

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 520**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 47/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 08747568 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2157982**

54 Título: **Lipoaminoácidos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 916131 P

29.06.2007 US 947282 P

02.08.2007 US 953667 P

14.09.2007 US 972590 P

14.09.2007 US 972653 P

22.01.2008 US 22571

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

16.03.2015

73 Titular/es:

MARINA BIOTECH, INC. (100.0%)

3830 MONTE VILLA PARKWAY

BOTHELL WA 98021-7266, US

72 Inventor/es:

QUAY, STEVEN, C.;

HOUSTON, MICHAEL, E.;

HARVIE, PIERROT;

ADAMI, ROGER, C.;

FAM, RENATA;

PRIEVE, MARY, G.;

FOSNAUGH, KATHY, L. y

SETH, SHAGUNA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 531 520 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

Lipoaminoácidos y usos de los mismos

Área de la invención

5 La presente invención hace referencia a agentes potenciadores de la administración de nuevos fármacos, que incluyen lípidos que son útiles para la administración de diversas moléculas a las células. La presente invención proporciona una variedad de compuestos, composiciones, formulaciones, métodos y usos de tales agentes dirigidos finalmente a la administración de fármacos, la terapéutica, y al diagnóstico y tratamiento de enfermedades y condiciones, incluyendo aquellas que responden a la modulación de la expresión o actividad génica en un sujeto. Más específicamente, la presente invención hace referencia a compuestos, liposomas, vesículas lamelares, 10 emulsiones, micelas, suspensiones, partículas, soluciones y otras formas de composiciones y formulaciones potenciadoras de la administración, además de métodos terapéuticos y usos para estos materiales de administración.

Antecedentes

15 La administración de un compuesto terapéutico a un sujeto puede verse dificultada por la habilidad limitada del compuesto para alcanzar una célula o tejido diana, o por la entrada o la distribución limitada del compuesto en el interior de las células. La administración de un material terapéutico se encuentra en general restringida por las membranas de las células. Estas barreras y restricciones a la administración pueden dar como resultado la necesidad de utilizar concentraciones mucho más elevadas de un compuesto de lo que sería deseable para lograr un resultado, lo que conlleva el riesgo de efectos tóxicos y efectos secundarios.

20 Una estrategia para la administración consiste en mejorar el transporte de un compuesto a las células utilizando moléculas portadoras lipídicas o poliméricas. Estos materiales pueden aprovecharse de mecanismos existentes para la entrada selectiva a una célula, mientras que se siguen excluyendo moléculas exógenas tales como ácidos nucleicos y proteínas. Por ejemplo, un lípido catiónico puede interactuar con un agente farmacológico y proporcionar contacto con la membrana celular. Las moléculas lipídicas pueden además organizarse en liposomas o partículas 25 como soportes para agentes farmacológicos. Los soportes de fármacos liposomales pueden proteger la molécula de un fármaco de la degradación, a la vez que mejora su captación por parte de las células. Además, los soportes de fármacos liposomales pueden encapsular o unirse a ciertos compuestos mediante interacciones electroestáticas y de otro tipo, y pueden interactuar con membranas celulares con carga negativa para iniciar su transporte a través de la membrana.

30 La comprensión del ARN regulador y el desarrollo de interferencia por ARN (ARNi), terapia con ARNi, fármacos de ARN, terapia antisentido, y terapia génica, entre otras, ha aumentado la necesidad de medios efectivos para introducir agentes de ácidos nucleicos activos en células. En general los ácidos nucleicos son estables durante tiempos limitados en células o plasma. Sin embargo, agentes basados en ácidos nucleicos pueden ser estabilizados en composiciones y formulaciones que pueden entonces dispersarse para su administración celular.

35 Esta revelación proporciona compuestos, métodos y usos para mejorar la administración sistémica y local de fármacos y moléculas biológicamente activas. Entre otras cosas, esta solicitud proporciona compuestos y composiciones novedosas para elaborar y utilizar estructuras y soportes que aumenten la eficacia de la administración de moléculas biológicamente activas.

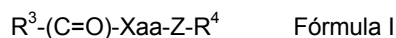
Breve resumen

40 La presente revelación proporciona compuestos novedosos, composiciones y formulaciones para la administración intracelular e *in vivo* de agentes farmacológicos para su uso, finalmente, como un agente terapéutico. Los compuestos y composiciones de esta revelación son de utilidad para la administración de agentes farmacológicos a células, tejidos, órganos o compartimentos seleccionados para modificar el estado de una enfermedad o un fenotipo.

45 En algunos aspectos, esta revelación proporciona compuestos, composiciones y métodos para administrar estructuras de ARN a células para producir la respuesta de interferencia por ARN, efectos antisentido, o la regulación de la expresión genómica.

La presente invención proporciona una variedad de lipoaminoácidos que son compuestos lipofílicos para su uso en la administración y entrega de agentes farmacológicos y en sistemas de administración. Los lipoaminoácidos de la presente revelación son moléculas que contienen un residuo de aminoácido y una o más colas lipofílicas.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto que comprende la estructura mostrada en la Fórmula I para su uso en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad mediante la administración *in-vivo* a una célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos, o un agente biológicamente activo,



5 en donde

Xaa es norarginina o una versión N-metilada de la misma;

R³ es independientemente un alquilo C(6-22) o alqueno C(6-22) sustituido o no sustituido;

R⁴ es independientemente un alquilo C(6-22) o alqueno C(6-22) sustituido o no sustituido; y Z es NH

y sales de los mismos.

10 En ciertos modos de realización, R³ y R⁴ pueden ser alquilo C(6-22) y pueden ser iguales o diferentes. En algunos modos de realización R³ y R⁴ pueden ser alqueno C(6-22) y pueden ser iguales o diferentes.

En algunos aspectos, el compuesto de lipoaminoácidos puede ser un multímero de dos o más compuestos de lipoaminoácidos que están entrecruzados.

15 En algunos modos de realización, el compuesto de lipoaminoácidos puede ser un conjugado que tiene un péptido conjugado a la cadena lateral del residuo de aminoácido.

En ciertos modos de realización, el compuesto de lipoaminoácidos puede estar enlazado a una estructura oligomérica o polimérica.

En algunos modos de realización, el compuesto de lipoaminoácidos puede estar enlazado a un compuesto farmacéutico.

20 En algunos aspectos, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos y uno o más ácidos nucleicos terapéuticos. Los ácidos nucleicos terapéuticos pueden ser un silenciador génico, o un inductor de ARNi, o un ARN de cadena doble, o un ARNm, o puede contener un nucleósido modificado.

25 En algunos modos de realización, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos y uno o más lípidos no aminoácidos o lípidos poliméricos adicionales. En algunos modos de realización, la composición puede contener hemisuccinato de colesterol.

En algunos aspectos, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos y uno o más ácidos nucleicos que pueden formar un complejo con un lipoaminoácido.

30 En ciertos modos de realización, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos que forman liposomas.

En algunos aspectos, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos que forman una emulsión.

En algunas realizaciones, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos que forman una dispersión micelar.

35 En ciertos aspectos, la presente revelación abarca composiciones que contienen uno o más compuestos de lipoaminoácidos y uno o más agentes farmacológicos o agentes biológicamente activos.

En algunos aspectos, los compuestos y composiciones de la invención son para su uso en métodos para la administración de un ácido nucleico terapéutico a una célula preparando una composición que contenga uno o más compuestos de lipoaminoácidos y tratando una célula con la composición.

40 En algunos modos de realización, los compuestos y composiciones de la invención son para su uso en métodos para inhibir la expresión de un gen en una célula, que comprende la preparación de una composición que contiene uno o más compuestos lipoaminoácidos de la invención y el tratamiento de una célula con la composición.

En ciertos aspectos, los compuestos y composiciones de la invención son para su uso en métodos para inhibir la expresión de un gen en un mamífero que comprende preparar una composición que contiene uno o más compuestos de lipoaminoácidos y administrar la composición al mamífero.

5 En algunos modos de realización los compuestos y composiciones de la invención se utilizan en métodos para tratar una enfermedad en un humano, siendo la enfermedad seleccionada de artritis reumatoide, enfermedad hepática, encefalitis, fractura de huesos, enfermedad cardíaca, enfermedad vírica incluyendo hepatitis y la gripe, y cáncer, que comprende preparar una composición que contiene uno o más compuestos de lipoaminoácidos de la invención y administrar la composición al humano.

10 En algunos aspectos, la presente revelación abarca usos de compuestos y composiciones de la invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad que incluye artritis reumatoide, enfermedad hepática, encefalitis, fractura de huesos, enfermedad cardíaca, enfermedad vírica incluyendo hepatitis y la gripe, y cáncer.

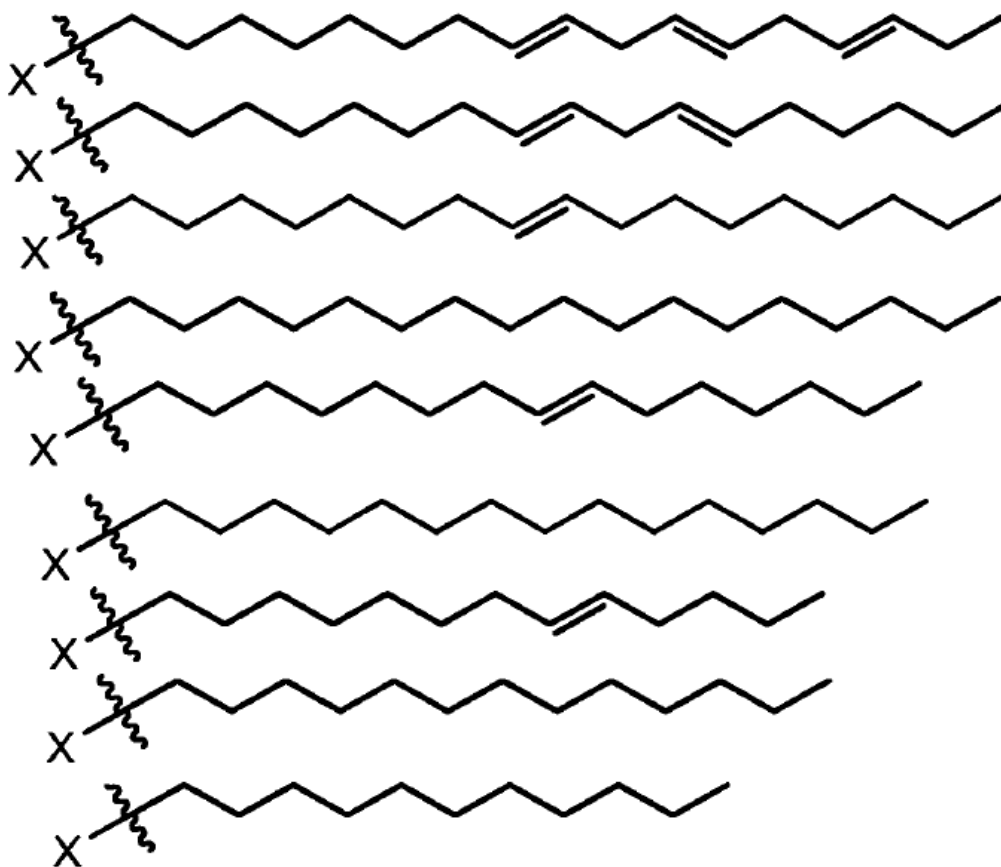
La presente invención además proporciona un compuesto que comprende la estructura que se muestra en la Fórmula I



15 en donde

Xaa es norarginina o una versión N-metilada de la misma;

R^3 y R^4 son independientemente colas lipofílicas que tienen una de las siguientes estructuras



o una cola derivada del ácido araquidónico o del ácido eicosapentaenoico; y

20 Z es NH,

y sales de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representación esquemática de un modo de realización liposomal de la presente invención en el que los lipoaminoácidos forman una vesícula de doble capa 10 junto con otros lípidos. En este modo de realización, la capa exterior del liposoma está protegida por cadenas de polietilenglicol 20 unidas a un grupo de cabeza de uno de los lípidos. La capa exterior del liposoma también presenta un ligando 30 para el establecimiento específico como diana de una célula o tejido. La vesícula liposomal contiene, en este modo de realización, una carga de componentes de ARN de interferencia activos que incluyen una nanopartícula de ARN condensado 40, un conjugado de un péptido doble de ARN de cadena doble 50, un ARNm de cadena triple 60, ARN de sustrato de Dícer 70, ARNbc con un largo extremo saliente (overhang) 80, y un ARNsi con extremos romos (blunt ends) 90, que se encuentran agrupados en este modo de realización.

Figura 2: Micrografía electrónica de transmisión obtenida en un microscopio JEOL 1230 TEM de una realización liposomal de la presente invención que muestra partículas de vesícula de doble capa lipídica esférica formada con el lipoaminoácido C12-norArg-C12. El marcador de longitud de la micrografía es de 0,5 micrómetros, y la muestra se coloreó con acetato de uranilo al 3%. La parte lipídica de la formulación liposomal fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12 / DSPC / colesterol / DSPE-PEG-2000] en las cantidades de [30%/20%/49%/1%] respectivamente, como un porcentaje molar del lípido total. Los liposomas contenían el ARNbc DX3030 del sustrato de Dícer activo anti-gripe.

Figura 3: En la figura 3 se muestra un ejemplo de actividad de disminución de la expresión de genes (knockdown) de PPIB, obtenido a partir de un ensayo *in vitro* en células A549. La respuesta de concentración en 25, 10, 1 y 0,1 nM ARN de los valores de expresión de ARNm de PPIB normalizados para dos formulaciones de lipoaminoácidos de un ARN de interferencia, se compararon con los resultados para RNAiMAX. La formulación 1 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL (50/32/18)] y la formulación 2 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE (50/32/18)]. La disminución de la expresión de genes de PPIB mediante un ARN de interferencia en una composición de lipoaminoácidos de la presente revelación puede exceder la obtenida con RNAiMAX.

Figura 4: En la Figura 4 se muestra un ejemplo de la actividad de disminución de la expresión de genes de LacZ, obtenido a partir de un ensayo *in vitro* en células 9L/LacZ. La respuesta de concentración a 25, 10, 1 y 0,1 nM ARN de los valores de expresión de beta-galactosidasa normalizados para dos formulaciones de lipoaminoácidos de un ARN de interferencia, se comparó con los resultados para RNAiMAX. La formulación 1 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL (50/32/18)] y la formulación 2 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE (50/32/18)]. La disminución de la expresión de genes de LacZ en una composición de lipoaminoácidos de la presente revelación puede exceder la obtenida con RNAiMAX.

Figura 5: En la Figura 5 se muestra un ejemplo de actividad de disminución de expresión de genes de ApoB, obtenido a partir de un ensayo *in vitro* en células HepG2. Se muestra la respuesta de concentración a 25, 10, 1 y 0,1 nM ARN de los valores de expresión de ApoB normalizados para tres formulaciones de lipoaminoácidos de un ARN de interferencia. La formulación 1 fue [lípido no-aminoácido catiónico/DSPC/cholesterol/DMPE-PEG2k (40/10/48/2)]. Las formulaciones 2 y 3 fueron ambas [C18:1 -norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)].

Descripción detallada

La presente revelación hace referencia en general a compuestos novedosos, composiciones y usos de los mismos para la administración de agentes farmacológicos. Los compuestos y composiciones de la presente revelación son de utilidad para la administración de agentes terapéuticos a células, tejidos, órganos o sujetos seleccionados.

La presente revelación hace referencia en general a la química de lípidos y a los usos de estructuras similares a los lípidos y materiales para efectuar la administración de un fármaco.

Los compuestos y composiciones de esta revelación son de utilidad para la administración de agentes terapéuticos, profilácticos, y de diagnóstico tales como ácidos nucleicos, poli-nucleótidos, péptidos, proteínas, y compuestos y fármacos de moléculas pequeñas.

Los compuestos y composiciones de esta revelación son de utilidad para la administración de agentes terapéuticos en formas tales como liposomas, vesículas lamelares, emulsiones, micelas, suspensiones, partículas, y soluciones. Estas formas pueden incluir nanopartículas de diversos diámetros.

En algunos aspectos, los compuestos y composiciones de esta revelación son de utilidad para la administración de un agente terapéutico en un liposoma. En estos modos de realización se puede hacer referencia al agente terapéutico como la carga. Por ejemplo, la Figura 1 muestra una representación esquemática de un modo de realización liposomal de esta invención en el que los lipoaminoácidos forman una vesícula de doble capa 10 junto con otros lípidos. En este modo de realización, la capa exterior del liposoma está protegida por cadenas de polietilenglicol 20 enlazadas a un grupo de cabeza de uno de los lípidos. La capa exterior del liposoma también

5 presenta un ligando 30 para el específico establecimiento como diana de una célula o tejido. La vesícula liposomal contiene, en este modo de realización, una carga de componentes del ARN de interferencia activos que incluye una nanopartícula de ARN condensado 40, un conjugado de péptido doble de ARN de cadena doble 50, un ARNmd de tres cadenas 60, un ARN de sustrato de Dícer 70, un ARNbc con un extremo saliente grande 80, y un ARNsi con extremos romos 90, que se encuentran agrupados en esta realización. Otras formas de carga terapéutica pueden incluir microARN o formas de horquilla de ARN.

10 En algunos aspectos, los compuestos y composiciones de la presente revelación pueden proporcionar la administración de agentes terapéuticos en formas o composiciones liberables. Las formas y composiciones liberables incluyen moléculas que se unen a y liberan un agente activo, moléculas que se unen a un agente activo y descargan una fracción que ayuda en la liberación del agente, moléculas que se unen a un agente activo y que posteriormente son moduladas en su forma dentro de un compartimento biológico para ayudar en la liberación del agente, y composiciones que contienen moléculas que se unen a un agente activo mezclado con un compuesto mediador de liberación.

Lipoaminoácidos

15 La presente invención proporciona un rango de lipoaminoácidos que son compuestos lipofílicos para su uso en la administración y entrega de agentes farmacológicos y en sistemas de administración de fármacos. Los lipoaminoácidos de esta revelación son moléculas que contienen un residuo de aminoácido y una o más colas lipofílicas.

20 Los lipoaminoácidos de la presente revelación pueden mostrar baja citotoxicidad. En algunas realizaciones, los lipoaminoácidos de esta revelación pueden proporcionar efectos citoprotectores en relación a lípidos de otras estructuras.

En algunos aspectos, los lipoaminoácidos de la presente revelación pueden proporcionar la administración de un agente terapéutico en una forma liberable. Las formas y composiciones liberables están diseñadas para proporcionar una captación suficiente de un agente por parte de una célula para proporcionar un efecto terapéutico.

25 Las formas liberables incluyen lipoaminoácidos que se unen a y liberan un agente activo. En algunos modos de realización, la liberación del agente activo puede estar provista por un conector lábil al ácido.

30 Ejemplos de conectores lábiles al ácido incluyen conectores que contienen un grupo ortoéster, una hidrazona, cis-acetonilo, acetal, cetel, éter de sililo, silazano, una imina, anhídrido citricónico, anhídrido maleico, éter de corona, éter de azacorona, éter de tiacorona, un grupo ditiobencilo, ácido cis-acetónico, alcatrieno cis-carboxílico, ácido metacrílico, y mezclas de los mismos.

Ejemplos de grupos y conectores lábiles al ácido se proporcionan en las Patentes estadounidenses Nos. 7.098.032; 6.897.196; 6.426.086; 7.138.382; 5.563.250; y 5.505.931.

35 Las formas liberables de los compuestos y composiciones de la presente revelación incluyen moléculas que se unen a un agente activo y descargan una fracción que ayuda en la liberación del agente. En algunos modos de realización, un lipoaminoácido puede incluir un grupo que libera una molécula pequeña tal como etanol, que ayuda a administrar un agente a una célula. Un lipoaminoácido puede unirse a un agente activo y, posteriormente al contacto con una célula, o posteriormente al transporte dentro de un compartimento biológico que tenga un pH local inferior al pH fisiológico, ser hidrolizado en un ambiente ácido para liberar etanol para ayudar en la administración del agente. En algunas realizaciones, una molécula pequeña tal como el etanol, que ayuda en la administración del agente, puede estar unida a un componente lipídico.

40 En algunos modos de realización, un lipoaminoácido puede mezclarse con un compuesto que libera una molécula pequeña tal como etanol para ayudar a administrar un agente a una célula.

45 Las formas liberables de compuestos y composiciones de esta revelación incluye lipoaminoácidos que pueden unirse a un agente activo y, posteriormente al contacto con una célula, o posteriormente a su transporte dentro de un compartimento biológico que tenga un pH local inferior al pH fisiológico, ser modulados en un ambiente ácido en una forma catiónica para ayudar en la liberación del agente.

En algunas realizaciones, un lipoaminoácido puede unirse a un agente activo, y puede mezclarse con un compuesto que puede ser modulado en un ambiente ácido en una forma catiónica para ayudar en la liberación de un agente activo.

Ejemplos de grupos hidrolizables y modulables se proporcionan en las Patentes estadounidenses Nos. 6.849.272; 6.200.599; además de en Z. H. Huang y F. C. Szoka, "Bioresponsive liposomes and their use for macromolecular delivery," en: G. Gregoriadis (ed.), Liposome Technology, 3ª ed. (CRC Press 2006).

5 En algunos modos de realización, las formas liberables de los compuestos y composiciones de esta revelación incluyen lipoaminoácidos que pueden unirse a un agente activo, y pueden mezclarse con un lípido o compuesto que puede ser modulado en un ambiente ácido en una forma neutra para ayudar en la liberación de un agente activo. Puede accederse al ambiente ácido posteriormente al contacto con la célula, o posteriormente a su transporte dentro de un compartimento biológico que tenga un pH local inferior al pH fisiológico.

10 Ejemplos de lípidos que son modulables de formas aniónicas a formas neutras incluyen hemisuccinato de colesterilo (CHEMS) según se describe en las Patentes estadounidenses Nos. 6.897.196; 6.426.086; y 7.108.863.

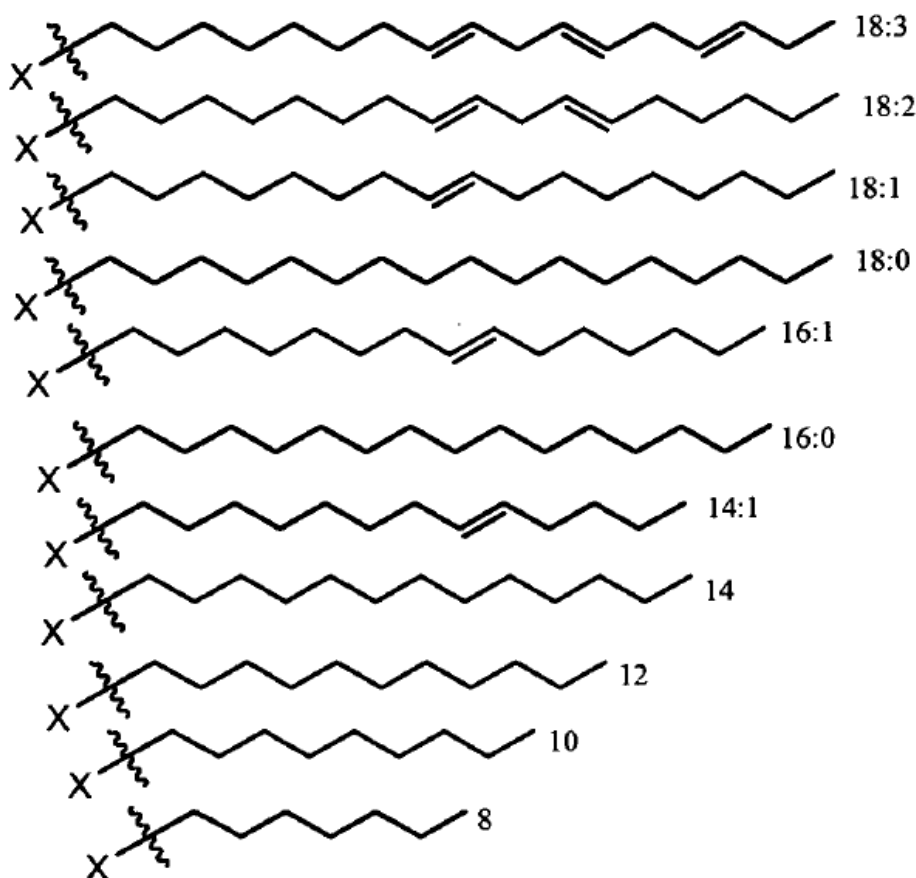
En algunos modos de realización, las formas liberables de los compuestos y composiciones de la presente revelación incluyen lipoaminoácidos que pueden unirse a un agente activo, y pueden mezclarse con un material polimérico sensible al pH.

