogenicidad de la composición pueden ser desde un total del 1% en moles hasta el 8% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, el uno o más lípidos para reducir la inmunogenicidad de la composición pueden ser desde un total del 1% en moles hasta el 5% en moles de los componentes lipídicos de la composición.

60 En aspectos adicionales, una composición de esta invención puede incluir además un lípido catiónico, que puede ser desde el 5% en moles hasta el 25% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En determinadas realizaciones, una composición de esta invención puede incluir además un lípido catiónico, que puede ser desde el 5% en moles hasta el 15% en moles de los componentes lipídicos de la composición. En estos aspectos, la razón molar de las concentraciones del lípido catiónico con respecto a las moléculas de lípido ionizable de una composición de esta invención puede ser desde 5:35 hasta 25:15.

65 En composiciones de esta invención, la totalidad de los componentes lipídicos puede incluir uno o más de los componentes moleculares de lípidos ionizables, uno o más lípidos estructurales, uno o más lípidos estabilizadores y uno o más lípidos para reducir la inmunogenicidad de la composición.

En algunas realizaciones, una composición puede contener el lípido ionizable compuesto A6, el lípido estructural

colesterol, los lípidos estabilizadores DOPC y DOPE, y el lípido para reducir la inmunogenicidad DPPE-mPEG. En determinadas realizaciones, el compuesto A6 puede ser del 15 al 25% en moles de la composición; el colesterol, DOPC y DOPE combinados pueden ser del 75 al 85% en moles de la composición; y DPPE-mPEG puede ser el 5% en moles de la composición.

5 En una realización, el compuesto A6 puede ser el 25% en moles de la composición; el colesterol puede ser el 30% en moles de la composición, DOPC puede ser el 20% en moles de la composición, DOPE puede ser el 20% en moles de la composición; y DPPE-mPEG(2000) puede ser el 5% en moles de la composición.

10 Composiciones farmacéuticas

Esta invención contempla además métodos para distribuir un agente activo a un órgano de un sujeto para tratar una enfermedad administrando al sujeto una composición de esta invención. Los órganos que pueden tratarse incluyen pulmón, hígado, páncreas, riñón, colon, hueso, piel e intestino.

15 En aspectos adicionales, esta invención proporciona una variedad de formulaciones farmacéuticas.

Una formulación farmacéutica en el presente documento puede incluir un agente activo, así como un portador de fármaco, o un lípido de esta invención, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En general, los agentes activos de esta descripción incluyen cualquier agente activo para tumores malignos, incluyendo cualquier molécula de ácido nucleico inhibidora y cualquier fármaco molecular pequeño. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico inhibidoras incluyen ribozimas, ácidos nucleicos antisentido y moléculas de interferencia de ARN (moléculas de iARN).

25 Una formulación farmacéutica de esta invención puede contener uno o más de cada uno de los siguientes: un agente tensioactivo, un diluyente, un excipiente, un conservante, un estabilizador, un tinte y un agente de suspensión.

Algunos portadores, diluyentes y componentes farmacéuticos para una formulación farmacéutica, así como los métodos para formular y administrar los compuestos y composiciones de esta invención se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1990).

Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

Los ejemplos de agentes tensioactivos incluyen alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados.

Los ejemplos de excipientes incluyen sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, aluminato metasilicato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrogenofosfato de calcio y carboximetilcelulosa de calcio.

Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja, acetato ftalato de celulosa, copolímero de metilacetato-metacrilato y éster ftalatos.

Una formulación terapéutica de esta invención para la administración de una o más moléculas activas para el silenciamiento génico puede administrarse a un mamífero que lo necesita. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación y el agente activo, que puede encapsularse en un liposoma, puede administrarse a un mamífero para prevenir o tratar un tumor maligno.

La vía de administración puede ser local o sistémica.

50 Una formulación terapéuticamente eficaz de esta invención puede administrarse por diversas vías, incluyendo intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y oral.

Las vías de administración pueden incluir, por ejemplo, administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

La formulación también puede administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de depósito, bombas osmóticas y similares, para una administración pulsada prolongada y/o programada a una tasa predeterminada.

La composición de la presente invención puede administrarse a través de diversas vías, incluyendo las vías oral y parenteral, y los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intrapulmonar, al interior de las vías respiratorias, intratraqueal, intrabronquial, nasal, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, intramedular, al interior de los ganglios linfáticos, intralinfática, intraencefalo, intratecal, intracerebroventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal e intrauterina, y puede formularse en una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Una forma de dosificación y un

método de formulación de este tipo pueden seleccionarse según sea apropiado entre cualquier forma y método de dosificación conocido. Véase, por ejemplo, Hyojun Yakuzaigaku, Standard Pharmaceutics, Ed. por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003.

5 Los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulo, tableta, cápsula, líquido, suspensión, emulsión, gel y jarabe, y los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración parenteral incluyen inyecciones tales como una disolución inyectable, una suspensión inyectable, una emulsión inyectable y una inyección lista para usar. Las formulaciones para administración parenteral pueden ser una forma tal como una disolución o suspensión estéril isotónica acuosa o no acuosa.