Ejemplos de materiales poliméricos sensibles al pH se proporcionan en la Patente estadounidense No. 6.835.393.

15 En algunos modos de realización, la liberación del agente activo puede ser proporcionada mediante un péptido escindible por enzimas.

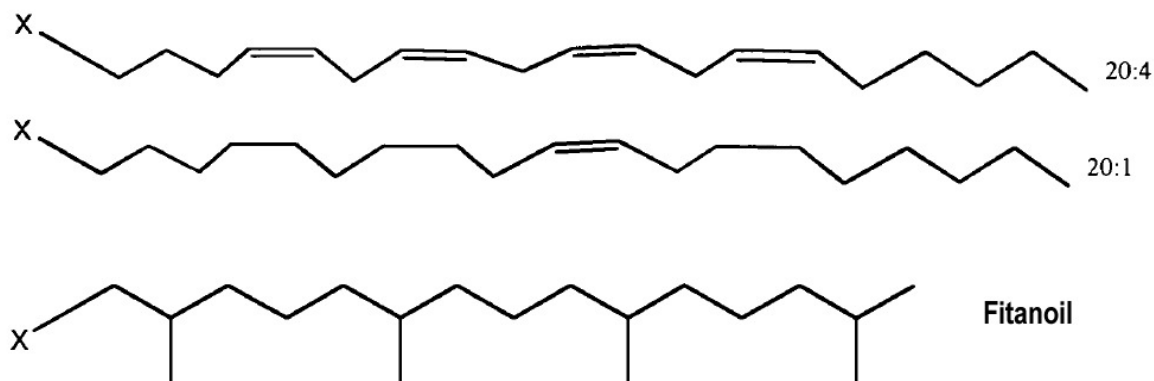
En algunos modos de realización, R³ y R⁴ pueden ser independientemente alquilo C3, alquilo C4, alquilo C5, alquilo C6, alquilo C7, alquilo C8, alquilo C9, alquilo C10, alquilo C11, alquilo C12, alquilo C13, alquilo C14, alquilo C15, alquilo C16, alquilo C17, alquilo C18, alquilo C19, alquilo C20, alquilo C21, o alquilo C22.

20 En algunos modos de realización, R³ y R⁴ pueden ser independientemente colas lipofílicas que tengan una de las siguientes estructuras:



En las estructuras anteriores, X representa el átomo de la cola que está directamente enlazado al terminal del residuo de aminoácido, y se cuenta como uno de los átomos en la designación numérica, por ejemplo, "18:3". En algunos modos de realización, X puede ser un átomo de carbono, nitrógeno, u oxígeno.

- 5 En algunos modos de realización, R³ y R⁴ pueden ser independientemente colas lipofílicas que tengan una de las siguientes estructuras:



donde X es tal como se define anteriormente.

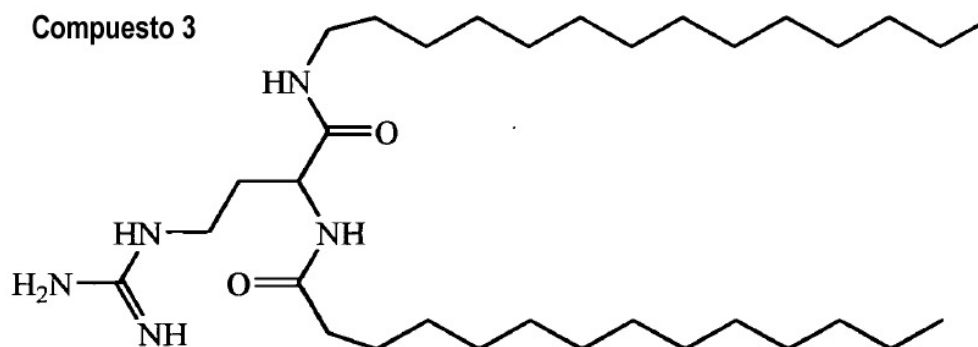
- 10 En algunos modos de realización, R³ y R⁴ pueden derivarse independientemente de colas similares a ácidos grasos, tales como colas de alquenoilo (C14:0) de ácido mirístico, alquenoilo (C16:0) de ácido palmítico, alquenoilo (C18:1, doble enlace en el carbono 9) de ácido oleico, alquenoilo (C18:2, doble enlace en el carbono 9 o 12) de ácido linoleico, alquenoilo (C18:3, doble enlace en el carbono 9, 12, o 15) de ácido linoleico, alquenoilo (C20:4, doble enlace en el carbono 5, 8, 11, o 14) de ácido araquidónico, y alquenoilo (C20:5, doble enlace en el carbono 5, 8, 11, 14, o 17) de ácido eicosapentaenoico. Otros ejemplos de colas similares a ácidos grasos se encuentran en Donald Voet y Judith Voet, Biochemistry, 3ª Edición (2005), p. 383.

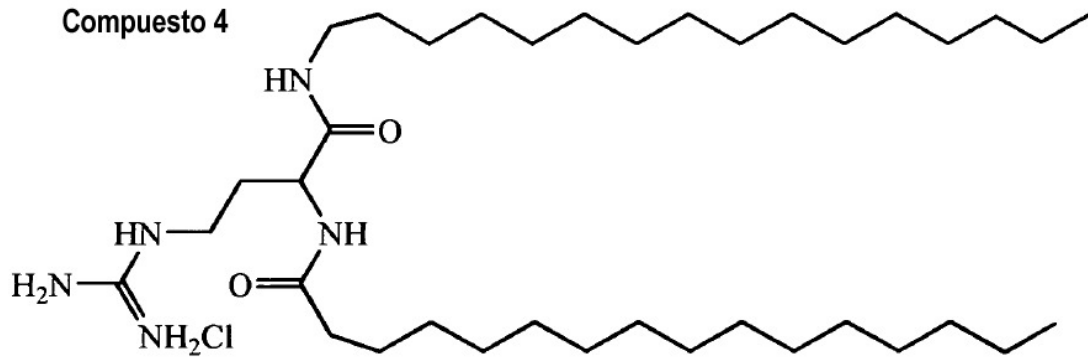
- 15 En algunas realizaciones, R³ y R⁴ pueden derivarse independientemente de un isoprenoide.

- 20 En general, un compuesto puede contener uno o más centros quirales. Compuestos que contienen uno o más centros quirales pueden incluir los descritos como un "isómero", un "estereoisómero", un "diastereoisómero", un "enantiómero", un "isómero óptico", o como una "mezcla racémica". Las convenciones para la nomenclatura estereoquímica, por ejemplo las reglas de denominación de Cahn, Ingold y Prelog, además de métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de los estereoisómeros, son conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Michael B. Smith y Jerry March, March's Advanced Organic Chemistry, 5ª edición, 2001. Los compuestos y estructuras de esta revelación están pensados para abarcar todos los posibles isómeros, estereoisómeros, diastereoisómeros, enantiómeros, y/o isómeros ópticos que se entendería que existen para el compuesto o estructura específicos, incluyendo cualquier mezcla, racémica o de otro tipo, de los mismos.

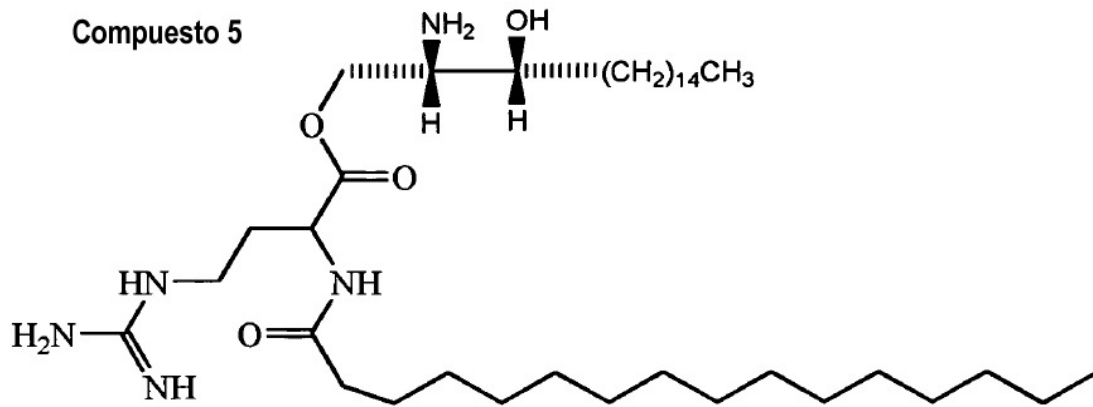
- 25 Ejemplos de lipoaminoácidos incluyen R³-(C=O)-Arg-NH-R⁴ en donde Arg es D- o L-arginina, y R³ y R⁴ son independientemente alquilo o alquenoilo.

Ejemplos de lipoaminoácidos incluyen las siguientes estructuras:

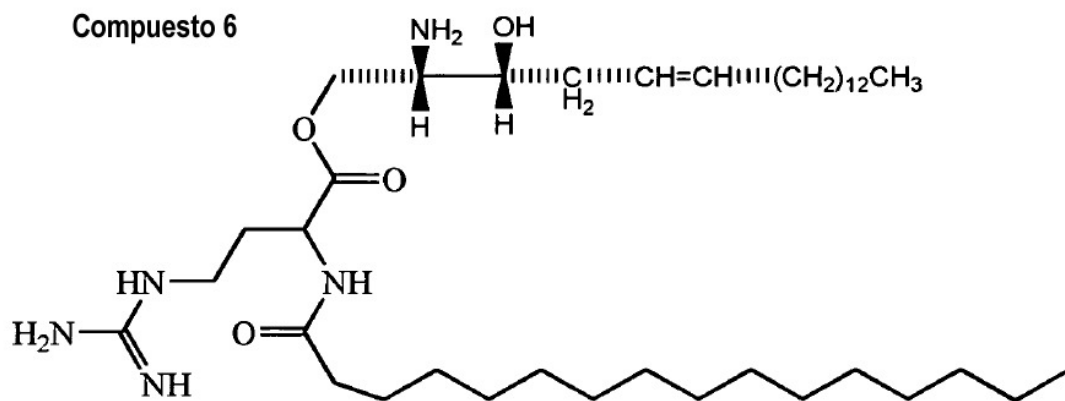




Ejemplos de lipoaminoácidos incluyen las siguientes estructuras:

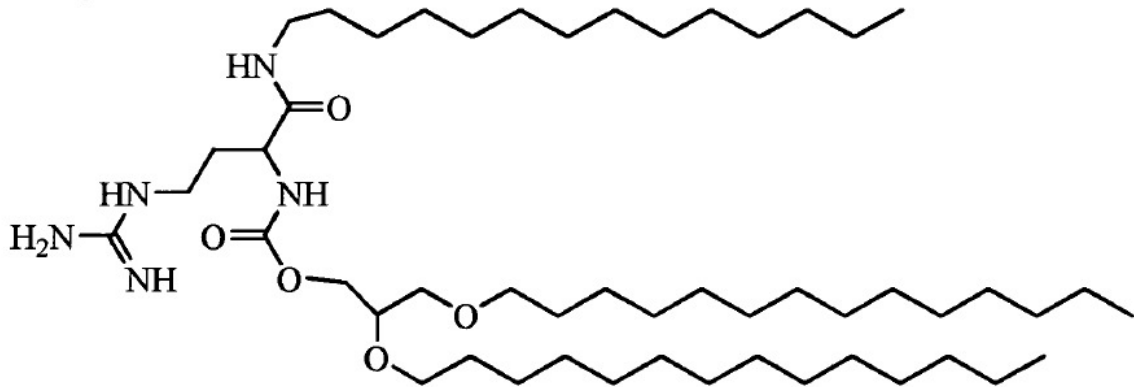


5

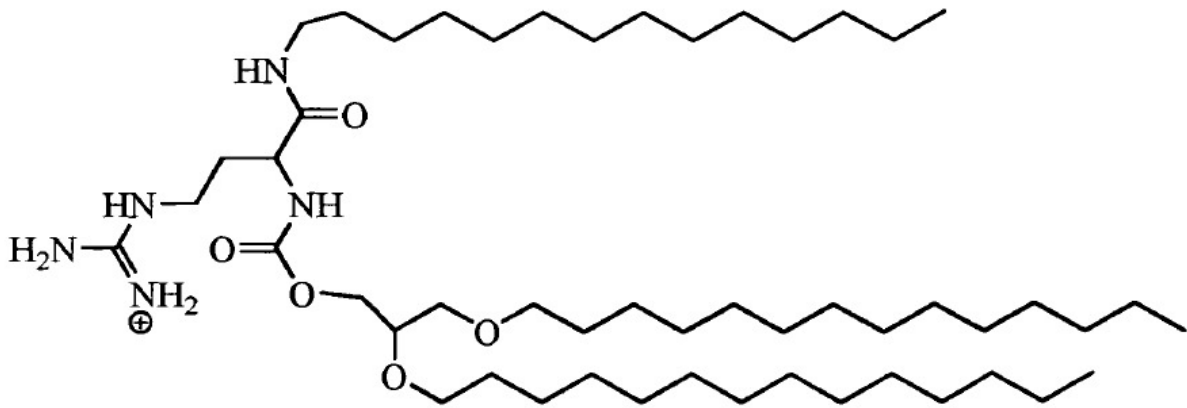


Ejemplos de lipoaminoácidos incluyen las siguientes estructuras:

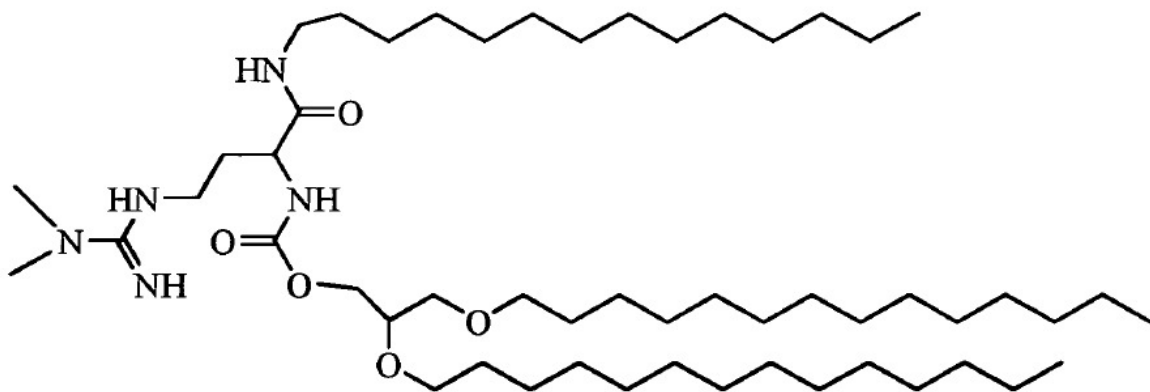
Compuesto 7



Compuesto 8



Compuesto 9

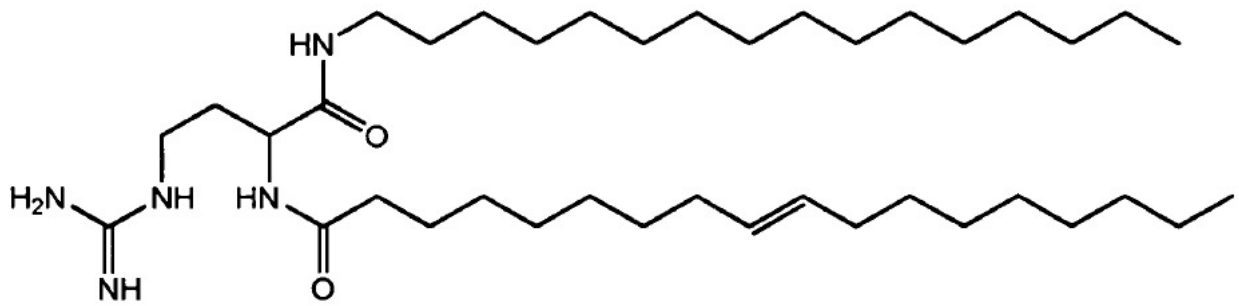


5

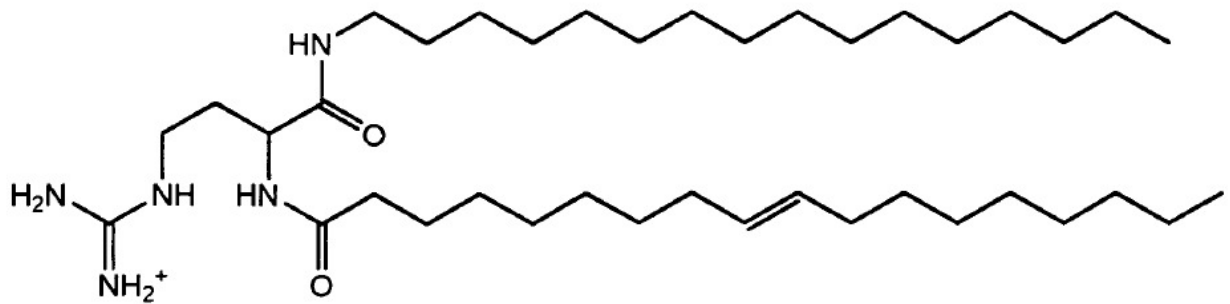
Ejemplos de lipoa aminoácidos incluyen R3-(C=O)-norArg-NH-R4 en donde norArg es D- o L-norarginina, y R3 y R4 son independientemente alquilo o alqueniilo.

Ejemplos de lipoa aminoácidos incluyen las siguientes estructuras:

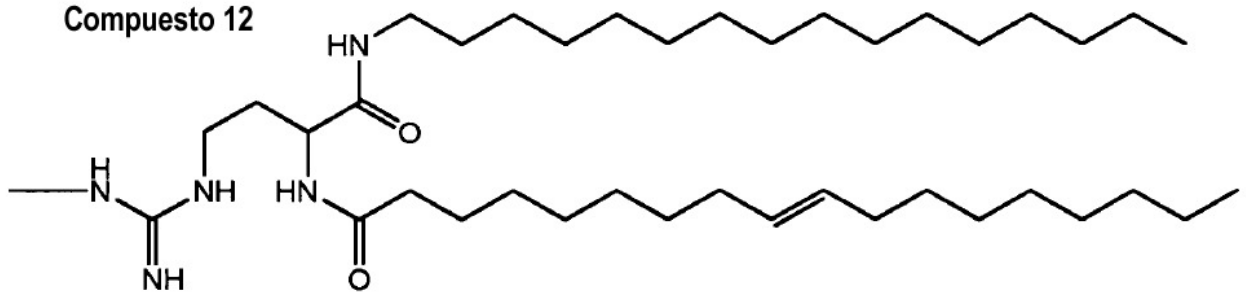
Compuesto 10



Compuesto 11

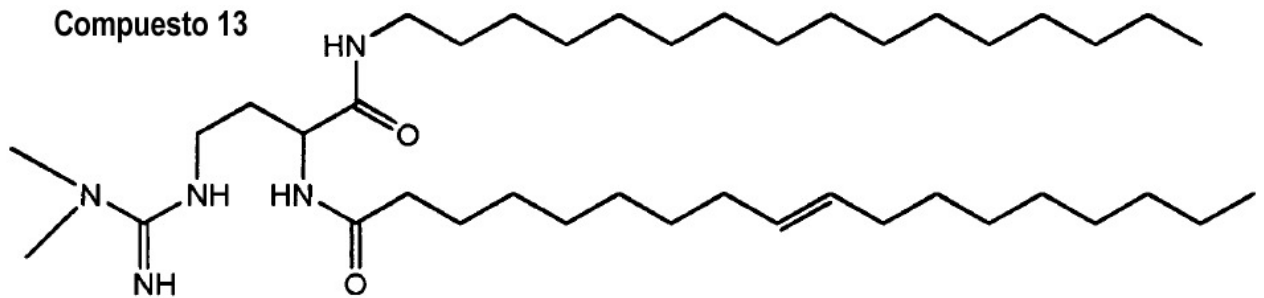


Compuesto 12

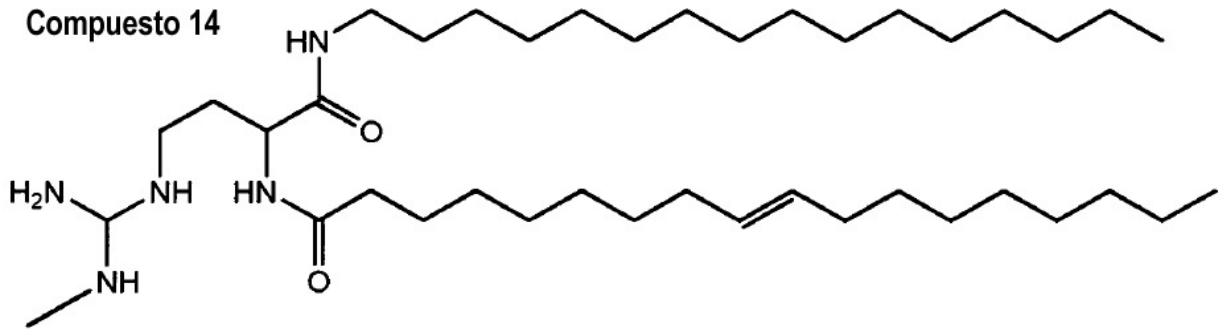


5

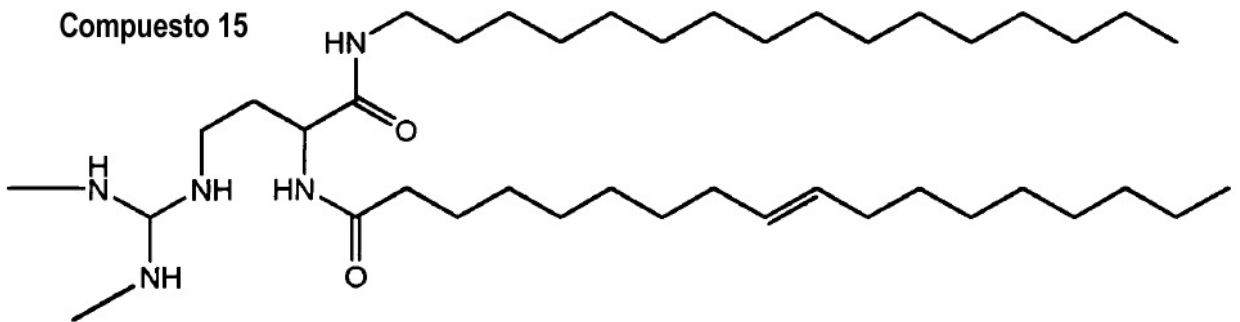
Compuesto 13



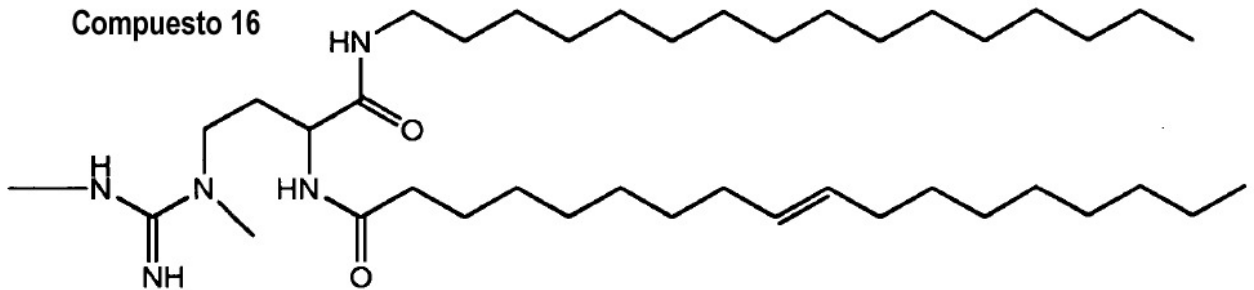
Compuesto 14



Compuesto 15

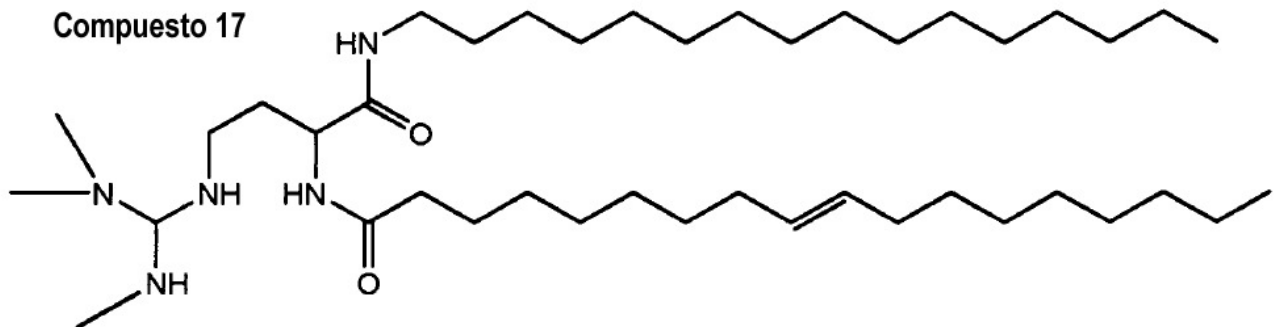


Compuesto 16

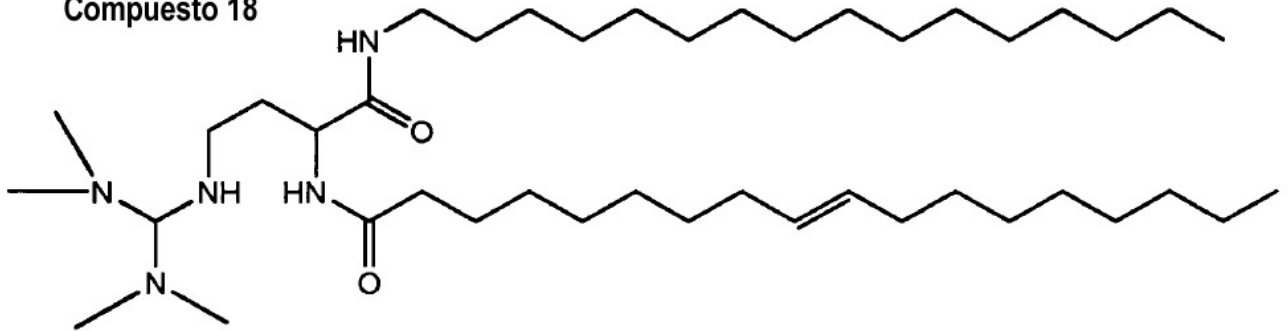


5

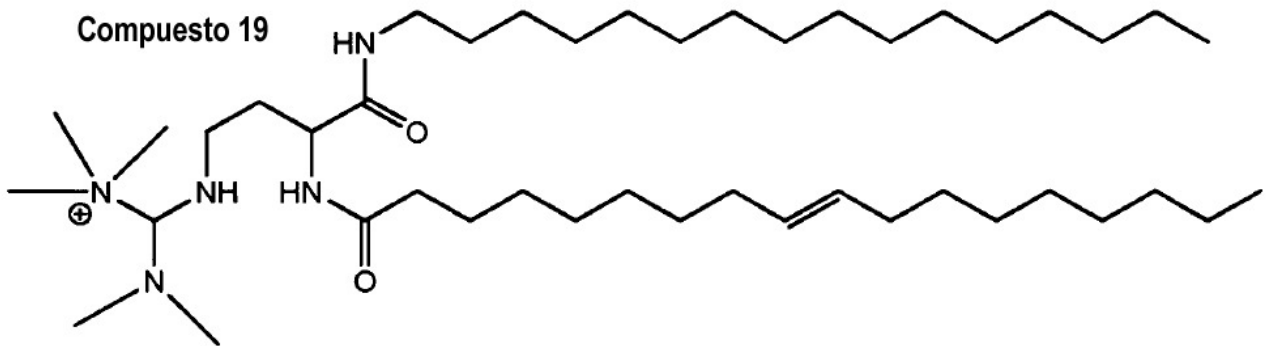
Compuesto 17



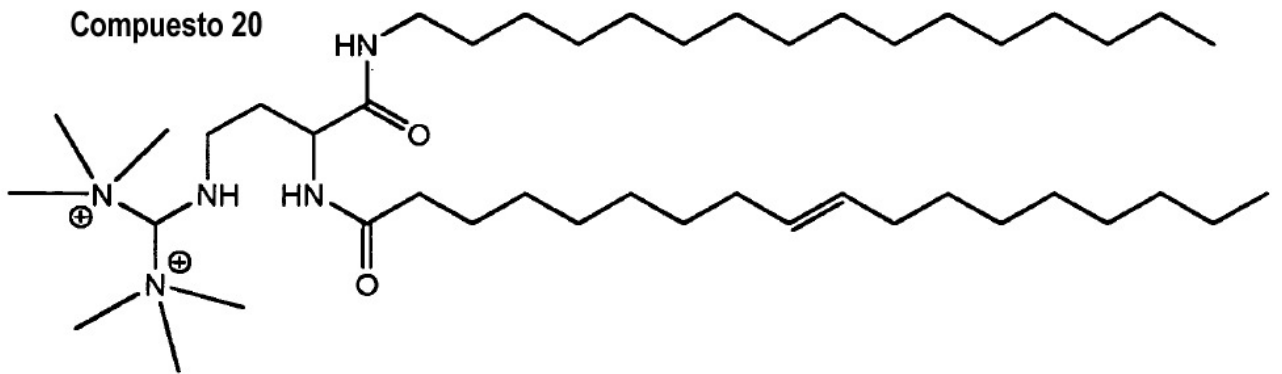
Compuesto 18



Compuesto 19



Compuesto 20



5

Ejemplos de lipoaminoácidos incluyen

- (aciloC10)-norArg-NH-(alquiloC10), (aciloC14)-norArg-NH-(alquiloC14),
- (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC16), (aciloC18)-norArg-NH-(alquiloC18),
- (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC12), (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC12),

10 (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC18), N-(4-guanidino-1-oxo-1-(dodecilamino)butan-2-il)dodecanamida que es C12-norArg-C12, o N-(4-guanidino-1-oxo-1-(hexadecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida que es (oleico)C18-norArg-C16.

En general, la designación "C14-norArg-C14", por ejemplo, hace referencia a (alquiloC13)-(C=O)-norArg-NH-(alquiloC14) que es igual a (aciloC14)-norArg-NH-(alquiloC14).

5 Los lipoaminoácidos pueden prepararse como especies poliméricas y multiméricas, tales como dímeros, trímeros o tetrámeros. Las especies poliméricas o multiméricas pueden prepararse a partir de un único lipoaminoácido, o a partir de más de una especie. Las especies de lipoaminoácidos poliméricas o multiméricas pueden prepararse en algunos modos de realización proporcionando un grupo sulfhídrico u otros grupos entrecruzables en una cadena lateral del aminoácido, o con estructuras de aminoácidos ligadas o unidas tales como desmosina o citrulina. En otros modos de realización, una especie de lipoaminoácidos poliméricos o multiméricos puede ser preparada con sustancias químicas conectoras bioconjugadas.

10 Un lipoaminoácido puede ser preparado como un conjugado que tiene una cadena peptídica o polimérica unida de forma covalente a la cadena lateral del aminoácido. La cadena peptídica o polimérica puede unirse utilizando un grupo reactivo de la cadena de aminoácido. Pueden utilizarse diversos grupos conectores tales como NHS, maleimido, y técnicas de bioconjugado y de conectores.

Los lipoaminoácidos pueden prepararse como constructos unidos a una estructura oligomérica o polimérica. Por ejemplo, un lipoaminoácido puede estar unido a polietilenglicol, polipropilenglicol, una red o estructura de oligonucleótidos, un poli(aminoácido), un carbohidrato, un dextrano, un hidrogel, o un almidón.

15 Los lipoaminoácidos pueden ser preparados como constructos unidos a un compuesto farmacológico o composición farmacéutica, o a un agente biológicamente activo. Por ejemplo, un lipoaminoácido puede estar conjugado con un fármaco de ácido nucleico tal como un ARN de interferencia o regulador.

20 Los compuestos y composiciones de esta revelación pueden incorporar grupos solubilizantes o de funcionalización o estructuras, incluyendo estructuras poliméricas. Ver, por ejemplo, L. Dunn y R. M. Ottenbrite, Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symp. Ser. 469 (1991). Los lipoaminoácidos pueden ser derivados para aumentar la solubilidad tal como, por ejemplo, para unirse a un diol, para preparar un amonio cuaternario o grupo cargado, para unirse a grupos hidroxilo o amina tales como alcoholes, polioles, o poliéteres, o para unirse a polietilimina, un polietilenglicol o polipropilenglicol. La masa molecular de un componente polimérico unido tal como el polietilenglicol puede tener cualquier valor, por ejemplo, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, o 30,000 Da, o mayor. Por ejemplo, una cadena de polietilenglicol puede unirse a través de un grupo amino u otros grupos reactivos de una cadena lateral de aminoácidos.

25 En general, tal como se utiliza en la presente patente, los términos químicos generales hacen referencia a todos los grupos de un tipo específico, incluyendo a grupos que tienen cualquier número y tipo de átomos, a menos que se especifique de otro modo. Por ejemplo, "alqueno" hace referencia ampliamente a alquenos que tienen 2 a 22 átomos de carbono, según se define más adelante, mientras que alqueno(C18:1) hace referencia a alquenos que tienen 18 átomos de carbono y un enlace doble.

30 El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un grupo alifático saturado, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido que contiene de 1 a 22 átomos de carbono. Esta definición se aplica a la parte alquilo de otros grupos tales como, por ejemplo, alcoxi, alcanoil, aralquilo, y otros grupos definidos más adelante. El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un anillo alquilo cíclico saturado, sustituido o no sustituido que contiene de 3 a 12 átomos de carbono. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "alquiloC(15)" incluye alquiloC(1), alquiloC(2), alquiloC(3), alquiloC(4), y alquiloC(5). Igualmente, el término "alquiloC(3-22)" incluye alquiloC(1), alquiloC(2), alquiloC(3), alquiloC(4), alquiloC(5), alquiloC(6), alquiloC(7), alquiloC(8), alquiloC(9), alquiloC(10), alquiloC(11), alquiloC(12), alquiloC(13), alquiloC(14), alquiloC(15), alquiloC(16), alquiloC(17), alquiloC(18), alquiloC(19), alquiloC(20), alquiloC(21), y alquiloC(22).

35 El término "alqueno" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un alquilo o cicloalquilo insaturado, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 22 átomos de carbono y al menos un enlace doble carbono-carbono. El término "alquino" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un alquilo o cicloalquilo insaturado, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 22 átomos de carbono y al menos un enlace triple carbono-carbono.

40 El término "alcoxi" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, o alquino enlazado de forma covalente a un átomo de oxígeno. El término "alcanoil" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a alquilo-C(=O), que puede alternativamente denominarse como "acilo". El término "alcanoiloxi" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a grupos alquilo-O-C(=O). El término "alquilamino" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia al grupo -NRR', donde R y R' son cada uno hidrógeno o alquilo, y al menos uno de R y R' es alquilo. Alquilamino incluye grupos tales como piperidino en donde R y R' forman un anillo. El término "alquilaminoalquilo" hace referencia a alquilo-NRR'.

45 El término "arilo" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a cualquier sistema de anillos de carbono monocíclico, bicíclico, o policíclico estable de 4 a 12 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático. Algunos ejemplos de arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, y bifenilo. Cuando un

sustituyente arilo es bicíclico y un anillo es no aromático, debe entenderse que el enlace es con el anillo aromático. Un arilo puede ser sustituido o no sustituido.

El término "heteroarilo" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a cualquier sistema de anillos de carbono monocíclico, bicíclico, o policíclico estable de 4 a 12 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático y contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. Algunos ejemplos de un heteroarilo incluyen acridinilo, quinoxalinilo, pirazolilo, indolilo, benzotriazolilo, furanilo, tienilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo, y tetrahidroquinolinilo. Un heteroarilo incluye el derivado N-óxido de un heteroarilo que contiene nitrógeno.

El término "heterociclo" o "heterociclijo" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un sistema de anillos aromático o no aromático, de cinco a veintidós átomos, en donde de 1 a 4 de los átomos de anillo son heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, y azufre. Por tanto, un heterociclo puede ser un heteroarilo o una versión dihidro o tetrahidro del mismo.

El término "arilo" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un radical arilo derivado de un ácido carboxílico aromático, tal como un ácido benzoico sustituido. El término "aralquilo" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a cualquier grupo arilo enlazado a un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo bencilo.

El término "carboxilo" tal como se utiliza en la presente patente, representa un grupo de la fórmula $-C(=O)OH$ o $-C(=O)O-$. Los términos "carbonilo" y "acilo" tal como se utilizan en la presente patente, hacen referencia a un grupo en el que un átomo de oxígeno tiene un enlace doble con un átomo de carbono $>C=O$. El término "hidroxilo" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a $-OH$ o $-O-$. El término "nitrilo" o "ciano" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a $-CN$. El término "halógeno" o "halo" hace referencia a flúor (-F), cloro (-Cl), bromo (-Br), y yodo (-I).

El término "sustituido" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un átomo que tiene una o más sustituciones o sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes y pueden incluir un sustituyente hidrógeno. Por tanto, los términos alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcanilo, alcaniloxi, alquilamino, alquilaminoalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, aroilo, y aralquilo, tal como se utilizan en la presente patente hacen referencia a grupos que incluyen variaciones sustituidas. Las variaciones sustituidas incluyen variaciones lineales, ramificadas, y cíclicas, y grupos que tienen un sustituyente o sustituyentes que reemplazan uno o más hidrógenos enlazados a cualquier átomo de carbono del grupo. Los sustituyentes que pueden ser enlazados a un átomo de carbono del grupo incluyen alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcanilo, alcaniloxi, alquilamino, alquilaminoalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, aroilo, aralquilo, acilo, hidroxilo, ciano, halo, haloalquilo, amino, aminoacilo, alquilaminoacilo, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, nitro, carbamilo, carbamoilo, y heterociclo. Por ejemplo, el término etilo incluye sin limitación $-CH_2CH_3$, $-CHFCH_3$, $-CF_2CH_3$, $-CHFCH_2F$, $-CHFCHF_2$, $-CHFCHF_3$, $-CF_2CH_2F$, $-CF_2CHF_2$, $-CF_2CF_3$, y otras variaciones según se ha descrito anteriormente. En general, los sustituyentes pueden ser sustituidos adicionalmente con cualquier átomo o grupo de átomos.

Los lipoaminoácidos de la presente invención o variantes de los mismos pueden ser sintetizados mediante métodos conocidos en el arte.

Se conocen en el arte métodos para preparar diversos grupos orgánicos y grupos protectores, y su uso y modificación se encuentra generalmente dentro de la habilidad de un experto en el arte. Ver, por ejemplo, Stanley R. Sandler y Wolf Karo, *Organic Functional Group Preparations* (1989); Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (1996); Leroy G. Wade, *Compendium Of Organic Synthetic Methods* (1980); ejemplos de grupos protectores se encuentran en T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups In Organic Synthesis* (3^a ed. 1991).

Una sal farmacéuticamente aceptable de una composición de péptidos o proteínas de la presente invención que sea suficientemente básica puede ser una sal de adición ácida con, por ejemplo, un ácido inorgánico u orgánico tal como ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, clorosulfónico, trifluoroacético, cítrico, maleico, acético, propiónico, oxálico, málico, maleico, malónico, fumárico, o tartárico, y ácidos alcanilo- o arenosulfónicos tales como ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, clorobencenosulfónico, toluensulfónico, naftalensulfónico, y canforsulfónico.

Una sal farmacéuticamente aceptable de una composición de péptidos o proteínas de la presente invención que sea suficientemente ácida puede ser una sal de metales alcalinos, por ejemplo, una sal de potasio o de sodio, o una sal de metales alcalinotérreos, por ejemplo, una sal de calcio o magnesio, o una sal de zinc o manganeso, o una sal de amonio o una sal con una base orgánica que proporciona un catión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una sal con metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etilendiamina, trometamina, N-metilglucamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxietil)amina, e incluyendo sales de aminoácidos tales como arginato, y sales de ácidos orgánicos tales como ácidos glucorónico o galacturónico. Ver, por ejemplo, Berge et al., *J. Pharm. Sci.* 66:1-19, 1977.

Una sal o sal farmacéuticamente aceptable de una composición de esta revelación que contenga un agente de ARN de interferencia y un lípido, péptido, o proteína, entre otros componentes, puede contener un complejo de sal del agente de ARN de interferencia y el lípido, péptido, o proteína. Un complejo de sal del agente del ARN de interferencia y el lípido, péptido, o proteína puede estar formado a partir de una sal farmacéuticamente aceptable de un agente de ARN de interferencia, o a partir de una sal farmacéuticamente aceptable del lípido, péptido, o proteína.

Algunos compuestos de la presente revelación pueden contener tanto funcionalidades ácidas como básicas que pueden permitir que los compuestos se produzcan en forma de una sal de adición básica o ácida.

Algunos compuestos, composiciones de péptidos y/o proteínas de la presente invención pueden tener uno o más centros quirales y/o centros isoméricos geométricos (isómeros E- y Z-), y debe entenderse que la invención abarca todos los isómeros ópticos de ese tipo, diastereoisómeros, isómeros geométricos, y mezclas de los mismos.

La presente invención abarca todas y cada una de las formas tautoméricas, solvatadas y no solvatadas, hidratadas o no hidratadas, además de cualquier forma de isótopos de los átomos de los compuestos, composiciones de péptidos y/o proteínas reveladas en la presente patente.

Lípidos de administración adicional

En algunos aspectos de la presente invención, los lipoaminoácidos y los lípidos no aminoácidos adicionales pueden ser empleados para la entrega o administración de componentes de ARN regulador, antagonistas de ARN, ARN de interferencia, o ácidos nucleicos. Más en particular, una composición de la presente invención puede incluir uno o más lipoaminoácidos junto con lípidos catiónicos no aminoácidos y lípidos no catiónicos no aminoácidos.

Los lípidos catiónicos no aminoácidos pueden ser monocatiónicos o policatiónicos. Algunos lípidos catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos neutros y lípidos que tienen aproximadamente una carga neta cero a un pH en particular, por ejemplo, un lípido zwitteriónico (híbrido). Los lípidos no catiónicos no aminoácidos también incluyen lípidos aniónicos.

En algunos modos de realización, una composición es una mezcla o complejo de un componente ARN con un lipoaminoácido y un lípido catiónico no aminoácido. En algunos modos de realización, una composición puede ser una mezcla o un complejo de uno o más agentes de ARN regulador o de interferencia con uno o más lipoaminoácidos y uno o más lípidos catiónicos no aminoácidos.

Los compuestos y composiciones de la presente revelación pueden mezclarse con, o enlazarse a diversos ligandos de fijación de dianas o agentes para administrar un agente activo a una célula, tejido, órgano o región de un organismo. Ejemplos de agentes de fijación de dianas incluyen anticuerpos, ligandos para receptores, péptidos, proteínas, lectinas, (poli)sacáridos, galactosa, manosa, ciclodextrinas, ácidos nucleicos, ADN, ARN, aptámeros, y poliaminoácidos.

Ejemplos de lípidos catiónicos no aminoácidos incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamono (DOTMA); 1,2-bis(oleoiloxi)-3-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 1,2-bis(dimiristoiloxi)-3-3-(trimetilamonio)propano (DMTAP); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE); bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB); 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Chol); 3β-[N',N'-diguanoetilaminoetano)carbamoil]colesterol (BGTC); 2-(2-(3-(bis(3-aminopropil)amino)propilamino)acetamido)-N,N-ditetradecilacetamida (RPR209120); sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus mezclas.

Ejemplos de lípidos catiónicos no aminoácidos incluyen 1,2-dialquenoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolinas (EPCs), tales como 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus mezclas.

Ejemplos de lípidos catiónicos no aminoácidos incluyen 1,2-disteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), y 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA).

Ejemplos de lípidos policatiónicos no aminoácidos incluyen tetrametil tetrapalmitoil espermina (TMTPS), tetrametil tetraoleil espermina (TMTOS), tetrametil tetralauril espermina (TMTLS), tetrametil tetramiristol espermina (TMTMS), tetrametil dioleil espermina (TMDOS), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus mezclas.

Ejemplos de lípidos policatiónicos no aminoácidos incluyen 2,5-bis(3-aminopropilamino)-N-(2-(dioctadecilamino)-2-oxoetil) pentanamida (DOGS); 2,5-bis(3-aminopropilamino)-N-(2-(di(Z)-octadeca-9-dienilamino)-2-oxoetil) pentanamida (DOGS-9-en); 2,5-bis(3-aminopropilamino)-N-(2-(di(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienilamino)-2-oxoetil) pentanamida (DLinGS); 3-beta-(N⁴-(N¹,N³-dicarbobenzoxiespermidina)carbamoil)colesterol (GL-67); (9Z,9'Z)-2-(2,5-bis(3-aminopropilamino)pentanamido)propano-1,3-diil-dioctadec-9-enoato (DOSPER); 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-

carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato (DOSPA); sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus mezclas.

Ejemplos de lípidos catiónicos no aminoácidos incluyen DS404-28 BGTC (CAS 182056-06-0), DOSPER (CAS 178532-92-8), GL-67 (179075-30-0), RPR209120 (CAS 433292-13-8), DOGS (12050-77-7), DOGS (9-en, C18:1), DLinGS (C18:2), and DOTMA (104162-48-3).

Ejemplos de lípidos catiónicos no aminoácidos se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 4.897.355; 5.279.833; 6.733.777; 6.376.248; 5.736.392; 5.334.761; 5.459.127; 2005/0064595; 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992.

En algunos modos de realización, la composición es una mezcla o complejo de un componente de ARN con un lipoaminoácido y un lípido no catiónico no aminoácido. En algunas realizaciones, la composición es una mezcla o complejo de uno o más componentes de ARN con uno o más lipoaminoácidos y uno o más lípidos no catiónicos no aminoácidos.

Los lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos neutrales, zwitteriónico, y aniónico. Por tanto, un lípido zwitteriónico puede contener un grupo de cabeza catiónico.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos 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); ácido 1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatídico (sal de sodio; DLPA); ácido 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatídico (sal de sodio; DMPA); ácido 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico (sal de sodio; DPPA); ácido 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfatídico (sal de sodio; DSPA); 1,2-Diaraquidoil-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 (cloruro o triflato; DPePC); 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC); 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC); 1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE); 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE); 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE); 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE); 1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de sodio; DLPG); 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de sodio; DMPG); 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-sn-1-glicerol (sal de amonio; DMP-sn-1-G); 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de sodio; DPPG); 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de sodio; DSPG); 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfo-sn-1-glicerol (sal de sodio; DSP-sn-1-G); 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio; DPPS); 1-Palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PLinoPC); 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC); 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de sodio; POPG); 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (sal de amonio; POPG); 1-Palmitoil-2-4o-sn-glicero-3-fosfocolina (P-liso-PC); 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S-liso-PC); y mezclas de los mismos.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos poliméricos y conjugados de polímeros-lípidos o lípidos poliméricos, tales como lípidos pegilados que tienen regiones PEG de peso molecular 300, 500, 1000, 1500, 2000, 3500, o 5000, incluyendo polietilenglicoles, N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DMPE-MPEG-2000); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol-5000)-1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DMPE-MPEG-5000); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DPPE-MPEG-2000); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol 5000)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DPPE-MPEG-5000); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol 750)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DSPE-MPEG-750); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamins (sal de sodio; DSPE-MPEG-2000); N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol 5000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (sal de sodio; DSPE-MPEG-5000); sulfato sódico de colesterilo (SCS); sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus mezclas.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos poliméricos tales como DOPE-PEG, DLPE-PEG, DDPE-PEG DLinPE-PEG, y diacilglicerol-PEG-2000 o -5000.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos poliméricos tales como compuestos multi-ramificados pegilados, por ejemplo DSPE-PTE020 y DSPE-AM0530K.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos poliméricos tales como lípidos de poliglicerina DSPE-PG8G.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen dioleoilfosfatidiletanolamins (DOPE), difitanoilfosfatidiletanolamina (DPhPE), 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (DOPC), y 1,2-Difitanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (DPhPC).

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen colesterolos, esteroleos, y esteroides tales como gonanos, androstanos, pregnanos, colanos, colestanos, ergostanos, campestanos, poriferastanos, estigmastanos,

gorgostanos, lanostanos, cicloartanos, además de derivados de esteroides o zooesteroides de cualquiera de los anteriores, y sus intermedios y precursores biológicos, que pueden incluir, por ejemplo, colesterol, lanoesterol, estigmaestanol, dihidrolanoesterol, cimoesterol, desmoesterol, 7-dehidrocolesterol, y mezclas y derivados de los mismos.

5 Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen colesterol pegilados, y derivados de colestano 3-oxo(C1-22acilo) tales como acetato de colesterol, araquinonato de colesterol, butirato de colesterol, hexanoato de colesterol, caprilato de colesterol, n-decanoato de colesterol, dodecanoato de colesterol, miristato de colesterol, palmitato de colesterol, behenato de colesterol, estearato 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, y mezclas y derivados de los mismos.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos derivados de esteroides vegetales, incluyendo fitoesteroides, beta-sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicaesterol, delta-7-estigmaesterol, delta-7-avenaesterol, y mezclas y derivados de los mismos.

15 Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen ácidos biliares, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido metil-litocólico, y mezclas y derivados de los mismos.

20 Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos derivados de esteroides que incluyen glucocorticoides, cortisol, hidrocortisona, corticosterona, Δ^3 -pregnenolona, progesterona, desoxicorticosterona, 17-OH-pregnenolona, 17-OH-progesterona, 11-dioxicortisol, dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, androstenediona, aldosterona, 18-hidroxicorticosterona, tetrahidrocortisol, tetrahidrocortisona, cortisona, prednisona, 6 α -metilprednisona, 9 α -fluoro-16 α -hidroxiprednisona, 9 α -fluoro-16 α -metilprednisona, 9 α -fluorocortisol, y mezclas y derivados de los mismos.

25 Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos derivados de esteroides que incluyen andrógenos, testosterona, dihidrotestosterona, androstenediol, androstenediona, androstenediona, 3 α ,5 α -androstano diol, y mezclas y derivados de los mismos.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos derivados de esteroides que incluyen estrógenos, estronas, estradiol, y mezclas y derivados de los mismos.

Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen compuestos derivados de lumisterol y compuestos de vitamina D.

30 Ejemplos de lípidos no catiónicos no aminoácidos incluyen lípidos que tienen colas que se sitúan en un rango de C10:0 a C22:6, por ejemplo, DDPE (C10:0) (CAS 253685-27-7), DLPE (C12:0) (CAS 59752-57-7), DSPE (C18:0) (CAS 1069-79-0), DOPE (C18:1) (CAS 4004-05-1), DLinPE (C18:2) (CAS 20707-71-5), DLenPE (C18:3) (CAS 34813-40-6), DARAPE (C20:4) (CAS 5634-86-6), DDHAPE (C22:6) (CAS 123284-81-1), DPhPE (16:0[(CH₃)₄]) (CAS 201036-16-0).

35 Ejemplos de lípidos aniónicos no aminoácidos incluyen fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, factor de activación plaquetaria (PAF, por sus siglas en inglés), fosfatidiletanolamina, fosfatidil-DL-glicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol (pi(4)p, pi(4,5)p2), cardiolipina (sal de sodio), lisofosfatidas, fosfolípidos hidrogenados, esfingolípidos, gangliósidos, fitoesfingosina, esfingoninas, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sus mezclas.

Usos para el ARN regulador e interferencia por ARN

40 En algunos aspectos, la presente revelación hace referencia en general a las áreas de ARN regulador e interferencia por ARN, terapéutica antisentido, y administración de agentes terapéuticos de ARN. Más en particular, la presente invención hace referencia a composiciones y formulaciones para ácidos ribonucleicos, y sus usos para medicamentos y para su administración como agentes terapéuticos. La presente invención hace referencia en general a métodos para la utilización de ácidos ribonucleicos en interferencia por ARN para la inhibición específica de genes de la expresión génica en células, o en mamíferos para alterar el estado de una enfermedad o fenotipo.

45 La interferencia por ARN hace referencia a métodos de silenciamiento génico post-transcripcional específico a la secuencia que está mediado por un ARN de cadena doble (ARN_{bc}) denominado ARN pequeño de interferencia (ARN_{ip}). Ver Fire, et al., Nature 391:806, 1998, y Hamilton, et al., Science 286:950-951, 1999. El ARN_i es compartido por una diversidad de flora y filo, y se cree que es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente contra la expresión de genes foráneos. Ver Fire, et al., Trends Genet. 15:358, 1999.

5 El ARNi es por lo tanto un mecanismo ubicuo, endógeno que utiliza ARN pequeños no codificantes para silenciar la expresión de genes. Ver Dykxhoorn, D.M. y J. Lieberman, Annu. Rev. Biomed. Eng. 8:377-402, 2006. El ARNi puede regular importantes genes implicadas en la diferenciación, desarrollo y muerte celular. El ARNi puede además proteger el genoma de elementos genéticos invasores, codificados por transposones y virus. Cuando se introduce un ARNip en una célula, se une a la maquinaria del ARNi endógeno para interrumpir la expresión del ARNm que contiene las secuencias complementarias con una elevada especificidad. Cualquier gen que cause una enfermedad y cualquier tipo de célula o tejido puede ser fijado como diana potencialmente. Esta técnica ha sido utilizada rápidamente para el análisis de función de genes y el descubrimiento y validación de dianas farmacológicas. El aprovechamiento del ARNi también representa una gran promesa para la terapia, aunque la introducción de ARNip en células in vivo sigue siendo un obstáculo importante.

10 El mecanismo del ARNi, aunque no totalmente caracterizado aún, es mediante el corte de un ARNm diana. La respuesta del ARNi implica un complejo de endonucleasa conocido el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), que es mediador en el corte de ARN de cadena única complementario a la cadena antisentido del ARNi de doble cadena (Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188, 2001).

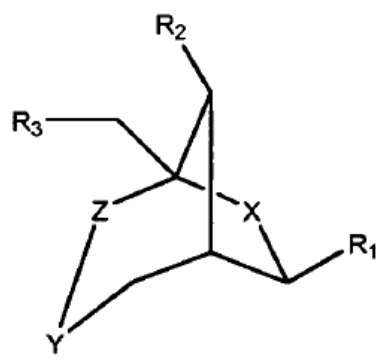
15 Una manera de llevar a cabo el ARNi es introducir o expresar un ARNip en células. Otra manera es hacer uso de una enzima de ribonucleasa III denominada Dícer. Una actividad de dícer es procesar un ARNbc largo en ARNip. Ver Hamilton, et al., Science 286:950-951, 1999; Berstein, et al., Nature 409:363, 2001. Un ARNip derivado de dícer es habitualmente de aproximadamente 21-23 nucleótidos en su tamaño completo, con aproximadamente 19 pares de bases dobles. Ver Hamilton, et al., supra; Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188, 2001. En esencia, un ARNbc largo puede ser introducido en una célula como un precursor de un ARNip.

20 La presente invención proporciona una variedad de composiciones, formulaciones y métodos que incluyen un ARN regulados, un ácido nucleico de interferencia o un precursor del mismo en combinación con diversos componentes, incluyendo lípidos, lipoaminoácidos, y polímeros naturales o sintéticos.

25 El término "ARNbc" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a cualquier molécula de ácido nucleico que comprende al menos una molécula de ribonucleótido y capaz de inhibir o regular por disminución la expresión de genes, por ejemplo, promoviendo la interferencia por ARN ("ARNi") o el silenciamiento génico de manera específica a la secuencia. Los ARNbc de la presente revelación pueden ser sustratos adecuados para Dícer o para la asociación con RISC para mediar en el silenciamiento génico por ARNi. Una o ambas cadenas del ARNbc puede además comprender un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato o 5', 3'-difosfato. Tal como se utiliza en la presente patente, las moléculas de ARNbc, además de al menos un ribonucleótido, pueden además incluir sustituciones, nucleótidos químicamente modificados, y no nucleótidos. En ciertos modos de realización, las moléculas de ARNbc comprenden ribonucleótidos hasta aproximadamente un 100% de las posiciones de nucleótidos.

35 Ejemplos de moléculas de ARNbc pueden ser encontradas en, por ejemplo, la Solicitud de Patente estadounidense Nº 11/681.725, Patentes estadounidenses Nos. 7.022.828 y 7.034.009, y Publicación de Solicitud PCT Internacional Nº WO/2003/070897.

Ejemplos de nucleósidos modificados se encuentran en las Patentes estadounidenses Nos. 6.403.566, 6.509.320, 6.479.463, 6.191.266, 6.083.482, 5.712.378, y 5.681.940. Un nucleósido modificado puede tener la siguiente estructura:



40 en donde, X es O o CH₂, Y es O, y Z es CH₂; R₁ se selecciona del grupo de adenina, citosina, guanina, hipoxantina, uracilo, timina, y un heterociclo en donde el heterociclo se selecciona del grupo de una 1,3-diazina sustituida, una 1,3-diazina no sustituida, y una 7H imidazo[4,5]1,3 diazina no sustituida; y R₂, R₃ se seleccionan independientemente del grupo de H, OH, DMTO, TBDMSO, BnO, THPO, AcO, BzO, OP(NiPr₂)O(CH₂)₂CN, OPO₃ H,

difosfato, y trifosfato, en donde R_2 y R_3 juntos pueden ser PhCHO_2 , TIPDSO_2 o DTBSO_2 . Tal como se utiliza en la presente patente, la abreviatura "Ac" hace referencia a acetilo; la abreviatura "Bn" hace referencia a bencilo; la abreviatura "Bz" hace referencia a benzoilo; la abreviatura "DMT" hace referencia a dimetoxitritilo; la abreviatura "THP" hace referencia a tetrahidropirano; la abreviatura "TBDMS" hace referencia a t-butildimetilsililo; la abreviatura "TIPDS" hace referencia a tetrakisopropildisililo; y la abreviatura "DTBS" hace referencia a di(t-butil)sililo.

Además, tal como se utiliza en la presente patente, se entiende que los términos "ARNbc", "agente inductor de ARNi", y "agente de ARNi" son sinónimos con otros términos utilizados para describir moléculas de ácidos nucleicos que son capaces de mediar en el ARNi específico de la secuencia, incluyendo ARN meroduplex (ARNmd), ARNbc con muescas (ARNbcn), ARNbc con huecos (ARNbcg), ácido nucleico de interferencia pequeño (ARNip), ARNip, microARN (miARN), ARN de cadena única, ARN de horquilla corto (ARNhc), oligonucleótido de interferencia pequeño, oligonucleótido sustituido de interferencia pequeño, oligonucleótido modificado de interferencia pequeño, ARNbc químicamente modificado, y ARN de silenciamiento génico post-transcripcional (ARNppts), además de precursores de cualquiera de los anteriores.

El término "ARN de doble cadena (bc) largo" hace referencia a cualquier ARN de doble cadena mayor de aproximadamente 40 pares de bases (pb) hasta aproximadamente 100 pb o más, en particular hasta aproximadamente 300 pb a aproximadamente 500 pb. La secuencia de un ARNbc puede representar un segmento de un ARNm o un ARNm total. Una estructura de cadena doble puede formarse mediante moléculas de ácido nucleico auto-complementarias o mediante hibridación de dos o más cadenas de ácidos nucleicos complementarias distintas.

En algunos aspectos, un ARNbc comprende dos oligonucleótidos separados, que comprenden una primera cadena (antisentido) y una segunda cadena (sentido), en donde las cadenas antisentido y sentido son auto complementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en la otra cadena, y las dos cadenas separadas forman una estructura dúplex o de cadena doble, por ejemplo, en donde la región de cadena doble es de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 24 pares de bases, o aproximadamente 26 a aproximadamente 40 pares de bases); la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma (por ejemplo, un ARNm humano); y la cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde (es decir, homóloga) a la secuencia de ácido nucleico diana o a una parte de la misma (por ejemplo, una cadena sentido de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos, o aproximadamente 26 a aproximadamente 40 nucleótidos corresponde al ácido nucleico diana o a una parte del mismo).

En algunos modos de realización, el ARNbc puede ensamblarse a partir de un único oligonucleótido en el que las cadenas sentido y antisentido del ARNbc están enlazadas entre sí mediante un conector basado en ácido nucleico o un conector no basado en ácido nucleico. En algunos modos de realización, la primera (antisentido) y la segunda (sentido) cadena de la molécula de ARNbc están enlazadas de forma covalente por un conector nucleótido o no nucleótido, según se describe en la presente patente y se conoce en el arte. En algunos modos de realización, una primera molécula de ARNbc está enlazada de forma covalente a al menos una segunda molécula de ARNbc mediante un conector nucleótido o no nucleótido conocido en el arte, en donde la primera molécula de ARNbc puede enlazarse a una pluralidad de otras moléculas de ARNbc que pueden ser iguales o diferentes, o cualquier combinación de las mismas. En algunos modos de realización, el ARNbc enlazado puede incluir una tercera cadena que forma un merodúplex con el ARNbc enlazado.

En algunos aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en la presente patente forman un ARN meroduplex (ARNmd) que tiene tres o más cadenas, por ejemplo, una cadena 'A' (primera o antisentido), cadena 'S1' (segunda), y cadena 'S2' (tercera) en la que las cadenas 'S1' y 'S2' son complementarias a y forman pares de bases (pb) con regiones no solapadas de la cadena 'A' (por ejemplo, un ARNmd puede tener la forma de A:S1S2). La S1, S2, o más cadenas juntas esencialmente comprenden una cadena sentido con respecto a la cadena 'A'. La región de cadena doble formada por la hibridación de las cadenas 'S1' y 'A' es distinta de y no se solapa con la región de doble cadena formada por la hibridación de las cadenas 'S2' y 'A'. Una molécula de ARNmd es una molécula "con huecos", lo que significa un "hueco" que se encuentra en un rango de 0 nucleótidos hasta aproximadamente 10 nucleótidos. En algunos modos de realización, el dúplex A:S1 se separa del dúplex A:S2 mediante un hueco que es el resultado de al menos un nucleótido desapareado (hasta aproximadamente 10 nucleótidos desapareados) en la cadena 'A' que está situada entre el dúplex A:S1 y el dúplex A:S2 y que es distinto de uno o más nucleótidos desapareados en el extremo 3' de uno o más de las cadenas 'A', 'S1', o 'S2'. En algunos modos de realización, el dúplex A:S1 se separa del dúplex A:S2 mediante un hueco de cero nucleótidos (es decir, una muesca en la que únicamente se rompe o falta un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos en la molécula de polinucleótidos), entre el dúplex A:S1 y el dúplex A:S2 – al que se puede además hacer referencia como ARNbc con muescas (ARNbcn). Por ejemplo, A:S1S2 puede estar compuesta de un ARNbc que tiene al menos dos regiones de cadena doble que combinadas ascienden a aproximadamente 14 pares de bases a aproximadamente 40 pares de bases y las regiones de cadena doble están separadas por un hueco de aproximadamente 0 hasta aproximadamente 10 nucleótidos, que tienen de manera opcional extremos romos, o A:S1S2 puede comprender un ARNbc que tiene al menos dos

regiones de cadena doble separadas por un hueco de hasta 10 nucleótidos en donde al menos una de las regiones de cadena doble comprende entre aproximadamente 5 pares de bases y 13 pares de bases.

Tal como se describe en la presente patente, una molécula de ARNbc que contiene tres o más cadenas puede ser denominada como un ARN "merodúplex" (ARNmd). Ejemplos de moléculas de ARNmd pueden encontrarse en las solicitudes de patente provisional estadounidenses Nos. 60/934.930 y 60/973.398.

Un ARNbc o un ARNbc grande puede incluir una sustitución o modificación en la que la sustitución o modificación puede ser en un enlace de la cadena principal de fosfato, un azúcar, una base, o un nucleósido. Tales sustituciones de nucleósidos pueden incluir nucleósidos naturales no estándar (por ejemplo, 5-metiluridina o 5-metilcitidina o una 2-tioribotimidina), y tales modificaciones de la cadena principal, azúcar, o nucleósido pueden incluir una sustitución o adición de un alquilo o heteroátomo, tal como un metilo, alcoxi-alquilo, halógeno, nitrógeno o azufre, u otras modificaciones conocidas en el arte.

Además, tal como se utiliza en la presente patente, se entiende que el término "ARNi" es equivalente a otros términos utilizados para describir interferencia por ARN específica a la secuencia, tal como el silenciamiento génico post transcripcional, inhibición de la traducción, o epigenética. Por ejemplo, moléculas de ARNbc de la presente revelación pueden ser utilizadas para silenciar genes epigenéticamente en el nivel post-transcripcional o el nivel pre-transcripcional o cualquier combinación de los mismos.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona composiciones que contienen uno a más agentes inductores de ARNi que se dirigen a uno o más genes o transcritos diana, junto con uno o más componentes de administración. Ejemplos de componentes de administración incluyen lípidos, péptidos, polímeros, lípidos poliméricos, y conjugados de los mismos.

Las composiciones y formulaciones de la presente revelación pueden ser utilizadas para la administración de entidades inductoras de ARNi tales como ARNbc, ARNip, ARNmd, miARN, ARNhc, o vectores inductores de ARNi a células en sujetos mamíferos intactos, incluyendo humanos, y pueden además ser utilizadas para la administración de estos agentes a células en cultivos.

La presente revelación además proporciona métodos para la administración de uno o más agentes inductores de ARNi o entidades a células, órganos y tejidos en el interior del cuerpo de un mamífero. En algunos aspectos, las composiciones que contienen una entidad inductora de ARNi pueden ser introducidas mediante diversas vías para ser transportadas en el interior del cuerpo y captadas por las células en uno o más órganos o tejidos, donde la expresión de un transcrito diana es modulada.

En general, la presente revelación abarca agentes inductores de ARNi que son agentes terapéuticos útiles para prevenir y tratar enfermedades o trastornos caracterizados por diversos procesos aberrantes. Por ejemplo, virus que infectan a mamíferos pueden duplicarse tomando el control de la maquinaria celular de la célula hospedadora. Ver, por ejemplo, Fields Virology (2001). Por tanto, los ARNbc resultan útiles para interrumpir vías virales que controlan la producción o replicación de virus.

La presente revelación incluye métodos para el tratamiento o la prevención de una infección vírica en un sujeto mediante el uso de uno o más agentes inductores de ARNi terapéutico que tienen un amplio espectro de eficacia contra cepas de un virus diana. Un agente inductor de ARNi de la presente invención puede estar dirigido a una secuencia de un gen vírico en una variante conocida de una cepa o cepas de un virus, y mostrar un silenciamiento génico específico a la secuencia del gen vírico establecido como diana en esas variantes. Por ejemplo, un agente inductor de ARNi puede dirigirse a, y mostrar eficacia contra una cepa estacional del virus de la gripe, además de cepas variantes de la gripe.

Las composiciones y formulaciones de la presente revelación pueden ser utilizadas para la administración de agentes farmacológicos o agentes biológicamente activos a una variedad de células *in vitro*. Ejemplos de células para las que se abarca la administración *in vitro* incluyen células epiteliales tales como A549, líneas celulares inmortales tales como HeLa, células de hepatoma tales como HepG2, células de gliosarcoma de rata tales como 9L/LacZ, células monocíticas tales como THP-1, células renales caninas Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés), diversas líneas celulares de fibroblastos, y células primarias en cultivos presencia o ausencia de diversos sueros, entre otras.

Las composiciones y formulaciones de la presente revelación puede ser utilizada para la administración de agentes farmacológicos o agentes biológicamente activos a una variedad de células, tejidos u órganos *in vivo*. Las modalidades para administrar un agente *in vivo* incluyen las vías tópica, entérica, y parenteral. Ejemplos de modalidades para administrar un agente *in vivo* incluyen la inhalación de partículas o gotitas, administración de gotas nasales o nado-faríngeas, partículas, o suspensiones, vías transdérmica y transmucosa, además de inyección

o infusión por vías intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraósea, intraperitoneal, y epidural.

En algunos modos de realización, un agente puede ser administrado *ex vivo* mediante exposición directa a células, tejidos u órganos que se originan a partir de un sujeto mamífero.

5 Un agente farmacológico o agente biológicamente activo a ser administrado utilizando una composición o formulación de la presente revelación, puede encontrarse en cualquier forma, incluyendo una forma pura, una forma cristalina, una forma sólida, una nanopartícula, una forma condensada, en forma de complejo, o una forma conjugada.

10 La presente invención además proporciona métodos para la administración de una o más entidades inductoras de ARNi a órganos y tejidos dentro del cuerpo de un mamífero. En algunos modos de realización, se introducen composiciones que contienen una entidad inductora de ARNi, uno o más lipoaminoácidos, y uno o más componentes lipídicos adicionales mediante diversas vías, para ser transportados en el interior del cuerpo y captados/recuperados por células en uno o más órganos o tejidos, donde la expresión de un transcrito diana es modulada.

15 La presente revelación proporciona composiciones de ácidos nucleicos farmacéuticamente aceptables con diversos lípidos útiles para la administración terapéutica de ácidos nucleicos y ARN de silenciamiento génico. En particular, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración *in vitro* e *in vivo* de ARNbc para disminuir, regular por disminución, o silenciamiento de la traducción de una secuencia de ácido nucleico diana o la expresión de genes. Estas composiciones y métodos pueden ser utilizadas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades en un mamífero. En ejemplos de métodos de la presente invención, una molécula de ácido ribonucleico tal como un ARNip o ARNhc se pone en contacto con un lipoaminoácido para formular una composición que puede ser administrada a células o sujetos tales como mamíferos. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona métodos para la administración de un ARNip o ARNhc intracelularmente poniendo en contacto una composición que contiene ácido nucleico con una célula.