10 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua, incluyen disoluciones acuosas de la formulación activa en forma soluble en agua. Las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

15 Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las formulaciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

20 Además de las preparaciones descritas anteriormente, las formulaciones también pueden formularse como preparación de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, la formulación puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados, por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable, o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

25 Las composiciones y formulaciones de esta invención también pueden formularse para administración tópica y pueden aplicarse a la piel del sujeto usando cualquier procedimiento adecuado para la aplicación del vehículo de administración tópica. Por ejemplo, la formulación puede aplicarse de manera manual, usando un aplicador, o mediante un procedimiento que implique a ambos. Después de la aplicación, la formulación puede trabajarse en la piel del sujeto, por ejemplo, frotando. La aplicación puede realizarse varias veces al día o una vez al día. Por ejemplo, la formulación puede aplicarse a la piel de un sujeto una vez al día, dos veces al día o varias veces al día, o puede aplicarse una vez cada dos días, una vez cada tres días o aproximadamente una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez cada varias semanas.

30 Las formulaciones o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse al sujeto por cualquier medio adecuado. Los ejemplos de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) administración mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, o similar, incluyendo la administración con bomba de infusión; (b) administración por vía local tal como mediante inyección directamente en el área renal o cardíaca, por ejemplo, mediante implantación de depósito; así como también se considere apropiado por los expertos en la técnica para poner el compuesto activo en contacto con tejido vivo.

35 El médico individual puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación de las composiciones farmacéuticas en vista del estado del paciente. Véase, por ejemplo, Goodman & Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12ª ed., sec. 1, 2011. Normalmente, el intervalo de dosis de la composición administrada al paciente puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1000 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede ser una única o una serie de dos o más administradas en el transcurso de uno o más días, según lo necesite el paciente. En los casos en los que se han establecido dosificaciones humanas de compuestos para al menos alguna afección, las dosificaciones serán aproximadamente las mismas, o dosificaciones que serán aproximadamente del 0,1% a aproximadamente el 500%, más preferiblemente de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 250% de la dosificación humana establecida. Cuando no se establezca una dosificación humana, como será el caso de las composiciones farmacéuticas recientemente descubiertas, puede deducirse una dosificación humana adecuada a partir de los valores de DE50 o DI50, u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, según lo calificado por estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Preparación de formulaciones farmacológicas de nanopartículas lipídicas de ARNip mediante liofilización y reconstitución.

Se sintetizaron nanopartículas lipídicas con inyección de alta velocidad de disolución de lípidos/etanol en una disolución tampón de ARNip durante aproximadamente 10 minutos. Después de eso, se sometió a diafiltración un segundo tampón, seleccionado de tampón citrato pH 6,1, PBS pH 7,0, Tris pH 7,2 y HEPES pH 7,4, y se usó como tampón externo a través de cartuchos de TFF para elaborar una suspensión acuosa de producto final.

5 Se añadieron diversas cantidades de compuestos protectores a la suspensión acuosa de producto final, seguido por filtración de 0,2/0,8 micrómetro. Se prepararon nanopartículas lipídicas en lotes o bien de 500 ml o bien de 1000 ml.

10 Resultados: se encontró sorprendentemente que las nanopartículas lipídicas soportaron el procedimiento de liofilización, y que el líofilo proporcionó una suspensión reconstituida de nanopartículas lipídicas que tenían un tamaño de partícula promedio casi del tamaño que estaba presente en la suspensión original.

15 Ejemplo 2: las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención presentan un tamaño de partícula estable y encapsulación de ARNip, que son adecuados para su uso en productos terminados. El nivel sorprendente de estabilidad de las formulaciones de ARNip de esta invención surge de las propiedades de la composición de liofilización protegida.

20 En este estudio, se formuló un ARNip dirigido contra Hsp47 en nanopartículas liposomales con la siguiente composición aproximada: lípidos ionizables, el 40% en moles, DOPE, el 30% en moles, colesterol, el 25% en moles, y PEG-DMPE, el 5,0% en moles.

25 Se liofilizaron las formulaciones de nanopartículas con una composición protectora que contiene sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. El contenido de compuesto protector total de la composición era del 10% (p/v). Las cantidades usadas fueron del 6% de sacarosa y el 4% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. Por tanto, el contenido de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina era del 40% (p/v) de la cantidad total de sacarosa más (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina.

30 Se sintetizaron nanopartículas lipídicas mediante inyección de alta velocidad de disolución de lípidos/etanol en una disolución tampón de ARNip para elaborar una suspensión acuosa de producto final. La formulación a granel inicial de las nanopartículas que contienen ARNip tenía un intervalo de tamaños de nanopartícula promedios de 99-101 nm.

Se sometieron a prueba las formulaciones farmacológicas de ARNip liofilizadas reconstituidas para determinar la estabilidad de tamaño de partícula y la encapsulación del ARNip.

35 En general, lo más preferido es que las formulaciones de nanopartículas de ARNip presenten menos de aproximadamente el 10% de cambio en el tamaño de partícula promedio entre el estado preliofilizado y el estado liofilizado reconstituido. Además, lo más preferido es que formulaciones de nanopartículas de ARNip presenten al menos aproximadamente el 85% de eficacia de encapsulación de ARNip del estado liofilizado reconstituido.

40 La estabilidad de los productos de nanopartículas de ARNip reconstituidos se muestra en la tabla 2. En la tabla 2, el tamaño de partícula promedio y la eficacia de encapsulación de ARNip después de la liofilización (AL) y la reconstitución se muestran junto con resultados similares obtenidos a partir de una disolución congelada descongelada antes de la liofilización (BL).

Tabla 2: estabilidad de las nanopartículas antes de la liofilización y después de la reconstitución

45

% de compuesto protector total (p/v)	Z (prom.) (nm)		PDI		Zeta (mV)		% de EE		[ARNip] mg/ml
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL	
10% (A)*	105	108	0,140	0,167	-1,4	-1,7	91	86	1,9
10% (B)	106	110	0,156	0,138	-1,8	-1,7	92	87	2,0
10% (C)	106	108	0,150	0,165	-2,0	-1,7	92	87	1,9
10% (D)	105	111	0,146	0,157	-1,7	-2,4	92	85	1,8
10% (A)	106	111	0,134	0,149	-1,5	-1,1	93	88	3,7
12,5% (A)	106	112	0,165	0,186	-1,7	-1,6	93	87	3,7
15% (A)	105	112	0,170	0,141	-1,3	-1,1	93	87	3,6
15% (A)	106	116	0,140	0,149	-1,3	-0,5	93	88	4,4
15% (B)	105	116	0,154	0,157	-1,3	-0,7	93	88	4,4
15% (C)	105	118	0,151	0,150	-1,1	-0,8	93	88	4,5

*En la tabla 2, se usó el compuesto protector (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina) de cuatro fuentes comerciales diferentes A, B, C y D.

5 En la tabla 2, todas las composiciones protectoras presentaron una estabilidad adecuada de las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas finales. Excepto para las muestras en los niveles más altos de concentración de ARNip y compuesto protector total (15%), las formulaciones de nanopartículas de ARNip presentaron menos del 10% de cambio en el tamaño de partícula promedio entre el estado preliofilizado y el estado liofilizado reconstituido, así como al menos el 85% de eficacia de encapsulación de ARNip del estado liofilizado reconstituido.

10 Los resultados de la tabla 2 muestran que las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención que se prepararon a partir de formulaciones de nanopartículas mediante liofilización a partir de una composición protectora que contenía el 60% de sacarosa y el 40% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina eran ventajosamente estables en cuanto a tamaño de partícula promedio y eficacia de encapsulación de ARNip.

15 Ejemplo 3: modelo de rata con fibrosis hepática inducida por dimetilnitrosamina (DMN)

Las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención presentaron una potencia profunda y sorprendente para el silenciamiento génico *in vivo*. Se observó la atenuación génica *in vivo* con formulaciones de ARNip liofilizadas y reconstituidas. Se usaron ARNip encapsulados en una formulación liposomal en un modelo de
20 rata con fibrosis hepática inducida por dimetilnitrosamina (DMN).

Se formuló un ARNip dirigido contra Hsp47 (GP46) en nanopartículas liposomales con la siguiente composición aproximada: lípidos ionizables, el 40% en moles, DOPE, el 30% en moles, colesterol, el 25% en moles, y PEG-DMPE, el 5,0% en moles.

25 Se liofilizaron las formulaciones de nanopartículas con una composición protectora que contenía sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. El contenido de compuesto protector total era del 10% (p/v). El contenido de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina se varió desde el 20% hasta el 40% (p/v).

30 Se obtuvieron las muestras como una torta liofilizada recién preparada el mismo día almacenada a -80°C. Se reconstituyeron las muestras con solución salina y se diluyeron adicionalmente con solución salina hasta una concentración de ARNip de 0,17 mg/ml. El tiempo de reconstitución fue de aproximadamente 20 s con un volumen de 3 ml.

35 Se sometieron a prueba las disoluciones reconstituidas del producto terminado final del ARNip de Hsp47 para determinar la potencia *in vivo*, que es una prueba rigurosa de la viabilidad de nanopartículas liofilizadas reconstituidas que contienen un agente de ácido nucleico.

40 En este estudio se usaron ratas Sprague Dawley que no habían recibido tratamiento previo en diez grupos de 7-8 machos con un intervalo de peso de 180-200 g. Se usó una forma de dosificación líquida con PBS a pH 7,4. En el día de la dosificación, antes de la administración, se reconstituyó la formulación y se diluyó usando solución salina en concentraciones por grupo. Se descongeló la formulación de control congelada y se diluyó un día antes de la administración. Se añadió una cantidad de DMN para lograr 5 mg/ml de disolución de dosificación transparente en el día de inyección a PBS a pH 7,4. La administración fue mediante inyección intraperitoneal. La dosificación fue q.d. día
45 1-3, durante 3 días consecutivos. La dosis fue de 0,5 a 1,5 mg/kg (ARNip) usando un intervalo de concentraciones de formulación de 0,17-0,5 mg/ml, con un volumen administrado de 3 ml/kg. Se pesaron las ratas antes de la administración de DMN y se les inyectó a los animales en el día 1-3 por vía intraperitoneal 10 mg/kg de DMN (disolución a 5 mg/ml), con un volumen de dosificación de 2 ml/kg. En el día 4-6, se les inyectó a los animales DMN con un volumen de dosificación de 1 ml/kg. En el día 5, se aleatorizaron los animales tratados con DMN en grupos basándose en el peso corporal (día 5) antes de la administración del fármaco. Se administró un artículo de prueba en el día 6 (el primer día de inyección con DMN fue el día 1). En el día 7, se obtuvieron los hígados de las ratas y se lavaron inmediatamente con PBS, pH 7,4 (40 ml a una velocidad de 20 ml/min) a través de la vena porta hepática sujeta con un clip. Se extrajo una sección transversal del hígado de 2 mm de grosor de los lóbulos laterales
50 izquierdos.