25 En ejemplos de realizaciones, la presente invención incluye composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico, tal como un ARN de doble cadena (ARNbc), un ARN pequeño de interferencia (ARNip), o un ARN de horquilla corto (ARNhc), mezclado o en forma de complejo con un lipoaminoácido, y un lípido polimérico para formar una composición que mejora la administración intracelular de la molécula de ácido nucleico. En algunos modos de realización, una composición de administración de la presente invención puede contener un ARNbc y uno, dos, o
30 más lipoaminoácidos, que pueden ser catiónicos o no catiónicos. En algunas variaciones, una composición de administración puede contener un ARNbc, lipoaminoácidos, y uno o más lípidos poliméricos. En algunos modos de realización, una composición de administración puede contener un ARNbc, lipoaminoácidos, uno o más lípidos adicionales, y uno o más lípidos poliméricos. Las composiciones de la presente invención pueden formar partículas estables que pueden incorporar un ARNbc como un agente de ARN de interferencia. Las composiciones y
35 formulaciones de la presente invención pueden incluir además componentes o excipientes que mejoran la administración.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención contienen partículas de ARN-lípidos estables con diámetros desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 400 nm. En algunas realizaciones, las partículas pueden tener un diámetro uniforme de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm. En algunos
40 modos de realización, las partículas pueden tener un diámetro uniforme de aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 150 nm.

Dentro de las composiciones a modo de ejemplo de la presente invención, un ARN de doble cadena puede mezclarse o formar complejo con lipoaminoácidos para formar una composición que mejore la administración intracelular del ARNbc, en comparación con poner en contacto las células diana con ARNbc desnudo.

45 En algunos modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lipoaminoácidos que son desde aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 70% (% mol) de la cantidad total de un componente lipídico y de mejora de la administración, incluyendo cualquier componente polimérico, pero sin incluir el componente de ARN. En algunos modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lipoaminoácidos, desde aproximadamente un 10% a aproximadamente un 55%. En algunas
50 realizaciones, una composición de la presente invención puede contener uno o más lipoaminoácidos de aproximadamente un 15% hasta aproximadamente un 35%.

En determinados modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos no catiónicos no aminoácidos, donde los lípidos no catiónicos no aminoácidos son desde aproximadamente un 2% a aproximadamente un 95% (% mol) de la cantidad total de componentes lipídicos y de mejora de la administración, incluyendo cualquier componente polimérico, pero sin incluir el componente de ARN. En algunas realizaciones, una
55

5 composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos no catiónicos desde aproximadamente un 20% hasta aproximadamente un 75%, o de aproximadamente un 45% hasta aproximadamente un 75%, o de aproximadamente un 45% hasta aproximadamente un 55%. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos no catiónicos de aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 50%.

10 En algunos modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos poliméricos, donde los lípidos poliméricos son desde aproximadamente un 0,2% hasta aproximadamente un 20% (% mol) de la cantidad total de componentes lipídicos y de mejora de la administración, incluyendo cualquier componente polimérico, pero sin incluir el componente de ARN. En algunos modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos poliméricos de aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 10%. En algunos modos de realización, una composición de la presente invención puede contener uno o más lípidos poliméricos de aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 5% de la composición.

Composiciones y usos para la terapéutica con ácidos nucleicos

15 En algunos modos de realización, los compuestos y composiciones de la invención se utilizan en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mamífero. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la presente invención que contiene un ARN de interferencia, un lipoaminoácido, un lípido no catiónico no aminoácido, un lípido polimérico, y uno o más componentes o excipientes de mejora de la administración pueden ser administrados a un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o sobreexpresión de un gen que puede ser reducido, disminuido, regulado por disminución, o silenciado por la composición.

20 La presente invención abarca compuestos u composiciones de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad del pulmón tal como el distrés respiratorio, asma, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o enfisema, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición.

La presente invención abarca compuestos y composiciones de la invención para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad hepática, fractura de huesos, enfermedad cardíaca, enfermedades víricas incluyendo la hepatitis y la gripe, o cáncer.

30 Métodos para realizar liposomas se proporcionan, por ejemplo, en G. Gregoriadis, Liposome Technology (CRC Press 1984), M. J. Ostro, Liposomes (Marcel Dekker 1987); Subhash C. Basu and Manju Basu, Liposome Methods and Protocols (2002).

35 El componente de ácido nucleico, lipoaminoácidos, y cualquier componente adicional pueden ser mezclados entre sí primero en un medio adecuado tal como un medio de cultivo celular, después de lo cual uno o más lípidos o compuestos adicionales pueden ser añadidos a la mezcla. De manera alternativa, los lipoaminoácidos pueden ser mezclados entre sí primero en un medio adecuado, tal como un medio de cultivo celular, después de lo cual puede añadirse el componente de ácido nucleico.

Dentro de determinados modos de realización de la invención, un ARNbc se mezcla con uno o más lipoaminoácidos, o una combinación de uno o más lipoaminoácidos y lípidos no catiónicos no aminoácidos.

40 En algunas realizaciones, un formulación de transfección/administración de lipoaminoácidos puede prepararse mediante rehidratación de una preparación seca. Los lípidos pueden ser solubilizados en CHCl_3 , secados bajo nitrógeno, y rehidratados en 10nM de HEPES, con dextrosa al 5% a pH 7,4, por ejemplo, y sonicados para formar liposomas. Los liposomas pueden ser diluidos en dextrosa HEPES. Los ARNbc pueden ser diluidos en 10 nM de HEPES, con dextrosa al 5%, pH 7,4, a 0,0008 $\mu\text{mol/mL}$. Un volumen de liposoma puede añadirse a un volumen de ARNbc y se vortizaron (auto acoplamiento), proporcionando una concentración final de ARNbc de 100 nM a 6,25 nM de ARNbc. Esta mezcla puede ser diluida uno a cuatro en presencia de medios de cultivo celular.

El agente de ARN de interferencia puede también formar complejo con, o estar conjugada a un lipoaminoácido o lípido polimérico, y mezclarse con uno o más lípidos no catiónicos no aminoácidos, o una combinación de uno o más lípidos no catiónicos no aminoácidos y catiónicos no aminoácidos.

50 Un agente de ARN de interferencia y un lipoaminoácido pueden estar mezclados entre sí primero, seguido de la adición de uno o más lípidos no catiónicos no aminoácidos, o una combinación de lípidos no catiónicos no aminoácidos y catiónicos no aminoácidos, añadidos a un medio adecuado tal como un medio de cultivo celular. De manera alternativa, los componentes lipoaminoácidos y los lípidos no aminoácidos pueden ser mezclados en primer lugar, seguido por la adición del agente de ARN en un medio adecuado.

En algunos modos de realización, la presente revelación incluye composiciones de dispersión micelar que contienen un fármaco o agente activo mezclado o formando complejo con un lipoaminoácido y un dispersante para formar una composición que proporciona la administración intracelular del fármaco o agente activo.

5 En determinados modos de realización, una composición de dispersión de la presente revelación puede contener uno o más fármacos o agentes activos, uno o más lipoaminoácidos, y uno o más dispersantes. En algunas variaciones, una composición de administración puede contener un fármaco o agente activo, un dispersante, un lipoaminoácido, y un lípido polimérico opcional. Las composiciones de dispersión de la presente revelación pueden formar partículas estables que pueden incorporar el fármaco o agente activo.

10 En algunos aspectos, una composición de dispersión de la presente revelación puede contener partículas de dispersión de ácidos nucleicos estables con diámetros de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 400 nm. En algunos modos de realización, las partículas pueden tener un diámetro uniforme de aproximadamente 10 nm hasta 300 nm. En algunos modos de realización, las partículas pueden tener un diámetro uniforme de aproximadamente 50nm hasta aproximadamente 150 nm.

15 Una dispersión micelar puede ser utilizada para formular y mejorar la biodisponibilidad de un fármaco o agente activo, incluyendo agentes terapéuticos de ARNi. Mientras que un complejo lípido-fármaco convencional puede contener una estructura de bicapa lipídica o liposomal que mantiene un núcleo hidrofílico o acuoso, una dispersión micelar puede proporcionar gotas o nanopartículas de dispersión con un núcleo hidrofóbico similar al aceite. Las nanopartículas de dispersión pueden estar suspendidas en una fase acuosa continua. Una estructura de dispersión puede evitar algunas desventajas inherentes en la utilización de una estructura liposomal para la administración de agentes activos, y puede proporcionar ventajas en la administración debido al núcleo lipofílico.

20 La presente revelación proporciona una variedad de composiciones de dispersión micelar que contienen lípidos y dispersantes para fármacos o medicamentos, y para la entrega y administración de agentes de ARN.

25 Ejemplos de dispersantes incluyen compuestos sintéticos que incluyen polioxiglicéridos tales como glicéridos caprílicos poliglicolados, etoxidiglicol, glicéridos grasos pegilados, éteres monoetílicos de dietilenglicol, y mezclas de los mismos. Ejemplos de dispersantes incluyen LABRAFIL, LABRASOL, ARLATONE, TRANSCUTOL, y mezclas de los mismos. Ejemplos de dispersantes incluyen compuestos sintéticos tales como alquilfosfo-N-metiletanolaminas y alcoilsarcosinas. Ejemplos de dispersantes incluyen FOS-MEA y CRODASINIC.

30 En algunos modos de realización, una composición de administración de la presente revelación puede contener un fármaco o agente activo, uno o más aceites, uno o más lipoaminoácidos, y lípidos emulsionantes y estabilizadores. En algunas variaciones, una composición de administración puede contener un fármaco o agente activo, un aceite, un lípido emulsionante, un lipoaminoácido, un lípido no catiónico, y un lípido polimérico.

35 Las composiciones de la presente revelación puede formar partículas estables que pueden incorporar un fármaco o agente activo. En algunos aspectos, las composiciones de la presente revelación contienen partículas estables de emulsión de agentes activos o farmacológicos con diámetros de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 400 nm. En algunos modos de realización, las partículas puede tener un diámetro uniforme de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, las partículas pueden tener un diámetro uniforme de 50 nm a aproximadamente 150 nm.

40 Dentro de las composiciones a modo de ejemplo de la presente revelación, un agente activo o farmacológico puede mezclarse o formar complejo con un aceite, un emulsionante, un lipoaminoácido, y un lípido de estabilización polimérico, para formar una composición que mejore la administración intracelular del agente activo o farmacológico.

Se puede utilizar una emulsión de aceite en agua para formular y mejorar la biodisponibilidad de un agente activo o farmacológico, incluyendo agentes terapéuticos de ARNi.

45 Mientras que un complejo lípido-fármaco convencional puede contener una estructura de bicapa lipídica o liposomal que mantiene un núcleo hidrofílico o acuoso, una emulsión de aceite en agua puede proporcionar gotitas o nanopartículas de emulsión que tienen una capa lipídica que rodea un núcleo hidrofóbico de aceite. Las gotas o nanopartículas de emulsión pueden estar suspendidas en una fase acuosa continua. Una estructura de emulsión puede evitar algunas de las desventajas inherentes a la utilización de una estructura liposomal para la administración de agentes activos, y puede proporcionar ventajas en la administración debido a su núcleo lipofílico.

50 Una variedad de composiciones de emulsión novedosas se proporcionan en la presente revelación, incluyendo composiciones novedosas y usos de aceites, emulsionantes, y componentes lipídicos con agentes de ARN de interferencia.

Ejemplos de aceites incluyen aceites sintéticos, ésteres de ácidos grasos de propilenglicoles, éteres de etilenglicoles, aceites de glicerilo, aceites de colesterilo, aceites vegetales, aceites de nuez, aceites esenciales, aceite mineral, compuestos liposolubles tales como tocoferoles y Vitamina E, y mezclas de los mismos. Ejemplos de aceites incluyen aceites sintéticos tales como CAPRYOL 90 (monoéster de propilenglicol), CAPRYOL PGM (monoéster de propilenglicol), LABRAFAC PC (monoéster de propilenglicol), LABRAFAC PG (diéster de propilenglicol), LAUROGLYCOL 90 (monoéster de propilenglicol), LAUROGLYCOL FCC (monoéster de propilenglicol), PLUROL OLEIQUE CC 497 (monoéster de propilenglicol), LABRAFAC LIPOPHILE WL 1349 (triglicérido) PECEOL (monoéster de glicerilo), MAISINE 35-1 (monoéster de glicerilo), y mezclas de los mismos.

Composiciones y métodos para la terapéutica con ARN

La presente invención proporciona composiciones y métodos para modular la expresión de genes utilizando ARN, tal como mediante interferencia por ARN. Una composición de la presente invención puede administrar un agente de ácido ribonucleico a una célula que puede producir la respuesta del ARNi. Ejemplos de agentes de ácidos nucleicos útiles para la presente invención incluyen ácidos nucleicos de cadena doble, ácidos nucleicos resistentes a la degradación o modificados, ARN, ARNip, ARNhc, miARN, piARN, antagonistas de ARN, ácidos nucleicos de cadena única, quimeras de ADN-ARN, ácidos nucleicos antisentido, y ribosomas. Tal como se utilizan en la presente patente, los términos ARNip, ARNhc, y ARNhc incluyen precursores de ARNip, ARNhc, y ARNhc, respectivamente. Por ejemplo, el término ARNip incluye un ARN o ARN de doble cadena que es adecuado como sustrato de la enzima dicer.

Los agentes de ácido ribonucleico útiles para la presente invención pueden estar dirigidos a diversos genes. Ejemplos de genes humanos adecuados como dianas incluyen TNF, FLT1, la familia VEGF, la familia ERBB, la familia PDGFR, BCR-ABL, y la familia MAPK, entre otros. Ejemplos de genes humanos adecuados como dianas y secuencias de ácidos nucleicos de los mismos incluyen los revelados en PCT/US08/55333, PCT/US08/55339, PCT/US08/55340, PCT/US08/55341, PCT/US08/55350, PCT/US08/55353, PCT/US08/55356, PCT/US08/55357, PCT/US08/55360, PCT/US08/55362, PCT/US08/55365, PCT/US08/55366, PCT/US08/55369, PCT/US08/55370, PCT/US08/55371, PCT/US08/55372, PCT/US08/55373, PCT/US08/55374, PCT/US08/55375, PCT/US08/55376, PCT/US08/55377, PCT/US08/55378, PCT/US08/55380, PCT/US08/55381, PCT/US08/55382, PCT/US08/55383, PCT/US08/55385, PCT/US08/55386, PCT/US08/55505, PCT/US08/55511, PCT/US08/55515, PCT/US08/55516, PCT/US08/55519, PCT/US08/55524, PCT/US08/55526, PCT/US08/55527, PCT/US08/55532, PCT/US08/55533, PCT/US08/55542, PCT/US08/55548, PCT/US08/55550, PCT/LJ08/55551, PCT/US08/55554, PCT/US08/55556, PCT/US08/55560, PCT/US08/55563, PCT/US08/55597, PCT/US08/55599, PCT/US08/55601, PCT/US08/55603, PCT/US08/55604, PCT/US08/55606, PCT/US08/55608, PCT/US08/55611, PCT/US08/55612, PCT/US08/55615, PCT/US08/55618, PCT/US08/55622, PCT/US08/55625, PCT/US08/55627, PCT/US08/55631, PCT/US08/55635, PCT/US08/55644, PCT/US08/55649, PCT/US08/55651, PCT/US08/55662, PCT/US08/55672, PCT/US08/55676, PCT/US08/55678, PCT/US08/55695, PCT/US08/55697, PCT/US08/55698, PCT/US08/55701, PCT/US08/55704, PCT/US08/55708, PCT/US08/55709, y PCT/US08/55711.

Un ARN de la presente revelación a ser administrado puede tener una secuencia que es complementaria a una región de un gen vírico. Por ejemplo, algunas composiciones y métodos de esta invención son útiles para regular la expresión del genoma viral de un virus de la gripe. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona composiciones y métodos para modular la expresión y la actividad infecciosa de un virus de la gripe mediante interferencia por ARN. La expresión y/o actividad de un virus de la gripe puede ser modulada administrando a una célula, por ejemplo, una molécula de ARN de interferencia pequeño con una secuencia que es complementaria a una región de una subunidad de polimerasa del ARN de un virus de gripe. Ejemplos de ARN dirigidos a un virus de gripe se proporcionan en la publicación de Patente de EE.UU. N° 20070213293 A1.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para inhibir la expresión de un transcrito diana en un sujeto administrando al sujeto una composición que contiene una cantidad efectiva de un compuesto inductor de ARNi tal como una molécula de oligonucleótidos de interferencia pequeña, o un precursor de la misma. El ARNi utiliza ARN de interferencia pequeños (ARNip) para establecer como diana el ARN mensajero (ARNm) y atenuar la traducción. Un ARNip tal como se utiliza en la presente invención puede ser un precursor para el procesamiento de dicer tal como, por ejemplo, un ARNbc grande procesado en un ARNip. La presente invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades o condiciones asociadas con la expresión de un transcrito diana o actividad de un péptido o proteína codificada por el transcrito diana.

Puede utilizarse una estrategia terapéutica basada en el ARNi para tratar una amplia gama de enfermedades, deteniendo el crecimiento o la función de un virus o un microorganismo, además de deteniendo la función del producto de un gen endógeno en la vía de la enfermedad.

En algunos modos de realización, la presente invención proporciona composiciones y métodos novedosos para la administración de entidades inductoras de ARNi, tal como moléculas de oligonucleótidos de interferencia pequeñas, y precursores de las mismas. En particular, la presente invención proporciona composiciones que contienen una entidad inductora de ARNi que está dirigida a uno o más transcritos de una célula, tejido, y/o órgano de un sujeto.

Un ARNip puede ser dos cadenas de ARN con una región de complementariedad de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud. Un ARNip incluye opcionalmente uno o dos extremos salientes o bucles de cadena única.

Un ARNhc puede ser una cadena única de ARN con una región de auto-complementariedad. La cadena única de ARN puede formar una estructura en horquilla con un tallo y un bucle y, opcionalmente, una o más partes despareadas en la parte 5' y/o 3' del ARN.

El agente terapéutico activo puede ser un ARN modificado químicamente con resistencia mejorada a la degradación de la nucleasa in vivo, y/o captación celular mejorada, que conserva actividad de ARNi.

Un agente de ARNip de la presente invención puede tener una secuencia que es complementaria a una región de un gen diana. Un ARNip de la presente invención puede tener 29-50 pares de bases, por ejemplo, un ARNbc con una secuencia que es complementaria a una región de un gen diana. De forma alternativa, el ácido nucleico de doble cadena puede ser un ADNbc.

En determinados modos de realización, el agente activo puede ser un ácido nucleico de interferencia pequeño (ARNip), un ARN de interferencia pequeño (ARNip), un ARN de cadena doble (ARNbc), o un ARN de horquilla corto (ARNhc) que puede modular la expresión de un producto génico.

Se proporcionan métodos y composiciones comparables que fijan como diana la expresión de uno o más genes diferentes asociados con una enfermedad o condición en particular en un sujeto, incluyendo cualquiera de una gran cantidad de genes cuya expresión se conoce que aumenta de forma aberrante como un factor asociado con la enfermedad o condición seleccionada.

El compuesto inductor de ARNi de la presente invención puede ser administrado en conjunción con otros tratamientos conocidos para una enfermedad o condición.

En algunas realizaciones, la presente invención presenta composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico pequeña, tal como un ácido nucleico de interferencia pequeño, un ARN de interferencia pequeño, un ARN de doble cadena, un micro ARN, o un ARN de horquilla corto, mezclado o formando complejo con, o conjugado a, un compuesto de mejora de la administración.

Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "ARN regulador", "ácido nucleico de interferencia pequeño", "ARNip", "ARN de interferencia pequeño", "molécula de oligonucleótidos de interferencia pequeña", y "molécula de ácido nucleico de interferencia pequeña modificada químicamente", hacen referencia a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de regular, inhibir o regular por disminución la expresión de genes o, por ejemplo, la replicación vírica, mediando en la interferencia por ARN (ARNi) o en el silenciamiento génico de manera específica a la secuencia. ARN regulador incluye antagonistas de ARN de cadena única.

En algunas realizaciones, el ARNip es una molécula de polinucleótidos de doble cadena que comprende regiones de auto-complementariedad sentido y antisentido, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido ribonucleico diana para regular por disminución la expresión, o una parte de la misma, y la región sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a (es decir, que es sustancialmente idéntica en su secuencia a), la secuencia de ácido ribonucleico diana o a una parte de la misma.

Tal como se utiliza en la presente patente, "ARNip" significa ácido ribonucleico de interferencia pequeño que es un ácido nucleico de doble cadena de una longitud relativamente corta, u opcionalmente un precursor de mayor longitud del mismo. La longitud de los ARNip útiles dentro de la presente invención, serán preferidos en algunas realizaciones en una longitud de aproximadamente 20 a 50 pb. Sin embargo, no existe una limitación en particular a la longitud de los ARNip útiles, incluyendo los ARNip. Por ejemplo, los ARNip pueden inicialmente ser presentados a células en forma de un precursor que sea sustancialmente diferente de una forma final o procesada del ARNip que existirá y ejercerá una actividad de silenciamiento génico al ser administrado, o después de su administración, a la célula diana. Las formas precursoras de los ARNip pueden, por ejemplo, incluir elementos de la secuencia precursora que son procesados, degradados, modificados, o divididos en o después del momento de administración para producir un ARNi que se activa dentro de la célula para mediar en el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, los ARNip útiles tendrán una longitud del precursor, por ejemplo, de aproximadamente 100-200 pares de bases, o 50-100 pares de bases, o menos de aproximadamente 50 pares de bases, que producirán un ARNip activo, procesado en el interior de la célula diana. En otros modos de realización, un ARNip o precursor de ARNi de utilidad será de aproximadamente 10 a 49 pb, o 15 a 35 pb, o de aproximadamente 21 a 30 pb de longitud.

En determinados modos de realización de la presente invención, se pueden utilizar polipéptidos de mejora de la administración de polinucleótidos para facilitar la administración de moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo precursores de ácidos nucleicos grandes de ARNip. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente

patente pueden ser empleados para aumentar la administración de ácidos nucleicos más grandes que representan "precursores" para los ARNip deseados, en donde los aminoácidos precursores pueden ser divididos o, de otro modo, procesados antes, durante o después de su administración a una célula diana para formar un ARNip activo para modular la expresión de genes dentro de la célula diana.

5 Por ejemplo, puede seleccionarse un polinucleótido precursor de ARNbc como un polinucleótido circular, de doble cadena, con dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido de auto-complementariedad, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma, y donde la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ácido nucleico diana
10 o a una parte de la misma, y en donde el polinucleótido circular puede ser procesado in vivo o bien in vitro para generar una molécula de ARNbc activa capaz de inducir el ARNi.

Las moléculas de ARNi de la presente invención, particularmente las formas no precursoras, pueden ser de menos de 30 pares de bases, o aproximadamente 17-19 pb, o 19-21 pb, o 21-23 pb.

15 Los ARNip pueden mediar en el silenciamiento génico selectivo en el sistema mamífero. Los ARN de horquilla, con un bucle pequeño y 19 a 27 pares de bases en el tallo, silencian también selectivamente la expresión de genes que son homólogos a la secuencia en el tallo de doble cadena. Las células mamíferas pueden convertir el ARN de horquilla corto en ARNip para mediar en el silenciamiento génico selectivo.