55 Evaluación de la atenuación génica del mARN de gp46. Se extrajo ARN total del hígado de ratas usando columnas RNeasy (Qiagen). Se cuantificó el ARN usando un espectrofotómetro Nanodrop.

60 Tal como se muestra en la figura 1, la formulación farmacológica de ARNip reconstituida de esta invención protegida con el 40% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina presentó una potencia profunda y sorprendente para el silenciamiento génico de Hsp47 (GP46) *in vivo*.

65 En particular, la potencia de silenciamiento génico *in vivo* de Hsp47 (GP46) de la formulación protegida con el 40% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina fue esencialmente del 100%.

Por el contrario, la potencia *in vivo* de las formulaciones que contenían del 20% al 30% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina presentaron una atenuación génica inaceptablemente bajo, siendo sólo del 47% y el 32%, respectivamente.

5 En resumen, el resultado inesperadamente ventajoso muestra que las composiciones protectoras para la liofilización de formulaciones de ARNip liposomales de esta invención pueden realizarse con al menos el 40% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina en una composición que contiene sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina.

10 La caracterización física mostró que las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención que se prepararon a partir de formulaciones de nanopartículas mediante liofilización a partir de una composición protectora que contenía desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 70% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina y el resto de sacarosa, eran ventajosamente estables en cuanto a tamaño de partícula promedio. Por debajo de aproximadamente el 40% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina, las formulaciones tendían a tener valores de encapsulación anómalamente aumentados, lo que es una indicación de cambios estructurales no deseados. Por tanto, 15 el intervalo preferido para el componente (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina fue de desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 70%.

20 En conclusión, una formulación farmacológica de ARNip reconstituida de esta invención utiliza desde el 40% hasta el 70% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina con una potencia sorprendente para un agente farmacológico de ácido nucleico *in vivo*.

25 Ejemplo 4: las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención presentaron suficiente concentración en plasma para el silenciamiento génico *in vivo*. La farmacocinética en plasma de las formulaciones de ARNip liofilizadas y reconstituidas se observó *in vivo*.

Se formuló un ARNip dirigido contra Hsp4 7 (GP46) en nanopartículas liposomales con la siguiente composición aproximada: lípidos ionizables, el 40% en moles, DOPE, el 30% en moles, colesterol, el 25% en moles, y PEG-DMPE, el 5,0% en moles.

30 Se liofilizaron las formulaciones de nanopartículas con una composición protectora que contenía sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. El contenido de compuesto protector total era del 12,5% (p/v). El contenido de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina era del 40% (p/v) del compuesto protector total, el resto sacarosa.

35 Se evaluaron los perfiles PK en plasma en ratas Sprague Dawley tras una administración intravenosa a un único nivel de dosis de la formulación liofilizada en comparación con una formulación congelada. Se determinaron las concentraciones de ARNip de las muestras de plasma mediante un método de ELISA basado en hibridación. Se prepararon ratas Sprague-Dawley con un doble catéter en la vena yugular. Se les administró a los animales una única inyección de dosis intravenosa en bolo del material de prueba a través de un catéter en la vena yugular a lo largo de 15 segundos en el día 1. Se extrajeron aproximadamente 0,30 ml de sangre completa del catéter en la vena yugular 40 de cada animal en tubos K2EDTA en cada punto de tiempo.

45 Tal como se muestra en la figura 2, la farmacocinética de concentración en plasma de la formulación farmacológica de ARNip liofilizada reconstituida era esencialmente la misma que la formulación de control comparativa que sólo se había congelado. La formulación farmacológica de ácido nucleico de ARNip liofilizada reconstituida proporcionó niveles sorprendentemente eficientes del agente farmacológico en plasma.

Para este experimento, en la tabla 3 se muestran el área bajo la curva de tiempo-concentración (AUC) y la concentración máxima en plasma (C_{máx}) después de una única dosis.

50 Tabla 3: farmacocinética en plasma para formulaciones de ácido nucleico liofilizadas reconstituidas

	Reconstituidas	Congeladas
AUC	2751	2683
C _{máx}	2922	3350

55 En conclusión, este experimento muestra que la farmacocinética de concentración en plasma de una formulación farmacológica de ácido nucleico liofilizada reconstituida era esencialmente la misma que la una formulación de control positivo comparativa que sólo se había congelado. Por tanto, la formulación farmacológica de ácido nucleico de ARNip liofilizada reconstituida proporcionó niveles sorprendentemente eficientes de agente farmacológico en plasma, y no se degradó en relación con una composición no liofilizada.

60 Ejemplo 5: protección de nanopartículas lipídicas en el intervalo de tamaño de 100 nm.

Se sintetizaron nanopartículas lipídicas con dispersión de disolución de lípidos/etanol en un tampón de ARNip para elaborar una suspensión acuosa de producto final. Las nanopartículas tenían un tamaño promedio de 105-106 nm. Se sintetizaron las nanopartículas usando el compuesto HEDC como lípido ionizable (véase, por ejemplo, el documento US 2013/022665 A1). Las nanopartículas encapsularon un ARNip dirigido contra Hsp47.

5 La tabla 4 muestra las características de las nanopartículas antes de la liofilización, en la que la suspensión acuosa de producto final sólo se congeló, luego se descongeló. La tabla 5 muestra las características de las nanopartículas después de la liofilización.

10 El aumento del tamaño de partícula promedio de la tabla 4 a la tabla 5 es de sólo el 6,7%.

Tabla 4: características de las nanopartículas antes de la liofilización (intervalo de tamaño de 100 nm)

n.º	Sacarosa/2HPBCD (% en peso/% en peso)	Prelioofilización (congeladas)					
		Z (prom.) (nm)	PDI	Zeta (mV)	EE (%)	[ARNip] (mg/ml)	rendimiento (%)
1	6/4	105	0,14	-1,4	91	2,1	103
2	6/4	106	0,16	-1,8	92	2,1	105
3	6/4	106	0,15	-2,0	92	2,1	104
4	6/4	105	0,15	-1,7	92	2,1	104
5	6/4	106	0,14	-1,3	93	5,1	101
6	6/4	105	0,15	-1,3	93	4,9	99
7	6/4	105	0,15	-1,1	93	5,2	103
8	6/4	106	0,16	-0,9	93	5,2	104

15 Tabla 5: características de las nanopartículas después de la liofilización (intervalo de tamaño de 100 nm)

n.º	Sacarosa/2HPBCD (% en peso/% en peso)	Postlioofilización (reconstituidas)					
		Z (prom.) (nm)	PDI	Zeta (mV)	EE (%)	[ARNip] (mg/ml)	rendimiento (%)
1	6/4	108	0,17	-1,7	86	1,9	94
2	6/4	110	0,14	-1,7	87	2,0	98
3	6/4	108	0,16	-1,7	87	1,9	95
4	6/4	111	0,16	-2,4	85	1,8	92
5	6/4	116	0,15	-0,5	88	4,4	88
6	6/4	116	0,16	-0,7	88	4,4	89
7	6/4	118	0,15	-0,8	88	4,5	90
8	6/4	114	0,12	-1,3	87	4,42	88

20 En una prueba adicional, se sometieron a prueba nueve disoluciones de producto final que contenían el 6% (p/v) de sacarosa, el 4% (p/v) de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina, y una concentración de un ARNip dirigido contra Hsp47 de 2 mg/ml para determinar el aumento del tamaño de partícula promedio tras la liofilización y reconstitución. Después de la liofilización, los productos terminados reconstituidos mostraron un aumento sorprendentemente pequeño en el tamaño de partícula promedio de menos del 5%, desde 102 nm hasta 107 nm, en comparación con las disoluciones de producto final antes de la liofilización.

25 Ejemplo 6: protección de nanopartículas lipídicas en el intervalo de tamaño de 50 nm.

30 Se sintetizaron nanopartículas lipídicas con inyección de alta velocidad de disolución de lípidos/etanol en un tampón de ARNip para elaborar una suspensión acuosa de producto final. Las nanopartículas tenían un tamaño promedio de 48-50 nm. Se sintetizaron las nanopartículas usando el compuesto A6 como lípido ionizable. Las nanopartículas encapsularon un ARNip dirigido contra Hsp47 a 2 mg/ml.

La tabla 6 muestra las características de las nanopartículas antes de la liofilización (BL) y después de la liofilización (AL) de nanopartículas en el intervalo de 50 nm.

5 Tabla 6: características de las nanopartículas antes y después de la liofilización de nanopartículas en el intervalo de 50 nm

Sacarosa/2HPBCD (% en peso/% en peso)	Z (prom.) (nm)		PDI		Zeta (mV)		% de EE	
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL
5/5	48	53	0,07	0,13	-2,3	-3,3	76	66
6/4	48	51	0,07	0,14	-2,8	-4,8	81	68
12/0	50	75	0,08	0,25	-4,9	-2,0	86	81

10 Ejemplo 7: protección de nanopartículas lipídicas de ARNip durante almacenamiento a largo plazo.

Las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención presentaron estabilidad a largo plazo para el silenciamiento génico *in vivo*.

15 Se formuló un ARNip dirigido contra Hsp47 (GP46) en nanopartículas liposomales con la siguiente composición aproximada: lípidos ionizables, el 40% en moles, DOPE, el 30% en moles, colesterol, el 25% en moles, y PEG-DMPE, el 5,0% en moles.