20 El RISC media en el corte del ARN de cadena única que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNip doble. El corte del ARN diana tiene lugar dentro de la región complementaria de la cadena antisentido del dúplex de ARNip. Los dúplex de ARNip de 21 nucleótidos son habitualmente más activos cuando contienen extremos salientes-3' de dos nucleótidos.

Reemplazar los segmentos salientes del extremo 3' de un dúplex de ARNip de 21-mer con extremos salientes de 3' de 2 nucleótidos con desoxirribonucleótidos, puede no tener un efecto adverso sobre la actividad del ARNi. Reemplazar hasta 4 nucleótidos en cada extremo del ARNi con desoxirribonucleótidos puede ser tolerado.

25 De manera alternativa, los ARNip pueden ser administrados como productos de transcripción únicos o múltiples expresados por un vector polinucleótido que codifica el ARNip único o múltiple y que dirige su expresión dentro de las células diana. En estos modos de realización la parte de cadena doble de un producto de transcripción final del ARNip que va a ser expresado en el interior de la célula diana puede ser, por ejemplo, de 15 a 49 pb, de 15 a 35 pb, o de aproximadamente 21 a 30 pb de longitud.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, la región de cadena doble del ARNip en el que dos cadenas están emparejadas pueden contener partes de protuberancia (bulge) o no coincidentes, o ambas. Las partes de cadena doble del ARNip en las que dos cadenas están emparejadas no se limitan a segmentos de nucleótidos completamente emparejados, y pueden contener partes no emparejadas debido a, por ejemplo, no coincidencia (donde los nucleótidos correspondientes no son complementarios), protuberancia o bulge (donde se carece del correspondiente nucleótido complementario en una cadena), o extremo saliente. Las partes no emparejadas pueden estar contenidas en la medida en que no interfieran con la formación de ARNip. En algunos modos de realización, un "bulge" puede comprender 1 o 2 nucleótidos no emparejados, y la región de doble cadena de los ARNip, en las que dos cadenas se emparejan puede contener de aproximadamente 1 a 7, o aproximadamente 1 a 5 bulges. Además, las partes "no coincidentes" contenidas en la región de doble cadena de los ARNip pueden estar presentes en
35 cantidades de aproximadamente 1 a 7, o aproximadamente 1 a 5. Con mayor frecuencia en el caso de no coincidencias, uno de los nucleótidos es guanina, y el otro es uracilo. Tal falta de coincidencia puede ser atribuible, por ejemplo, a una mutación de C a T, G a A, o mezclas de las mismas, en un correspondiente ADN que codifica el ARN sentido, pero se contemplan también otras causas.

40 La estructura terminal de los ARNip de la presente invención pueden ser o bien roma o cohesiva (de extremo saliente), siempre que el ARNip conserve su actividad para silenciar la expresión de genes diana. La estructura final cohesiva (de extremo saliente) no se limita al extremo saliente 3', sino que incluye la estructura de extremo saliente 5', siempre que conserve su actividad para inducir el silenciamiento génico. Además, la cantidad de nucleótidos de extremo saliente no se limita a 2 o 3 nucleótidos, sino que puede ser cualquier cantidad de nucleótidos siempre que conserve su actividad para inducir el silenciamiento génico. Por ejemplo, los extremos salientes pueden comprender
45 de 1 a 8 nucleótidos, o de 2 a 4 nucleótidos.

La longitud de los ARNip con una estructura final de extremo saliente puede ser expresada en términos de la parte dúplex emparejada y cualquier parte que sobresalga en cada extremo. Por ejemplo, un ARN dúplex de 25/27-mer con un extremo saliente antisentido 3' de 2 pb tiene una cadena sentido y una cadena antisentido de 27-mer, donde la parte emparejada tiene una longitud de 25 pb.

Cualquier secuencia saliente (overhang) puede tener baja especificidad con un gen diana, y puede no ser complementario (antisentido) o idéntico (sentido) a la secuencia de genes diana. Siempre que el ARNip mantenga la actividad para el silenciamiento génico, puede contener en la parte saliente una estructura de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula de ARN natural tal como un ARNt, ARNr, un ARN vírico, o una molécula de ARN artificial.

5 La estructura terminal de los ARNip puede tener una estructura de tallo-bucle en la que los extremos de un lateral del ácido nucleico de doble cadena están conectados por un ácido nucleico conector, un ARN conector. La longitud de la región de cadena doble (parte de tallo) puede ser, por ejemplo, de 15 a 49 pb, o de 15 a 35 pb, o de aproximadamente 21 a 30 pb de largo. De manera alternativa, la longitud de la región de doble cadena que es un producto de transcripción final de los ARNip a ser expresado en una célula diana puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 a 49 pb, o de 15 a 35 pb, o de aproximadamente 21 a 30 pb de largo.

10 Los ARNip pueden contener un polinucleótido de cadena única que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana, o una parte de la misma, en donde el polinucleótido de cadena única puede contener un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (ver por ejemplo, Martinez, et al., Cell. 110:563-574, 2002, y Schwarz, et al., Molecular Cell 10:537-568, 2002), o 5',3'-difosfato.

15 Tal como se utiliza en la presente patente, el término ARNip no está limitado a moléculas que contienen únicamente ARN o ADN natural, sino que además abarca nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de interferencia pequeño de la invención carecen de los nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2-OH). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de interferencia pequeños no requieren la presencia de nucleótidos que tengan un grupo 2'-hidroxi para mediar en el ARNi y como tal, las moléculas de ácido nucleico de interferencia pequeño de la presente invención, opcionalmente, no incluyen ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tengan un grupo 2'-hidroxi). Las moléculas de ARNip que no requieran de la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula de ARNip para dar soporte al ARNi pueden, sin embargo, tener un conector o conectores enlazados u otros grupos enlazados o asociados, fracciones, o cadenas que contengan uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Las moléculas de ARNip pueden comprender ribonucleótidos en al menos el 5, 10, 20, 30, 40, o el 50% de las posiciones de los nucleótidos.

20 Tal como se utiliza en la presente patente, el término ARNip abarca moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar en el ARNi específico de la secuencia tal como, por ejemplo, moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip), moléculas de ARN de doble cadena (ARNbc), moléculas de micro-ARN, moléculas de ARN de horquilla corto (ARNhc), moléculas de oligonucleótidos de interferencia pequeños, moléculas de ácido nucleico de interferencia pequeño, moléculas de oligonucleótidos modificados de interferencia pequeños, moléculas de ARNip modificado químicamente, y moléculas de ARN de silenciamiento génico post-transcripcional (ARNptgs), entre otras.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNip comprenden secuencias o regiones separadas antisentido y sentido, en donde las regiones sentido y antisentido están enlazadas de forma covalente mediante moléculas conectoras nucleotídicas o no nucleotídicas, o están enlazadas de forma no covalente mediante interacciones iónicas, enlaces de hidrógenos, interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, y/o interacciones de apilamiento.

30 El "ARN antisentido" es una cadena de ARN que tiene una secuencia complementaria a un ARNm del gen diana, que puede inducir el ARNi mediante su unión al ARNm del gen diana.

35 El "ARN sentido" es una cadena de ARN que tiene una secuencia complementaria a un ARN antisentido, e hibrida con su ARN antisentido complementario para formar un ARNip.

40 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "constructo de ARNi" o "precursor de ARNi" hace referencia a un compuesto inductor de ARNi tales como los ARN de interferencia pequeños (ARNip), ARN de horquilla, y otras especies de ARN que pueden ser divididas *in vivo* para formar un ARNip. Los precursores de ARNi en la presente patente además incluyen vectores de expresión (también denominados como vectores de expresión de ARNi), capaces de dar lugar a transcritos que forman ARNbc o ARN de horquilla en células, y/o transcritos que pueden producir ARNip *in vivo*.

45 Una molécula de Híbridoip (de interferencia pequeño) es un ácido nucleico de doble cadena que tiene una función similar al ARNip. En lugar de una molécula de ARN de doble cadena, un Híbridoip está compuesto de una cadena de ARN y una cadena de ADN. Preferiblemente, la cadena de ARN es la cadena antisentido que se une a un ARNm diana. El Híbridoip creado por la hibridación de las cadenas de ADN y ARN tiene una parte complementaria hibridada y preferiblemente al menos un extremo 3' saliente.

50 Los ARNip para su uso dentro de la invención pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido, en donde las cadenas antisentido y sentido son auto-

- complementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena; tal como por ejemplo donde la cadena antisentido y la cadena sentido forman un dúplex o una estructura de doble cadena, por ejemplo en donde la región de doble cadena es de aproximadamente 19 pares de bases). La cadena antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma, y la cadena sentido puede comprender una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o a una parte de la misma. De manera alternativa, el ARNip puede ensamblarse a partir de un único oligonucleótido, donde las regiones auto-complementarias del ARNip sentido y antisentido están enlazadas mediante un conector o conectores basados en ácidos nucleicos o no basados en ácidos nucleicos.
- En algunos modos de realización, los ARNip para la administración intracelular pueden ser un nucleótido con una estructura secundaria dúplex, dúplex asimétrica, de horquilla o de horquilla asimétrica, con regiones auto-complementarias sentido y antisentido, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana separada o a una parte de la misma, y la región sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácidos nucleico diana o a una parte de la misma.
- Ejemplos de modificaciones químicas que puedan ser realizadas en un ARNip incluyen enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-desoxiribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "acíclicos", nucleótidos de 5-C-metilo, y la incorporación de residuos abásicos desoxi invertidos y/o de glicerilo terminales.
- La región antisentido de una molécula de ARNip puede incluir un enlace internucleotídico de fosforotioato en el extremo 3' de dicha región antisentido. La región antisentido puede comprender aproximadamente de uno a aproximadamente cinco enlaces internucleotídicos de fosforotioato en el extremo 5' de dicha región antisentido. Los salientes de los nucleótidos 3'-terminales de una molécula de ARNip pueden incluir ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que están químicamente modificados en un azúcar, base o estructura principal del ácido nucleico. Los salientes de los nucleótidos 3'-terminales pueden incluir uno o más ribonucleótidos de base universal. Los salientes de los nucleótidos 3'-terminales pueden comprender uno o más nucleótidos acíclicos.
- Por ejemplo, un ARNip modificado químicamente puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato en una cadena, o puede tener de 1 a 8 o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato en cada cadena. Los enlaces internucleotídicos de fosforotioato pueden estar presentes en una o ambas cadenas de oligonucleótidos del ARNip dúplex, por ejemplo en la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas.
- Las moléculas de ARNip pueden comprender uno o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato en el extremo 3', el extremo 5', o en ambos extremos el 3' y 5' de la cadena sentido, la cadena antisentido, o en ambas cadenas. Por ejemplo, una molécula de ARNip a modo de ejemplo puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato consecutivos en el extremo 5' de la cadena sentido, la cadena antisentido, o de ambas cadenas.
- En determinadas realizaciones, una molécula de ARNip incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o enlaces internucleotídicos de fosforotioato de pirimidina en la cadena sentido, la cadena antisentido, o en ambas cadenas.
- En algunas realizaciones, una molécula de ARNip incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato de purina en la cadena sentido, la cadena antisentido, o en ambas cadenas.
- Una molécula de ARNip puede incluir una molécula de ácido nucleico circular, en donde el ARNip es de aproximadamente 38 a aproximadamente 70, por ejemplo, de aproximadamente 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o 70 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 18 a aproximadamente 23, por ejemplo, aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, o 23 pares de bases, en donde el oligonucleótido circular forma una estructura en forma de mancuerna que tiene aproximadamente 19 pares de bases y 2 bucles.
- Una molécula de ARNip circular puede contener dos motivos de bucle, en donde una o ambas partes del bucle de la molécula de ARNip es biodegradable. Por ejemplo, las partes de bucle de una molécula de ARNip circular pueden ser transformadas *in vivo* para generar una molécula de ARNip de doble cadena con salientes 3'-terminales, tales como salientes de nucleótidos 3'-terminales que comprenden aproximadamente 2 nucleótidos.
- Los nucleótidos en una molécula de ARNip pueden estar en la cadena antisentido, la cadena sentido, o en ambas. Por ejemplo, los nucleótidos modificados pueden tener una conformación Norte (por ejemplo, un ciclo de pseudorrotación norte; ver por ejemplo, Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984). Ejemplos de nucleótidos que tienen una configuración Norte incluyen nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, 2'-O, 4'-C-metileno-(D-ribofuranosil) nucleótidos), 2'-metoxietoxi (MOE) nucleótidos, 2'-metil-tio-etil nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos, 2'-desoxi-2'-cloro nucleótidos, 2'-azido nucleótidos, y 2'-O-metil nucleótidos.

Los nucleótidos modificados químicamente pueden ser resistentes a la degradación de la nucleasa mientras que al mismo tiempo mantienen la capacidad para mediar en el ARNi.

La cadena sentido de una molécula de ARNi de cadena doble puede tener una fracción de caperuza terminal tal como una fracción desoxiabásica invertida, en el extremo 3', extremo 5', o en ambos extremos 3' y 5' de la cadena sentido.

Ejemplos de conjugados incluyen conjugados y ligandos descritos en Vargeese, et al., Solicitud de EE.UU N° 10/427.160, presentada el 30 de Abril de 2003, incorporada en la presente patente a modo de referencia en su totalidad, incluyendo los dibujos.

En algunos modos de realización de la presente invención, el conjugado puede unirse de forma covalente a la molécula de ARNi modificada químicamente mediante un conector biodegradable. Por ejemplo, la molécula del conjugado puede unirse al extremo 3' tanto de la cadena sentido, como de la cadena antisentido, o a ambas cadenas de la molécula de ARNi modificada químicamente.

En ciertos modos de realización, la molécula del conjugado se une al extremo 5' de bien la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas de la molécula de ARNi modificada químicamente. En algunas realizaciones, la molécula del conjugado se une tanto al extremo 3' como al extremo 5' de tanto la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas de la molécula de ARNi modificada químicamente, o cualquier combinación de las mismas.

En algunos modos de realización, una molécula del conjugado comprende una molécula que facilite la administración de una molécula de ARNi modificada químicamente en un sistema biológico, tal como una célula.

En algunas realizaciones, una molécula conjugada unida a la molécula de ARNi químicamente modificada es un polietilenglicol, seroalbúmina humana, o un ligando para un receptor celular que puede mediar en la captación celular. Ejemplos de moléculas conjugadas específicas contempladas por la presente invención que pueden unirse a las moléculas de ARNi específicas se describen en Vargeese, et al., Publicación de patente estadounidense Nos. 20030130186 y 20040110296.

Un ARNi puede contener un nucleótido, no nucleótido, o un conector mixto nucleótido/no nucleótido que une a la región sentido del ARNi a la región antisentido del ARNi. En algunos modos de realización, un conector de nucleótidos puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector de nucleótidos puede ser un aptámero de ácido nucleico. Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "aptámero" o "aptámero de ácido nucleico" abarcan una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana, en donde la molécula de ácido nucleico contiene una secuencia que es reconocida por la molécula diana en su entorno natural. De manera alternativa, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une a una molécula diana donde la molécula diana no se une naturalmente a un ácido nucleico.

Por ejemplo, el aptámero puede ser utilizado para unirse a un dominio de unión a ligando de una proteína, evitando de ese modo la interacción del ligando natural con la proteína. Ver, por ejemplo, Annu. Rev. Biochem. 64:763, 1995; Brody y Gold, J. Biotechnol. 74:5, 2000; Sun, Curr. Opin. Mol. Ther. 2:100, 2000; Kusser, J. Biotechnol. 74:27, 2000; Hermann y Patel, Science 287:820, 2000; y Jayasena, Clinical Chemistry 45:1628, 1999.

Un conector no nucleótido puede ser un nucleótido abásico, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, polietilenglicoles tales como aquellos que tienen entre 2 y 100 unidades de etilenglicol). Ejemplos específicos incluyen los descritos por Seela y Kaiser, Nucleic Acids Res. 18:6353, 1990, y Nucleic Acids Res. 15:3113, 1987; Cload y Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 113:6324, 1991; Richardson y Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 113:5109, 1991; Ma, et al., Nucleic Acids Res. 21:2585, 1993, y Biochemistry 32:1751, 1993; Durand, et al., Nucleic Acids Res. 18:6353, 1990; McCurdy, et al., Nucleosides & Nucleotides 10:287, 1991; Jaschke, et al., Tetrahedron Lett. 34:301-304, 1993; Ono, et al., Biochemistry 30:9914, 1991; Arnold, et al., Publicación Internacional N° WO 89/02439; Usman, et al., Publicación Internacional N° WO 95/06731; Dudycz, et al., Publicación Internacional N° WO 95/11910, y Ferentz y Verdine, J. Am. Chem. Soc. 113:4000, 1991.

Un "conector no nucleótido" hace referencia a un grupo o compuesto que puede ser incorporado en una cadena de ácido nucleico en el lugar de una o más unidades de nucleótidos, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y que permite que las bases restantes muestren su actividad enzimática. El grupo o compuesto puede ser abásico en cuanto que no contiene una base de nucleótido reconocida comúnmente, tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo o timina, por ejemplo en la posición C1 del azúcar.

En algunos modos de realización, la molécula de ARNi modificada puede tener modificaciones de la estructura principal de fosfato que incluyen una o más sustituciones de fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato,

fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetil, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal, y/o alquilsililo. Ejemplos de modificaciones de la estructura principal de oligonucleótidos se proporcionan en Hunziker y Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, in *Modern Synthetic Methods*, VCH, pp. 331-417, 1995, y Mesmaeker, et al., *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, pp. 24-39, 1994.

Las moléculas de ARNip, que pueden ser modificadas químicamente, pueden ser sintetizadas por: (a) síntesis de dos cadenas complementarias de la molécula de ARNip; y (b) hibridación de dos cadenas complementarias entre sí bajo condiciones adecuadas para obtener una molécula de ARNip de doble cadena. En algunas realizaciones, la síntesis de las partes complementarias de la molécula de ARNip se realiza mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, o mediante síntesis de oligonucleótidos en tándem en fase sólida.

Los oligonucleótidos (por ejemplo, ciertos oligonucleótidos o partes de oligonucleótidos modificados que carecen de ribonucleótidos), se sintetizan utilizando protocolos conocidos en el arte, por ejemplo, según se describe en Caruthers, et al., *Methods in Enzymology* 211:3-19, 1992; Thompson, et al., *Publicación PCT Internacional N° WO 99/54459*; Wincott, et al., *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincott, et al., *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; Brennan, et al., *Biotechnol Bioeng.* 61:33-45, 1998; y Brennan, *Patente estadounidense N° 6.001.311*. La síntesis de ARN, incluyendo ciertas moléculas de ARNip de la invención, siguen procedimientos generales según se describe, por ejemplo, en Usman, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845, 1987; Scaringe, et al., *Nucleic Acids Res.* 18:5433, 1990; y Wincott, et al., *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincott, et al., *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997.

Una "horquilla asimétrica" tal como se utiliza en la presente patente es una molécula de ARNip lineal que comprende una región antisentido, una parte de bucle que comprende nucleótidos o no nucleótidos, y una región sentido que comprende menos nucleótidos que la región antisentido, hasta el punto en que la región sentido tiene suficientes nucleótidos complementarios para formar pares de bases con la región antisentido y formar un dúplex con bucle.

Un "dúplex asimétrico" tal como se utiliza en la presente patente es una molécula de ARNip que tiene dos cadenas separadas que comprenden una región sentido y una región antisentido, en donde la región sentido comprende menos nucleótidos que la región antisentido hasta el punto de que la región sentido tiene suficientes nucleótidos complementarios para formar pares de bases con la región antisentido y formar un dúplex.

"Modular la expresión de genes" tal como se utiliza en la presente patente, es regular por incremento o por disminución la expresión de un gen diana, que puede incluir la regulación por incremento o por disminución de los niveles del ARNm presente en una célula, o de la traducción del ARNm, o de la síntesis de proteínas o subunidades de proteínas, codificados por el gen diana.

Los términos "inhibir", "regular por disminución", o "reducir la expresión", tal como se utiliza en la presente patente significan que la expresión de genes, o el nivel de las moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o el nivel o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas codificadas por un gen diana, se reduce por debajo de lo observado en ausencia de las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARNip) de la invención.

"Silenciamiento génico" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a la inhibición parcial o completa de la expresión de genes en una célula y puede también ser denominado como "knockdown de genes" (disminución de la expresión de genes). El grado de silenciamiento génico puede ser determinado mediante métodos conocidos en el arte, algunos de los cuales se resumen en la *Publicación Internacional N° WO 99/32619*.

Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "ácido ribonucleico" y "ARN" hacen referencia a una molécula que contiene al menos un residuo de ribonucleótido. Un ribonucleótido es un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una fracción de beta- D-ribo-furanosa. Estos términos incluyen ARN de cadena doble, ARN de cadena única, ARN aislado tal como el ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, además de ARN modificado y alterado que difiere del ARN natural por la adición, delección, sustitución, modificación, y/o alteración de uno o más nucleótidos. Las alteraciones de ARN pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como al extremo o extremos de un ARNip o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos de un ARN.

Los nucleótidos en una molécula de ARN incluyen nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos sintetizados químicamente o desoxinucleótidos. Estos ARN alterados pueden denominarse como análogos.

Por "región de secuencia sumamente conservada" se entiende, una secuencia de nucleótidos de una o más regiones en un gen diana que no varía significativamente de una generación a la otra, o de un sistema biológico al otro.

Por "región sentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNip que tiene complementariedad con una región antisentido de la molécula de ARNip. Además, la región sentido de una molécula de ARNip puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de ácido nucleico diana.

5 Por "región antisentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNip que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico diana. Además, la región antisentido de una molécula de ARNip puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene complementariedad con una región sentido de la molécula de ARNip.

10 Por "ácido nucleico diana" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico cuya expresión o actividad va a ser modulada. Un ácido nucleico diana puede ser un ADN o un ARN.

Por "complementariedad" se entiende que un ácido nucleico puede formar un enlace o enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico, bien mediante modos de unión Watson-Crick tradicionales o mediante otros no tradicionales.

15 El término "conector biodegradable" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una molécula conectora de ácido nucleico o ácido no nucleico, que está diseñada como un conector biodegradable para conectar una molécula a otra molécula, por ejemplo, una molécula biológicamente activa a una molécula de ARNip o las cadenas sentido y antisentido de una molécula de ARNip. El conector biodegradable está diseñado de tal manera que su estabilidad puede ser modulada para un propósito en particular, tal como la administración a un tejido o tipo de célula en particular. La estabilidad de una molécula conectora biodegradable basada en ácido nucleico puede ser
20 modulada de forma diversa, por ejemplo, mediante combinación de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, y nucleótidos modificados químicamente, tales como 2'-O-metil, 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-O-amino, 2'-C-allil, 2'-O-alil, y otros nucleótidos modificados en 2'- o en bases. La molécula conectora de ácido nucleico biodegradable puede ser un dímero, trímero, tetrámero o una molécula de ácido nucleico mayor, por ejemplo, un oligonucleótido de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos de longitud, o puede
25 comprender un único nucleótido con un enlace basado en fósforo, por ejemplo, un enlace de fosforamidato o fosfodiéster. La molécula conectora de ácido nucleico puede además comprender una estructura principal de ácido nucleico, azúcar de ácido nucleico, o modificaciones de bases del ácido nucleico.

30 En conexión con los nucleótidos modificados en 2' tal como se describe en la presente patente, por "amino" se entiende 2'-NH₂, o 2'-O-NH₂, que puede estar modificado o no modificado. Tales grupos modificados se describen, por ejemplo, en Eckstein, et al., Patente estadounidense N° 5.672.695 y en Matulic-Adamic, et al., Patente estadounidense N° 6.248.878.