20 Se liofilizaron las formulaciones de nanopartículas con una composición protectora que contenía sacarosa y (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina. El contenido de compuesto protector total era de desde el 10% hasta el 12,5% hasta el 15% (p/v). El contenido de (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina era del 40% (p/v), sacarosa el 60%. La ciclodextrina era ciclodextrina CAVITRON W7 HP5 PHARMA.

25 Se almacenaron los viales a las temperaturas mostradas en la tabla 7 durante 4 semanas. Después del almacenamiento y la reconstitución, el tamaño promedio de las nanopartículas (PS, Z-prom.) era sorprendentemente estable, tal como se muestra en la tabla 7.

Tal como se muestra en la tabla 7, el tamaño de las nanopartículas de ARNip estaba dentro del 4% de su tamaño en la composición original.

30 Tabla 7: características de las nanopartículas

% de compuesto protector total de la muestra	Temperatura -20°C				Temperatura 5°C			
	Z-prom. inicial		Z-prom. 1 mes		Z-prom. inicial		Z-prom. 1 mes	
	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI
10	103	0,12	99	0,15	103	0,12	102	0,14
12,5	101	0,13	101	0,15	101	0,13	100	0,16
15	102	0,13	---	---	102	0,13	102	0,15
10	100	0,13	99	0,17	100	0,13	96	0,16
12,5	95	0,16	94	0,14	95	0,16	94	0,14
15	96	0,13	95	0,13	96	0,13	96	0,13
10	95	0,15	95	0,16	95	0,15	96	0,15
12,5	95	0,15	92	0,11	95	0,15	93	0,14
15	94	0,13	92	0,14	94	0,13	91	0,14

Ejemplo 8: protección de nanopartículas lipídicas de ARNip durante almacenamiento a largo plazo.

35 Las formulaciones farmacológicas de ARNip reconstituidas de esta invención presentaron estabilidad a largo plazo

para el silenciamiento génico *in vivo*.

Se formuló ARNip dirigido contra Hsp47 (GP46) en nanopartículas liposomales con la siguiente composición aproximada: lípidos ionizables, el 40% en moles, DOPE, el 30% en moles, colesterol, el 25% en moles, y PEG-DMPE, el 5,0% en moles.

Se liofilizaron las formulaciones de nanopartículas con una composición protectora que contenía sacarosa y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina. El contenido de compuesto protector total era desde el 10% hasta el 12,5% hasta el 15% (p/v). El contenido de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina era el 40% (p/v), sacarosa el 60%. La ciclodextrina era ciclodextrina CAVITRON W7 HP7 PHARMA.

Se almacenaron los viales a las temperaturas mostradas en la tabla 8 durante 4 semanas. Después del almacenamiento y la reconstitución, el tamaño promedio de las nanopartículas (PS, Z-prom.) era sorprendentemente estable, tal como se muestra en la tabla 8.

Tal como se muestra en la tabla 8, el tamaño de las nanopartículas de ARNip estaba dentro del 5% de su tamaño en la composición original.

Tabla 8: características de las nanopartículas

% de compuesto protector total de la muestra	Temperatura -20°C				Temperatura 5°C			
	Z-prom. inicial		Z-prom. 1 mes		Z-prom. inicial		Z-prom. 1 mes	
	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI	Z-prom.	PDI
10	103	0,11	99	0,14	103	0,11	99	0,15
12,5	101	0,14	99	0,15	101	0,14	98	0,15
15	102	0,15	---	---	102	0,15	97	0,14
10	96	0,13	95	0,13	96	0,13	93	0,13
12,5	94	0,12	91	0,12	94	0,12	91	0,13
15	94	0,13	89	0,14	94	0,13	91	0,14
10	94	0,15	89	0,15	94	0,15	89	0,13
12,5	91	0,15	87	0,13	91	0,15	88	0,14
15	90	0,14	86	0,15	90	0,14	87	0,12