Métodos suplementarios o complementarios para la administración de moléculas de ácido nucleico para su uso dentro de la invención se describen, por ejemplo, en Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139, 1992; "Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics," ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., Mol. Membr. Biol. 16:129-140, 1999; Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-192, 1999; y Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184-192, 2000. Sullivan, et al., Publicación de Patente PCT Internacional N°. WO 94/02595, describe además métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico enzimáticas.

40 Las moléculas de ácido nucleico pueden ser administradas dentro de formulaciones que incluyen uno o más componentes adicionales, tales como un soporte, diluyente, excipiente, adyuvante, emulsionante, tampón, estabilizador, o conservante farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "soporte" significa un diluyente sólido o líquido, disolvente, material de relleno, o material de encapsulamiento farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de soportes incluyen solución salina, sistemas de tampones farmacéuticos y biológicos, y medios biológicamente aceptables. Un soporte líquido que contiene agua puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes tampón, agentes quelantes, agentes complejantes, agentes solubilizantes, humectantes, disolventes, agentes de incremento de viscosidad y/o de suspensión, agentes de tonicidad, agentes humidificantes u otros materiales biocompatibles. Ejemplos de ingredientes de las categorías anteriores pueden encontrarse en el Formulario Nacional de Farmacopea de Estados Unidos, 1990, pp. 1857-1859, además de en Raymond C. Rowe, et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5^a ed., 2006, y "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 21^a ed., 2006, editor David B. Troy.

Ejemplos de conservantes incluyen fenol, metil parabeno, parabeno, m-cresol, tiomersal, cloruro de bencilalconio, y mezclas de los mismos.

Ejemplos de tensioactivos incluyen ácido oleico, trioleato de sorbitán, polisorbatos, lecitina, fosfatidilcolinas, diversos diglicéridos y fosfolípidos de cadena larga, y mezcla de los mismos.

Ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina, lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina, y mezclas de los mismos.

Ejemplos de dispersantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético.

5 Ejemplos de gases incluyen nitrógeno, helio, clorofluorocarburos (CFC), hidrofluorocarburos (HFC), dióxido de carbono, aire, y mezclas de los mismos.

10 En determinados modos de realización, el ARNip y/o el polipéptido puede ser encapsulado en liposomas, o residir interno o externo a un liposoma, o existir dentro de capas liposómicas, o ser administrados mediante iontoforesis, o incorporados en el interior de vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas, o vectores proteínicos. Ver, por ejemplo, O'Hare y Normand, Publicación de Patente PCT Internacional N° WO 00/53722. De forma alternativa, una composición de ácido nucleico puede ser administrada localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Inyección directa de las moléculas de ácido nucleico de la invención, ya sea por vía subcutánea, intramuscular, o intradérmica, puede tener lugar utilizando metodologías de aguja y jeringuilla, o mediante tecnologías libres de aguja, tales como las descritas en Conry et al., Clin. Cancer Res. 5:2330-2337, 1999, y Barry et al., Publicación de Patente PCT Internacional N° WO 99/31262.

15 Las composiciones de la presente invención pueden ser empleadas de manera efectiva como agentes farmacológicos. Los agentes farmacológicos evitan, modulan la incidencia o severidad de, o tratan (alivian uno o más síntomas en un grado medible o detectable) del estado de una enfermedad u otra condición adversa en un paciente.

20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos que presentan la presencia o administración de uno o más ácidos polinucleicos), habitualmente, uno o más ARNip, combinados, complejados, o conjugados con un lípido, que puede adicionalmente ser formulado con un soporte farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente, estabilizador o un tampón.

25 Habitualmente, el ARNip establecerá como diana a un gen que se expresa en un nivel elevado como un factor causal o de contribución asociado con el estado de la enfermedad o condición adversa del sujeto. En este contexto, el ARNip regulará por disminución de manera efectiva la expresión del gen a niveles que previenen, alivian, o reducen la severidad o recurrencia de uno o más síntomas de la enfermedad asociada. De forma alternativa, para diversos modelos de enfermedad distintos donde la expresión del gen diana no está necesariamente elevada como una consecuencia o secuela de una enfermedad o condición adversa, la regulación por disminución del gen diana no desembocará, sin embargo, en un resultado terapéutico al disminuir la expresión de genes (es decir, reducir los niveles de un ARNm y/o producto proteico del gen diana). De manera alternativa, los ARNip de la invención puede estar dirigidos a disminuir la expresión de un gen, lo que puede dar como resultado la regulación por incremento de un gen aguas abajo ("downstream") cuya expresión es regulada negativamente por un producto o actividad del gen diana.

35 Estos ARNip de la presente revelación pueden ser administrados en cualquier forma, por ejemplo por vía transdérmica o mediante inyección local (por ejemplo, inyección local en sitios de placas psoriásicas para tratar la psoriasis, o en las articulaciones de pacientes afectados con artritis psoriásica o AR (artritis reumatoide)). En modos de realización más detalladas, la invención proporciona formulaciones y métodos para administrar cantidades terapéuticamente efectivas de ARNip dirigido contra un ARNm del TNF- α , que regula por disminución de manera efectiva el ARN TNF- α y por tanto reduce o previene una o más condición o condiciones inflamatorias asociadas al TNF- α . Se proporcionan métodos y composiciones comparables que establecen como diana la expresión de uno o más genes diferentes asociados con una condición de enfermedad seleccionada en sujetos animales, incluyendo cualquier gran número de genes cuya expresión se conoce que está aumentada de forma aberrante como un factor casual o de contribución asociado con la condición de enfermedad seleccionada.

45 Las composiciones de la presente invención pueden además ser formuladas y utilizadas como comprimidos, cápsulas, o elixires para su administración por vía oral, supositorios para su administración por vía rectal, soluciones estériles, suspensiones para su administración de forma inyectable, y las otras formas conocidas en el arte.

50 Una composición o formulación farmacológica hace referencia a una composición o formulación en una forma adecuada para su administración, por ejemplo, administración sistémica, en una célula o paciente, incluyendo por ejemplo un humano. Las formas adecuadas dependen, en parte, del uso o la vía de administración, por ejemplo oral, transdérmica, transepitelial, o mediante inyección. Tales formas no impedirían que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula para la que el ácido nucleico cargado negativamente es deseable para su administración). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas inyectadas a la corriente sanguínea deberían ser solubles. Otros factores son también conocidos en el arte, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad.

Por "administración sistémica" se entiende absorción sistémica *in vivo* o acumulación de fármacos en la corriente sanguínea seguida de la distribución a través de todo el cuerpo. Las vías de administración que conducen a la absorción sistémica sin limitación: vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, vía oral, intrapulmonar e intramuscular.

5 Ejemplos adecuados para la formulación con las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen: inhibidores de poli-glicoproteínas (tales como Pluronic P85), que puede mejorar la introducción de los fármacos en el sistema nervioso central o SNC (Jolliet-Riant y Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13:16-26, 1999); polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli (DL-láctido coglicólido) para la administración de liberación controlada después de su implantación intracerebral (Emerich, D.F., et al., *Cell Transplant* 8:47-58, 1999, Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.); y nanopartículas cargadas, tales como aquellas realizadas con polibutilcianoacrilato, que puede administrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y puede alterar los mecanismos de captación neuronal (*Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 23:941-949, 1999). Otros ejemplos de estrategias de administración para las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen material descrito en Boado, et al., *J. Pharm. Sci.* 87:1308-1315, 1998; Tyler, et al., *FEBS Lett.* 421:280-284, 1999; Pardridge, et al., *PNAS USA.* 92:5592-5596, 1995; Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15:73-107, 1995; Aldrian-Herrada et al., *Nucleic Acids Res.* 26:4910-4916, 1998; y Tyler, et al., *PNAS USA.* 96:7053-7058, 1999.

La presente invención además incluye composiciones preparadas para su almacenamiento o administración, que incluye una cantidad farmacéuticamente efectiva de los compuestos deseados en un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en el arte farmacéutico, diluyentes y soportes aceptables para su uso terapéutico, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. 1985). Por ejemplo, pueden proporcionarse agentes conservantes, estabilizadores, colorantes y saborizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse agentes de suspensión y antioxidantes.

Una dosis farmacéuticamente efectiva es aquella dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición de, tratar, o aliviar un síntoma hasta cierto grado del estado de una enfermedad. Debería ser administrada una cantidad de 0,01 mg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal/día del ácido nucleico activo.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol tales como el monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de óxido de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener además uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo, o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

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

Polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua, proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes, pueden estar presentes también.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o una mezcla de éstos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfatidas naturales, por ejemplo habas de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones pueden contener además agentes edulcorantes y saborizantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con el arte conocido utilizando aquellos agentes de dispersantes o

humectantes adecuados que han sido mencionados anteriormente. La preparación inyectable estéril puede también ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un disolvente o diluyente parentalmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden ser empleados están el agua, una solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites fijos estériles se emplean de forma convencional como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite fijo blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los ARNip pueden también administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración por vía rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas normales, pero líquido a la temperatura rectal y se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Los ARNip pueden ser modificados ampliamente para mejorar la estabilidad mediante la modificación con grupos resistentes a la nucleasa, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-H. Para una revisión ver Usman y Cedergren, TIBS 17:34, 1992; Usman, et al., Nucleic Acids Symp. Ser. 31:163, 1994. Los constructos de ARNip pueden ser purificados mediante electroforesis en gel utilizando métodos generales o pueden ser purificados mediante cromatografía líquida de alta presión y resuspendidos en agua.

Sintetizar químicamente las moléculas de ácido nucleico con modificaciones (base, azúcar y/o fosfato) puede evitar su degradación por parte de las ribonucleasas séricas, lo que puede aumentar su potencia. Ver por ejemplo, Eckstein, et al., Patente Internacional N° WO 92/07065; Perrault et al., Nature 344:565, 1990; Pieken, et al., Science 253, 314, 1991; Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334, 1992; Usman, et al., Patente Internacional N° WO 93/15187; y Rossi et al., Patente Internacional N° WO 91/03162; Sproat, patente estadounidense N° 5.334.711; y Gold, et al., U.S. Patente N° 6.300.074. Todas las referencias anteriores describen diversas modificaciones químicas que pueden ser realizadas a las fracciones de base, fosfato y/o azúcar de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente patente.

Existen diversos ejemplos en el arte que describen modificaciones en el azúcar, base y fosfato que pueden ser introducidas en moléculas de ácido nucleico con una mejora significativa en la estabilidad y eficacia de su nucleasa. Por ejemplo, los oligonucleótidos se modifican para aumentar la estabilidad y/o aumentar la actividad biológica mediante la modificación con grupos resistentes a nucleasa, por ejemplo, modificaciones de bases de nucleótidos 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-H. Para una revisión, ver Usman y Cedergren, TIBS 17:34, 1992; Usman, et al., Nucleic Acids Symp. Ser. 31:163, 1994; Burgin, et al., Biochemistry 35:14090, 1996. La modificación en el azúcar de las moléculas de ácido nucleico han sido ampliamente descritas en el arte. Ver Eckstein et al., Publicación Internacional PCT N° WO 92/07065; Perrault, et al. Nature 344:565-568, 1990; Pieken, et al. Science 253:314-317, 1991; Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334-339, 1992; Usman et al. Publicación Internacional PCT N° WO 93/15187; Sproat, Patente estadounidense N° 5.334.711 y Beigelman, et al., J. Biol. Chem. 270:25702, 1995; Beigelman, et al., Publicación Internacional PCT N° WO 97/26270; Beigelman, et al., Patente estadounidense N° 5.716.824; Usman, et al., Patente estadounidense N° 5.627.053; Woolf, et al., Publicación Internacional PCT N° WO 98/13526; Thompson, et al., Karpeisky, et al., Tetrahedron Lett. 39:1131, 1998; Earnshaw y Gait, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences) 48:39-55, 1998; Verma y Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998; y Burlina, et al., Bioorg. Med. Chem. 5:1999-2010, 1997. Tales publicaciones describen métodos generales y estrategias para determinar la localización de incorporación de las modificaciones del azúcar, base y/o fosfato y similares en las moléculas de ácido nucleico sin catálisis moduladora. En vista de tales revelaciones, pueden utilizarse modificaciones similares a las descritas en la presente patente para modificar las moléculas de ácido nucleico del ARNip de la presente invención siempre que la habilidad del ARNip para promover el ARNi en las células no se inhiba de forma significativa.

Mientras que la modificación química de los enlaces internucleotídicos de oligonucleótidos con fosforotioato, y/o de los enlaces 5'-metilfosfonato mejora la estabilidad, las modificaciones excesivas pueden causar cierta toxicidad o actividad disminuida. Por lo tanto, cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico, la cantidad de estos enlaces internucleotídicos debería minimizarse. La reducción en la concentración de estos enlaces debería reducir la toxicidad, dando como resultado una eficacia aumentada y especificidad más elevada de estas moléculas.

En algunos modos de realización, la invención presenta moléculas de ARNip modificadas, donde las modificaciones de la estructura principal de fosfato comprenden una o más sustituciones de fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal, y/o alquilsililo. Para una revisión de las modificaciones de la estructura principal de oligonucleótidos, ver Hunziker y Leumann, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, 1995, pp. 331-417, y Mesmaeker et al., "Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research," ACS, 1994, pp. 24-39.

Se describen métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico en Akhtar, et al., Trends Cell Bio. 2:139, 1992; "Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics," ed. Akhtar, 1995; Maurer, et al., Mol.

Membr. Biol. 16:129-140, 1999; Hofland y Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-192, 1999; y Lee, et al., ACS Symp. Ser. 752:184-192, 2000. En Beigelman, et al., Patente estadounidense N° 6.395.713, y Sullivan et al., PCT WO 94/02595 además se describen los métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico.

Estos protocolos pueden ser utilizados para la administración de virtualmente cualquier molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser administradas a células mediante una variedad de métodos conocidos para los expertos en el arte, incluyendo, pero sin estar restringidos a, la encapsulación interna o externa mediante liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (ver, por ejemplo, Gonzalez, et al., Bioconjugate Chem. 10:1068-1074, 1999; Wang, et al., Publicación Internacional PCT Nos. WO 03/47518 y WO 03/46185), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLGA (ver por ejemplo, la Patente estadounidense N° 6.447.796 y la solicitud de Patente estadounidense N° US 2002130430), nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteínicos (O'Hare y Normand, Publicación PCT de Patente Internacional N° WO 00/53722). De forma alternativa, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de las moléculas de ácido nucleico de la invención, ya sean subcutáneas, intramusculares, o intradérmica, puede tener lugar utilizando metodologías estándar de aguja y jeringuilla, o mediante tecnologías sin aguja tales como las descritas en Conry, et al., Clin. Cancer Res. 5:2330-2337, 1999, y Barry, et al., Publicación PCT Internacional N° WO 99/31262. Las moléculas de la presente invención pueden ser utilizadas como agentes farmacéuticos. Los agentes farmacéuticos evitan, modulan la incidencia, o tratan (alivian un síntoma hasta cierto grado, preferiblemente todos los síntomas) del estado de una enfermedad en un sujeto.

Por "ARN" se entiende una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" se entiende un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una fracción de beta-D-ribo-furanosa. Los términos incluyen ARN de cadena doble, ARN de cadena única, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, además de ARN alterado que difiere del ARN natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como por ejemplo al extremo o extremos del ARNip o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN de la presente invención pueden además comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos naturales o nucleótidos o desoxinucleótidos químicamente sintetizados. Estos ARN alterados pueden ser denominados como análogos o análogos de ARN naturales.

Por "estructura de caperuza" se entienden modificaciones químicas, que han sido incorporadas en cualquier terminal del oligonucleótido (ver, por ejemplo Adamic, et al., Patente estadounidense N° 5.998.203, incorporada en la presente patente a modo de referencia). Estas modificaciones terminales protegen la molécula de ácido nucleico de la degradación de la exonucleasa, y puede ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La caperuza puede estar presente en el extremo 5'-terminal (5'-cap) o en el 3'-terminal (3'-cap) o puede estar presente en ambos terminales. En ejemplos En ejemplos no limitativos, el 5'-cap incluye, pero no se limita a, glicerilo, residuo abásico desoxi invertido (fracción); nucleótido 4',5'-metileno; nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo), nucleótido 4'-tio; nucleótido carbocíclico; nucleótido 1,5-anhidrohexitol; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido de base modificada; enlace fosforoditioato; nucleótido treopentofuranosilo; nucleótido acíclico 3',4'-seco; nucleótido acíclico 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido acíclico 3,5-dihidroxipentilo, fracción de nucleótido 3'-3'-invertido; fracción de 3'-3'-invertido abásico; fracción de nucleótido 3'-2'-invertido; fracción abásica de 3'-2'-invertido; fosfato de 1,4-butanediol; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohexil fosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o una fracción de metilfosfonato puente o no puente.

Ejemplos del 3'-cap incluyen, pero no se limitan a, glicerilo, residuo abásico de desoxi invertido (fracción), nucleótido 4',5'-metileno; nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo); nucleótido 4'-tio, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alkil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato; 3-aminopropil fosfato; 6-aminohexil fosfato; 1,2-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; nucleótido 1,5-anhidrohexitol; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido de base modificada; fosforoditioato; nucleótido treopentofuranosilo; nucleótido acíclico 3',4'-seco; nucleótido 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido 3,5-dihidroxipentilo, fracción de nucleótido 5'-5'-invertido; fracción abásica de 5'-5'-invertido; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanediol fosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato puente o no puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, fracciones de metilfosfonato y 5'-mercapto puente y no puente (para más detalles ver Beaucage y Lyer, Tetrahedron 49:1925, 1993; incorporado en la presente patente a modo de referencia).

Por el término "no-nucleótido" se entiende cualquier grupo o compuesto que puede ser incorporado en una cadena de ácido nucleico en el lugar de una o más unidades de nucleótidos, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permite que las bases restantes muestren su actividad enzimática. El grupo o compuesto es abásico en tanto que no contiene una base de nucleótido reconocida habitualmente, tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo o timina y por lo tanto carece de una base en la posición 1'.

Es reconocido en el arte, tal como se utiliza en la presente patente, que "nucleótido" incluye bases naturales (estándar) y bases modificadas bien conocidas en el arte. Tales bases se localizan generalmente en la posición 1' de una fracción de azúcar de un nucleótido. Los nucleótidos generalmente comprenden una base, azúcar y un grupo

fosfato. Los nucleótidos pueden estar modificados o no modificados en la fracción de azúcar, fosfato y/o base, (también denominados de forma intercambiable como análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados, nucleótidos no naturales, nucleótidos no estándar y otros; ver por ejemplo, Usman y McSwiggen, supra; Eckstein, et al., Publicación PCT Internacional N° WO 92/07065; Usman, et al, Publicación PCT Internacional N° WO 93/15187; Uhlman & Peyman, supra, todas incorporadas en la presente patente a modo de referencia). Existen diversos ejemplos de bases de ácido nucleico modificadas conocidos en el arte según se resume en Limbach, et al., *Nucleic Acids Res.* 22:2183, 1994. Algunos de los ejemplos no limitativos de modificaciones de una base que pueden ser introducidas en las moléculas de ácido nucleico incluyen inosina, purina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2, 4, 6-trimetoxi benceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alkiluridinas (por ejemplo, 5-metiluridina), 5-alkiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alkilpirimidinas (por ejemplo 6-metiluridina), propina, y otras (Burgin, et al., *Biochemistry* 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, supra). Por "bases modificadas" en este aspecto se entiende bases de nucleótidos distintas de adenina, guanina, citosina y uracilo en la posición 1' o sus equivalentes.

Por "sitio diana" o "secuencia diana" o "secuencia fijada como diana" se entiende una secuencia dentro de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ARN) que está "fijado como diana" para su corte mediado por un constructo de ARNip que contiene secuencias dentro de su región antisentido que son complementarias a la secuencia diana.

Las moléculas de ARNip pueden estar en forma de complejo con lípidos catiónicos, empaquetados en el interior de liposomas, o administrado de cualquier otro modo a las células o tejidos diana. El ácido nucleico o los complejos de ácido nucleico pueden ser administrados localmente mediante inyección, bomba de infusión o stent, con o sin su incorporación en biopolímeros. En otra realización, se puede enlazar polietilenglicol (PEG) de forma covalente a compuestos de ARNip de la presente invención, al polipéptido, o a ambos. El PEG enlazado puede ser de cualquier peso molecular, preferiblemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 50.000 daltons (Da).

La región sentido puede conectarse a la región antisentido a través de una molécula conectora, tal como un conector polinucleótido o un conector no nucleótido.

"Repetición invertida" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que comprende un elemento sentido y antisentido situado de manera que sean capaces de formar un ARNip de doble cadena cuando la repetición es transcrita. La repetición invertida puede incluir de manera opcional una secuencia conectora o heteróloga tal como un ribozima de auto-corte entre los dos elementos de la repetición. Los elementos de la repetición invertida tienen una longitud suficiente para formar un ARN de doble cadena. Habitualmente, cada elemento de la repetición invertida es de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, preferiblemente aproximadamente nucleótidos de 20-30 bases, preferiblemente de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud.

"Ácido nucleico" hace referencia a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena única o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de estructura principal modificada, que son sintéticos, naturales, y no naturales, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, ribonucleótidos 2'-O-metilo, ácidos péptidonucleicos (APN).

"ARN de doble cadena grande" hace referencia a cualquier ARN de cadena doble que tenga un tamaño mayor de aproximadamente 40 pb por ejemplo, mayor de 100 pb, o más particularmente mayor de 300 pb. La secuencia de un ARNbc grande puede representar un segmento de un ARNm o todo el ARNm. El tamaño máximo del ARNbc grande no está limitado en la presente patente. El ARN de doble cadena puede incluir bases modificadas en las que la modificación puede ser a la cadena principal de azúcar-fosfato o al nucleósido. Tales modificaciones pueden incluir un heteroátomo de nitrógeno o azufre o cualquier otra modificación conocida en el arte.

La estructura de doble cadena puede estar formada por una cadena de ARN auto-complementaria, tal como ocurre para un ARN de horquilla, o un micro ARN o por hibridación de dos cadenas de ARN complementarias distintas.

"Solapamiento" hace referencia a cuando dos fragmentos de ARN tienen secuencias que se solapan por una pluralidad de nucleótidos en una cadena, por ejemplo, donde la pluralidad de nucleótidos (nt) asciende a tan pocos como 2-5 nucleótidos, o por 5-10 nucleótidos o más.

"Uno o más ARNbc" hace referencia a ARNbc que difieren entre sí en base a la secuencia primaria.

"ARNm o gen diana" hace referencia a cualquier gen o ARNm de interés. Los genes diana o ARNm pueden incluir genes de desarrollo y genes reguladores, además de genes metabólicos o genes estructurales o enzimas de codificación de genes. El gen diana puede ser endógeno o exógeno. El gen diana puede ser expresado en aquellas células en las que un fenotipo está siendo investigado, o en un organismo de manera que afecte directa o

indirectamente a la característica de un fenotipo. Tales células incluyen cualquier célula en el cuerpo de un adulto o animal embrionario o planta incluyendo un gameto o cualquier célula aislada tal como ocurre en una línea celular inmortal o en un cultivo de células primarias.