REIVINDICACIONES

1. Composición para elaborar un líofilo sólido de nanopartículas lipídicas que comprende uno o más agentes activos de ácido nucleico, comprendiendo la composición:
 - 5 una suspensión acuosa de las nanopartículas lipídicas en una disolución farmacéuticamente aceptable, en la que las nanopartículas lipídicas encapsulan el uno o más agentes activos de ácido nucleico;
 - 10 un compuesto de dextrina; y
 - un compuesto de azúcar sacárido,
 - en la que la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar es de desde el 2% hasta el 20% (p/v) de la composición, y
 - 15 en la que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 70% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que tras la liofilización y reconstitución de la composición, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del 10% de su tamaño en la composición original.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de desde 45 nm hasta 110 nm.
- 25 4. Composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de los agentes activos de ácido nucleico es de desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml.
5. Composición según la reivindicación 1, en la que las nanopartículas lipídicas comprenden un compuesto seleccionado del compuesto A6, compuesto A9, compuesto AA, compuesto AB, compuesto C2, compuesto F5, compuesto F7, compuesto C24 y HEDC (bromuro de 2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetan-amonio).
- 30 6. Composición según la reivindicación 1, en la que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son moléculas de iARN capaces de mediar la interferencia de ARN, preferiblemente ARNip, ARNhc, ARNdA, ARNiP o ARNipar; o en la que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son miARN, ARN antisentido, plásmidos, oligonucleótidos híbridos o aptámeros.
- 35 7. Composición según la reivindicación 1, en la que la disolución farmacéuticamente aceptable es un tampón HEPES, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón que contiene tris(hidroximetil)aminometano.
- 40 8. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto de dextrina es una ciclodextrina, preferiblemente un compuesto de ciclodextrina que tiene una o más de las posiciones hidroxilo 2, 3 y 6 sustituidas con grupos sulfoalquilo, bencenosulfoalquilo, acetoalquilo, hidroxialquilo, succinato de hidroxialquilo, malonato de hidroxialquilo, glutarato de hidroxialquilo, adipato de hidroxialquilo, hidroxialquilo, maleato de hidroxialquilo, oxalato de hidroxialquilo, fumarato de hidroxialquilo, citrato de hidroxialquilo, tartato de hidroxialquilo, malato de hidroxialquilo o citraconato de hidroxialquilo; o en la que el compuesto de ciclodextrina es (2-hidroxi)propil-β-ciclodextrina, succinato de 2-hidroxi)propil-β-ciclodextrina, (2-hidroxi)propil-γ-ciclodextrina, succinato de 2-hidroxi)propil-γ-ciclodextrina, sulfobutil éter β-ciclodextrina, sulfobutil éter γ-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina o metil-γ-ciclodextrina; o en la que el compuesto de ciclodextrina se une a una cadena o red polimérica; o en la que el compuesto de ciclodextrina incluye un compuesto adsorbato, preferiblemente seleccionado de colesterol, lanosterol, zimosterol, zimostenol, desmosterol, estigmastanol, dihidrolanosterol, 7-deshidrocolesterol, colesterol pegilado, acetato de colesterilo, araquidonato de colesterilo, butirato de colesterilo, hexanoato de colesterilo, miristato de colesterilo, palmitato de colesterilo, behenato de colesterilo, estearato de colesterilo, caprilato de colesterilo, n-decanoato de colesterilo, dodecanoato de colesterilo, nervonato de colesterilo, pelargonato de colesterilo, n-valerato de colesterilo, oleato de colesterilo, elaidato de colesterilo, erucato de colesterilo, heptanoato de colesterilo, linolelaidato de colesterilo, linoleato de colesterilo, beta-sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-estigmasterol y delta-7-avenasterol.
- 45 50 55 60 9. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto de azúcar sacárido es un compuesto de azúcar monosacárido o disacárido, preferiblemente seleccionado de sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, kojibiosa, sakebiosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, isomaltulosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, melibiulosa y xilobiosa.
- 65 10. Procedimiento para elaborar un líofilo sólido de uno o más agentes activos de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento liofilizar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Liófilo sólido elaborado mediante el procedimiento según la reivindicación 10.
- 5 12. Procedimiento para elaborar un producto terminado que comprende reconstituir un liófilo sólido según la reivindicación 11.
13. Producto terminado elaborado mediante el procedimiento según la reivindicación 12.
- 10 14. Procedimiento para elaborar un producto terminado de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento:
 sintetizar nanopartículas lipídicas, en el que las nanopartículas lipídicas encapsulan uno o más agentes activos de ácido nucleico;
 15 proporcionar una suspensión acuosa de las nanopartículas lipídicas en una disolución farmacéuticamente aceptable;
 añadir un compuesto de dextrina a la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas;
 20 añadir un compuesto de azúcar sacárido a la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas;
 liofilizar la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas, formando así un liófilo sólido;
 formando así un producto terminado de ácido nucleico,
 25 en el que la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido es de desde el 2% hasta el 20% (p/v) de la disolución que contiene las nanopartículas lipídicas, y
 en el que el compuesto de dextrina es de desde el 40% hasta el 70% (p/v) de la cantidad total de los compuestos de dextrina y de azúcar sacárido.
- 30 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que tras la reconstitución, el tamaño promedio de las nanopartículas está dentro del 10% de su tamaño cuando se sintetizaron.
- 35 16. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de desde 45 nm hasta 110 nm.
17. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la concentración de los agentes activos de ácido nucleico es de desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml.
- 40 18. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el uno o más agentes activos de ácido nucleico son moléculas de iARN capaces de mediar la interferencia de ARN.
- 45 19. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la disolución farmacéuticamente aceptable es un tampón HEPES, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón que contiene tris(hidroximetil)aminometano.
- 50 20. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el compuesto de dextrina es una ciclodextrina, preferiblemente un compuesto de ciclodextrina que tiene una o más de las posiciones hidroxilo 2, 3 y 6 sustituidas con grupos sulfoalquilo, bencenosulfoalquilo, acetoalquilo, hidroxialquilo, succinato de hidroxialquilo, malonato de hidroxialquilo, glutarato de hidroxialquilo, adipato de hidroxialquilo, hidroxialquilo, maleato de hidroxialquilo, oxalato de hidroxialquilo, fumarato de hidroxialquilo, citrato de hidroxialquilo, tartato de hidroxialquilo, malato de hidroxialquilo, o citraconato de hidroxialquilo; o en el que el compuesto de ciclodextrina es (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina, succinato de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, (2-hidroxiopropil)- γ -ciclodextrina, succinato de 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina, sulfobutil éter β -ciclodextrina, sulfobutil éter γ -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina o metil- γ -ciclodextrina; o en el que el compuesto de ciclodextrina se une a una cadena o red polimérica; o en el que el compuesto de ciclodextrina incluye un compuesto adsorbato, preferiblemente seleccionado de colesterol, lanosterol, zimosterol, zimostenol, desmosterol, estigmastanol, dihidrolanosterol, 7-deshidrocolesterol, colesterol pegilado, acetato de colesterol, araquidonato de colesterol, butirato de colesterol, hexanoato de colesterol, miristato de colesterol, palmitato de colesterol, behenato de colesterol, estearato de colesterol, caprilato de colesterol, n-decanoato de colesterol, dodecanoato de colesterol, nervonato de colesterol, pelargonato de colesterol, n-valerato de colesterol, oleato de colesterol, elaidato de colesterol, erucato de colesterol, heptanoato de colesterol, linolelaidato de colesterol, linoleato de colesterol, beta-sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-estigmasterol y delta-7-avenasterol.
- 65 21. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el compuesto de azúcar sacárido es un compuesto de azúcar monosacárido o disacárido.

FIG. 1

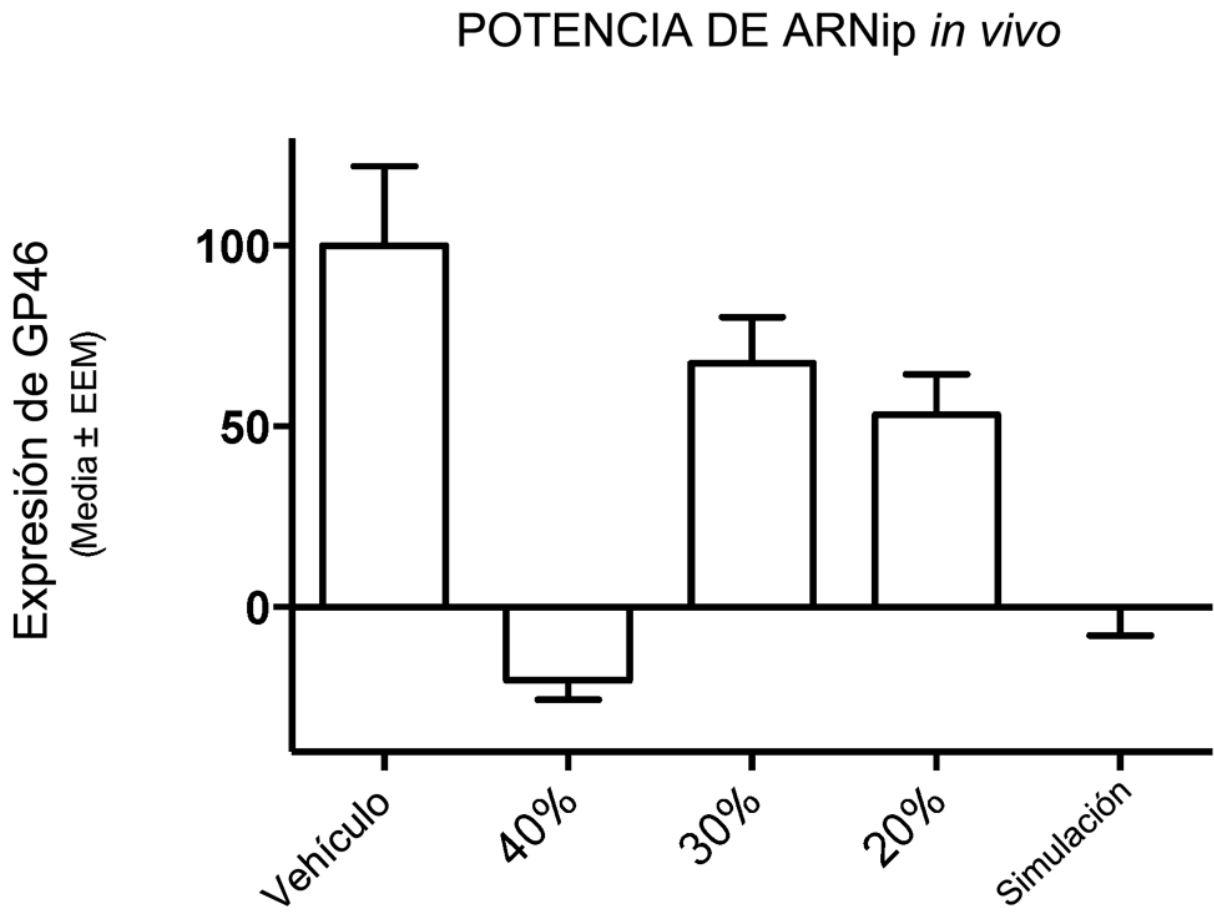


FIG. 2