Usos para efectos antisépticos

5 En algunos aspectos, la presente revelación hace referencia en general a las área de sepsis. Más en particular, la presente invención hace referencia a composiciones y formulaciones de lipoaminoácidos y a sus usos para medicamentos y como agentes terapéuticos. La presente invención hace referencia en general a métodos de utilización de lipoaminoácidos para prevenir, tratar o mejorar la sepsis, el shock séptico, la sepsis inflamatoria, septicemia, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

10 La sepsis puede ser causada por infección cuando el sistema inmune está comprometido o sobrepasado, o debido a ciertas quimioterapias. Por ejemplo, endotoxinas de bacterias gram-negativas pueden inducir el shock séptico. La sepsis gram-negativa es una causa principal de las muertes en cuidados intensivos. La terapia antimicrobiana sola puede ser insuficiente para evitar la muerte en casos de sepsis. La sepsis puede estar acompañada de una variedad de mediadores inflamatorios. La respuesta inflamatoria sistémica incontrolada puede causar la muerte.

15 Los lipoaminoácidos de la presente revelación pueden ser activos con respecto a la reducción de la respuesta inmune a ciertas endotoxinas tales como los lipopolisacáridos. Los lipoaminoácidos anfipáticos catiónicos de la presente revelación pueden unirse a y neutralizar endotoxinas, reduciendo de este modo la respuesta inmune. Por tanto, la presente revelación contempla usos de lipoaminoácidos en medicamentos y métodos para prevenir, tratar o mejorar la sepsis, el shock séptico, sepsis inflamatoria, septicemia, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

20 Usos para la administración de agentes activos

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser utilizados para la administración de cualquier agente fisiológicamente activo, además de cualquier combinación de agentes activos, tal como se describe anteriormente o como se conoce en el arte. El agente activo puede estar presente en las composiciones y usos de la presente invención en una cantidad suficiente para proporcionar el efecto fisiológico o de mejora deseado.

25 Los compuestos y composiciones de la presente invención están dirigidos a mejorar la administración de una variedad de agentes farmacológicos y agentes biológicamente activos en sujetos mamíferos, incluyendo compuestos y fármacos de molécula pequeña, péptidos, proteínas, y agentes de vacunas.

Ejemplos de agentes activos incluyen un péptido, una proteína, un ácido nucleico, un ARN de cadena doble, un hematopoyético, un antiinfeccioso; un antidemencial; un antiviral, un antitumoral, un antipirético, un analgésico, un antiinflamatorio, un antiulceroso, un antialérgico, un antidepresivo, un psicotrópico, un cardiotónico, un antiarrítmico, un vasodilatador, un antihipertensivo, un diurético hipotensivo, un antidiabético, un anticoagulante, un agente de reducción del colesterol, un agente terapéutico para la osteoporosis, una hormona, un antibiótico, una vacuna, una citocina, una hormona, un factor de crecimiento, un factor cardiovascular, un factor de adhesión celular, un factor del sistema nervioso periférico o central, un factor de electrolitos humorales, una sustancia orgánica del sistema hemal, un factor de crecimiento óseo, un factor gastrointestinal, un factor renal, un factor del tejido conjuntivo, un factor de órgano sensorial, un factor del sistema inmune, un factor del sistema respiratorio, un factor de órgano genital, un andrógeno, un estrógeno, una prostaglandina, una somatotropina, una gonadotropina, una interleucina, un esteroide, un toxoide bacteriano, un anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo, y una inmunoglobulina.

40 Ejemplos de agentes activos incluyen eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, insulina, Factor VIII, Factor IX, interferón, heparina, hirugen, hirulos e hirudina.

Ejemplos de agentes activos incluyen morfina, hidromorfona, oximorfona, lovorfanol, levalorfan, codeína, nalmeveno, nalorfin, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, o nalbufina, cortisona, hidrocortisona, fludrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona, parametasona, flucinolona, colchicina, acetaminofén, agente antiinflamatorio no esteroideo AINES, aciclovir, ribavirina, trifluorotiridina, Arabinofuranosiladenina (Ara-A), acilguanósina, nordesoxiguanósina, azidotimidina, didesoxiadenosina, didesoxicidina, espirolactona, testosterona, estradiol, progestina, gonadotropina, estrógeno, progesterona, papaverina, nitroglicerina, un péptido intestinal vasoactivo, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, ciproheptadina, doxepina, imipramina, cimetidina, dextrometorfano, clozaril, superóxido dismutasa, neuro-encefalinas, anfotericina B, griseofulvina, miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, cefalosporina, tetraciclina, aminoglucósido, eritromicina, gentamicina, polimixina B, 5-fluorouracilo, bleomicina, metotrexato, hidroxiurea, didesoxiinosina, floxuridina, 6-mercaptapurina, doxorubicina, daunorubicina, l-darubicina, taxol, paclitaxel, tocoferol, quinidina, prazosina, verapamilo, nifedipina, diltiazem, activador tisular del plasminógeno TPA, factor de crecimiento epidérmico EGF, factor de crecimiento fibroblástico FGF- ácido o básico, factor de

5 crecimiento derivado de plaquetas PDGF, factor de crecimiento transformante TGF-alfa o beta, péptido intestinal vasoactivo, factor de necrosis tumoral TNF, factor de liberación hipotalámico, prolactina, hormona estimulante de la tiroides TSH, Hormona adrenocorticotropa ACTH, hormona paratiroidea PTH, hormona folículo-estimulante FSH, hormona liberadora de hormona luteinizante LHRH, endorfina, glucagón, calcitonina, oxitocina, carbetocina, aldoetecona, encefalina, somatostina, somatotropina, somatomedina, hormona estimulante de melanocitos alfa, lidocaína, sufentanilo, terbutalina, droperidol, escopolamina, gonadorelina, ciclopirox, buspirona, cromolina sódica, midazolam, ciclosporina, lisinopril, captopril, delapril, ranitidina, famotidina, superóxido dismutasa, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa ribonucleasa, tripsina, quimotripsina, papaína, bombesina, sustancia P, vasopresina, alfa-globulinas, transferrina, fibrinógeno, beta-lipoproteína, beta-globulina, protrombina, ceruloplasmina, alfa2-glicoproteína, alfa2-globulina, fetuina, alfa1-lipoproteína, alfa1-globulina, albúmina, y prealbúmina.

15 Ejemplos de agentes activos incluyen opioides o antagonistas de opioides, tales como morfina, hidromorfona, oximorfona, lovorfanol, levorfanol, codeína, nalmefteno, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, y nalbufina; corticosteronas, tales como cortisona, hidrocortisona, fludrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametoasona, parametasona, y fluocinolona; otros antiinflamatorios tales como colchicina, ibuprofeno, indometacina, y piroxicam; agentes antivirales tales como aciclovir, ribavirina, trifluorotiridina, Ara-A (Arabinofuranosiladenina), acilguanósina, nordesoxiguanósina, azidotimidina, didesoxiadenosina, y didesoxiciditina; anti-andrógenos tales como espironolactona; andrógenos, tales como testosterona; estrógenos, tales como estradiol; progestinas; relajantes musculares, tales como papaverina; vasodilatadores, tales como nitroglicerina, péptido intestinal vasoactivo y péptido relacionado con el gen de la calcitonina; antihistamínicos, tales como ciproheptadina; agentes con actividad bloqueante del sitio del receptor de histaminas, tales como doxepina, imipramina, y cimetidina; antitusivos, tales como dextrometorfano; neurolépticos tales como clozaril; antiarrítmicos; antiepilépticos; enzimas, tales como superóxido dismutasa y neuroencefalinas; agentes antifúngicos, tales como anfotericina B, griseofulvina, miconazol, ketoconazol, tioconazol, itraconazol, y fluconazol; antibacterianos, tales como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, aminoglucósidos, eritromicina, gentamicinas, polimixina B; agentes anti-cancerígenos, tales como 5-fluorouracilo, bleomicina, metotrexato, y hidroxiurea, didesoxiinosina, floxuridina, 6-mercaptopurina, doxorubicina, daunorubicina, l-darubicina, taxol, y paclitaxel; antioxidantes, tales como tocoferoles, retinoides, carotenoides, ubiquinonas, quelantes de metales, y ácido fólico; agentes antiarrítmicos, tales como quinidina; agentes antihipertensivos tales como prazosina, verapamilo, nifedipina, y diltiazem; analgésicos tales como acetaminofén y aspirina; anticuerpos monoclonales y policlonales, incluyendo anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos; oligonucleótidos anti-sentido; y ARN, ARN regulador, ARN de interferencia, ADN, y vectores virales que comprenden genes que codifican péptidos y proteínas terapéuticas.

Composiciones y Formulaciones para su administración

35 Tal como se utiliza en la presente patente, los términos “administrar” y “administración” abarcan todos los medios para administrar directa o indirectamente un compuesto o composición a un sitio de acción. Los compuestos y composiciones de la presente revelación pueden ser administrados solos, o en combinación con otros compuestos, composiciones, o agentes terapéuticos que no se revelan en la presente patente.

40 Las composiciones y métodos de la invención pueden ser administrados a sujetos mediante una variedad de modos de administración por vía mucosa, incluyendo la administración por vía oral, rectal, vaginal, intranasal, intrapulmonar, o transdérmica, o por administración tópica en los ojos, oídos, piel u otras superficies mucosas. En algunos aspectos de la presente invención, la capa de tejido mucoso incluye una capa de célula epitelial. La célula epitelial puede ser pulmonar, traqueal, bronquial, alveolar, nasal, bucal, epidérmica, o gastrointestinal. Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas utilizando actuadores convencionales tales como dispositivos de pulverización mecánicos, además de presurizados, activados eléctricamente, u otros tipos de actuadores.

45 Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas en una solución acuosa como un pulverizador nasal o pulmonar, y puede ser dispensado en forma de pulverización mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en el arte. La administración pulmonar de una composición de la presente invención puede lograrse mediante la administración de la composición en forma de gotas, partículas, o pulverización, que puede ser, por ejemplo, en aerosol, atomizada, o nebulizada. La administración pulmonar puede ser realizada administrando la composición en forma de gotas, partículas, o pulverizaciones, a través de los pasajes bronquiales o nasales. Las partículas de la composición, pulverizador, o aerosol pueden encontrarse en una forma líquida o sólida. Se revelan sistemas preferidos para dispensar líquidos como una pulverización nasal en la Patente estadounidense N° 4.511.069. Tales formulaciones pueden ser preparadas de manera conveniente disolviendo las composiciones según la presente invención en agua para producir una solución acuosa, y para volver dicha solución estéril. Las formulaciones pueden presentarse en envases multi-dosis, por ejemplo en el sistema de dispensación hermético revelado en la Patente estadounidense N° 4.511.069. Otros sistemas de administración de pulverización nasal adecuados han sido descritos en Transdermal Systemic Medication, Y.W. Chien ed., Elsevier Editores, New York, 1985; y en la Patente estadounidense N° 4.778.810. Formas de administración en aerosol adicionales pueden incluir, por ejemplo, nebulizadores de aire comprimido, de chorro, ultrasónico, y piezoeléctrico, que administran el

agente biológicamente activo disuelto o suspendido en un disolvente farmacéutico, por ejemplo, agua, etanol, o mezclas de los mismos.

5 Las soluciones de pulverización nasal y pulmonar de la presente invención comprenden, habitualmente, el fármaco o el fármaco a ser administrado, formulado de manera opcional con un agente tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato-80), y uno o más tampones. En algunas realizaciones de la presente invención, la solución de pulverización nasal comprende además un propelente. El pH de la solución de pulverización nasal puede ser de aproximadamente un pH 6,8 a 7,2. Los disolventes farmacéuticos empleados pueden ser además un tampón acuoso ligeramente ácido de pH 4-6. Pueden añadirse otros componentes para mejorar o mantener la estabilidad química, incluyendo conservantes, tensioactivos, dispersantes, o gases.

10 En algunas realizaciones, la presente invención es un producto farmacéutico que incluye una solución que contiene una composición de la presente invención y un actuador para un pulverizador o aerosol pulmonar, de mucosa, o intranasal.

Una forma de dosificación de la composición de la presente invención puede ser líquida, en forma de gotitas o una emulsión, o en forma de aerosol.

15 Una forma de dosificación de la composición de la presente invención puede ser sólida, que puede ser reconstituido en un líquido previamente a su administración. El sólido puede ser administrado como un polvo. El sólido puede estar en forma de una cápsula, comprimido o gel.

20 Para formular las composiciones para la administración pulmonar dentro de la presente invención, el agente biológicamente activo puede combinarse con diversos aditivos o componentes de mejora de la administración farmacéuticamente aceptables, además de una base o soporte para la dispersión del agente o agentes activos. Ejemplos de aditivos o componentes de mejora de la administración incluyen agentes de control del pH tales como arginina, hidróxido de sodio, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico, y mezclas de los mismos. Otros aditivos o componentes de mejora de la administración incluyen anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotónicos (por ejemplo cloruro de sodio, manitol, sorbitol), inhibidores de la adsorción (por ejemplo, Tween 80), agentes de mejora de la solubilidad (por ejemplo, ciclodextrinas y derivados de los mismos), estabilizantes (por ejemplo, seroalbúmina), y agentes reductores (por ejemplo, glutatión). Cuando la composición para la administración por vía mucosa es un líquido, la tonicidad de la formulación, según se mide en referencia a la tonicidad de una solución salina fisiológica al 0,9% (p/v) tomada como unidad, se ajusta habitualmente a un valor al cual no se inducirá ningún daño tisular irreversible o sustancial en la mucosa en el sitio de administración. Generalmente, la tonicidad de la solución se ajusta a un valor de aproximadamente 1/3 a 3, más habitualmente 1/2 a 2, y con mayor frecuencia 3/4 a 1,7.

35 El agente biológicamente activo puede dispersarse en una base o vehículo, que puede comprender un compuesto hidrofílico que tiene la capacidad de dispersar el agente activo y cualquier aditivo deseado. La base puede ser seleccionada de una amplia gama de soportes adecuados, incluyendo pero sin limitarse a, copolímeros de ácidos policarboxílicos o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido maleico) con otros monómeros (por ejemplo, metil (met)acrilato, ácido acrílico, etc.), polímeros de vinilo hidrofílicos, tales como acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidina, derivados de celulosa tales como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc., y polímeros naturales tales como chitosán, colágeno, alginato de sodio, gelatina, ácido hialurónico, y sales metálicas no tóxicas de los mismos. Puede seleccionarse un polímero biodegradable como una base o soporte, por ejemplo, ácido poliláctico, copolímero del ácido poli(láctico- ácido glicólico), ácido polihidroxibutírico, copolímero del ácido poli(hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los mismos. De manera alternativa o adicional, pueden emplearse ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como ésteres del ácido graso de poliglicerina, ésteres del ácido graso de sacarosa, etc. Pueden utilizarse polímeros hidrofílicos y otros soportes solos o en combinación, y puede impartirse integridad estructural aumentada al soporte mediante cristalización parcial, enlace iónico, entrecruzamiento y similares. El soporte puede ser proporcionado en una diversidad de formas, incluyendo, soluciones fluidas o viscosas, geles, pastas, polvos, microsferas y películas para la aplicación directa en la mucosa nasal. El uso de un soporte seleccionado en este contexto puede resultar en la promoción de absorción del agente biológicamente activo.

50 El agente biológicamente activo puede combinarse con la base o el soporte de acuerdo con una variedad de métodos, y la liberación del agente activo puede ser mediante difusión, desintegración del soporte, o formulación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, el agente activo es dispersado en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas), preparado a partir de un polímero adecuado, por ejemplo, isobutil 2-cianoacrilato (ver, por ejemplo, Michael, et al., J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991), y dispersado en un medio de dispersión biocompatible aplicado a la mucosa nasal, que produce una administración sostenida y actividad biológica durante un tiempo prolongado.

Las formulaciones para la administración por vía mucosa, nasal, o pulmonar puede contener un compuesto hidrofílico de bajo peso molecular como base o excipiente. Tales compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular

proporcionan un medio de paso a través del cual un agente activo soluble en agua, tal como un péptido o proteína fisiológicamente activos, pueden difundirse a través de la base a la superficie corporal donde el agente activo se absorbe. El compuesto de bajo peso molecular hidrofílico absorbe de manera opcional humedad de la mucosa o de la atmósfera de administración y disuelve el péptido activo soluble en agua. El peso molecular del compuesto hidrofílico de bajo peso molecular es generalmente no más de 10.000 y preferiblemente no más de 3.000. Ejemplos de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular, tales como oligo-, di- y monosacáridos incluyendo sacarosa, manitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina, polietilenglicol, y mezclas de los mismos. Ejemplos adicionales de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular incluyen N-metilpirrolidona, alcoholes (por ejemplo, alcohol oligovinílico, etanol, etilenglicol, propilenglicol, etc.), y mezclas de los mismos.

Las composiciones de la presente invención puede contener de manera alternativa como sustancias soporte farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampones, agentes de ajuste de tonicidad, y agentes humectantes, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, y mezclas de los mismos. Para composiciones sólidas, se pueden utilizar soportes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarinato sódico, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

En determinados modos de realización de la invención, el agente biológicamente activo puede ser administrado en una formulación de liberación retardada, por ejemplo en una composición que incluya un polímero de liberación retardada. El agente activo puede ser preparado con soportes que protegerán contra una liberación rápida, por ejemplo un vehículo de liberación controlada tal como un polímero, un sistema de administración encapsulado o un gel bioadhesivo. La administración prolongada del agente activo, en diversas composiciones de la invención puede lograrse incluyendo en la composición agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina.

Dentro de ciertos modos de realización de la presente invención, una composición puede contener uno o más tensioactivos naturales o sintéticos. Determinados tensioactivos naturales se encuentran en el pulmón humano (tensioactivo pulmonar), y son una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas que forman una monocapa en la interfaz aire-líquido alveolar y reduce la tensión superficial hasta casi cero en la espiración y evita el colapso alveolar. Sobre un 90% (en peso) del tensioactivo pulmonar está compuesto de fosfolípidos, donde aproximadamente un 40-80% es DPPC y el resto son fosfatidilcolinas insaturadas POPG, POPC y fosfatidilglicerol. El 10% (en peso) restante del tensioactivo está compuesto de proteínas plasmáticas y apoproteínas, tales como proteínas superficiales (SP)-A, SP-B, SP-C y SP-D.

Ejemplos de tensioactivos naturales que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen SURVANTA™ (beractant), CURIOSURF™ (poractant alfa) y INFASURF™ (calfactant), y mezclas de los mismos.

Ejemplos de tensioactivos incluyen sinapultida; una combinación de dipalmitoilfosfatidilcolina, palmitoiloleoil fosfatidilglicerol y ácido palmítico; SURFAXIN™ (lucinactant); y EXOSURF™ (colfosceril); componentes que pueden contener tiloxapol, DPPC, y hexadecanol; y mezclas de los mismos.

Las composiciones de la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos en el arte. Métodos de realización de composiciones lipídicas incluyen métodos de inyección de etanol y métodos de extrusión utilizando un sistema de Extrusora Lipex de Northern Lipids con filtros de membrana de policarbonato apiladas de un tamaño de poro definido. La sonicación que utiliza una punta de sonda y baños de ultrasonidos pueden ser empleadas para producir partículas lipídicas de tamaño uniforme. Los tamaños de partícula monodispersas pueden ser obtenidas sin la adición del componente de ácido nucleico. Para composiciones de transfección *in vitro*, el componente de ácido nucleico puede añadirse después de que se realice el agente de transfección y se establezca mediante componentes tampón adicionales. Para las composiciones para la administración *in vivo*, el componente de ácido nucleico es parte de la formulación.

Las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden ser administradas por diversas vías, por ejemplo, para efectuar la administración sistémica a través de las vías intravenosa, parenteral, o intraperitoneal. En algunos modos de realización, un agente puede ser administrado intracelularmente, por ejemplo, en células de un tejido diana tal como el pulmón o hígado, o en tejidos inflamados. Incluidos en la presente revelación se encuentran métodos para la administración de un agente extrayendo células de un sujeto, administrando un agente a las células extraídas, y reintroduciendo las células en un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para la administración de un agente *in vivo*. Una composición puede ser administrada por vía intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal a un sujeto. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona un método para la administración de un agente *in vivo*. Una composición puede ser administrada por vía intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal a un sujeto. En algunos modos de realización, la invención proporciona métodos para la administración *in vivo* de un agente al pulmón de un sujeto mamífero.

Realizaciones adicionales

- Mientras que la presente invención ha sido descrita en relación a ciertos modos de realización, y muchos detalles han sido expuestos para propósitos ilustrativos, será aparente para aquellos expertos en el arte que la presente invención incluye modos de realización adicionales, y que algunos de los detalles descritos en la presente patente pueden ser variados considerablemente sin apartarse de la presente invención. La presente invención incluye tales realizaciones adicionales, modificaciones y equivalentes. En particular, la presente invención incluye cualquier combinación de las características, términos, o elementos de diversos componentes ilustrativos y ejemplos.
- El uso en la presente patente de los términos “un”, “uno/a”, “el/la” y términos similares en la descripción de la invención, y en las reivindicaciones, han de ser interpretadas tanto en el singular como en el plural.
- Los términos “que comprende”, “que tiene”, “incluyendo” y “que contiene” han de interpretarse como términos abiertos que significan, por ejemplo, “incluyendo, pero sin limitarse a”. Por tanto, términos tales como “que comprende”, “que tiene”, “incluyendo” y “que contiene” han de interpretarse como inclusivos, no exclusivos.
- La enumeración de un rango de valores en la presente patente hace referencia, individualmente, a cada valor separado que entre dentro del rango como si fueran relacionados individualmente en la presente patente, estén o no algunos de los valores expresamente enumerados dentro del rango. Por ejemplo, el rango “4 a 12” incluye sin limitación los valores 5, 5,1, 5,35 y cualquier otro valor absoluto, fraccional, o racional mayor de o igual a 4 y menos de o igual a 12. Los valores específicos empleados en la presente patente deberán entenderse como un ejemplo y no para limitar el alcance de la invención.
- La relación de un rango de número de átomos de carbono en la presente patente hace referencia individualmente a cada uno de los valores por separado que se encuentran dentro del rango, como si fueran relacionados individualmente en la presente patente, estén o no algunos de los valores dentro del rango estén expresamente relacionados. Por ejemplo, el término “C1-22” incluye sin limitación las especies C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, y C22.
- Debe interpretarse que las definiciones de los términos técnicos proporcionados en la presente patente incluyen sin relación aquellos significados asociados con estos términos conocidos por los expertos en el arte, y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención. Se deberá interpretar que las definiciones de los términos técnicos proporcionados en la presente invención dominan sobre definiciones alternativas en el arte o definiciones que se incorporan en la presente patente a modo de referencia hasta el punto en que las definiciones alternativas entren en conflicto con la definición proporcionada en la presente patente.
- Los ejemplos proporcionados en la presente patente, y el lenguaje a modo de ejemplo empleado en el presente documento son únicamente para el propósito de ilustración, y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención.
- Cuando una lista de ejemplos se proporciona, tal lista de compuestos o moléculas adecuadas para esta invención, será aparente para aquellos expertos en el arte que también son adecuadas mezclas de los compuestos o moléculas detalladas.

Ejemplos**Ejemplo 1**

Preparación de C8-norArg-C8 N-(4-guanidino-1-oxo-1-(octilamino)butan-2-il)octanamida

- Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 3 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 30 ml de DCM seco en una cuba de reacción de 30 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 2,577g (5,85 mmol, 1,5 eq) de Fmoc-Dab(diBoc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,23 ml (12,87 mmol, 3,3 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).
- Arg-Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3XDCM, 2XDMF, 3XDCM y el grupo Fmoc fue desprotegido con 30 ml de piperidina/DMF al 20% durante 30min.
- C8- Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y para la reacción de acoplamiento se añadieron 1,48 g (11,7 mmol) de ácido C8 (Sigma, $M_w=144,22$, $d=0,910$), 4,84g (11,7 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,23 ml (12,87 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 30 ml de DMF.

Después de 1 h de reacción la resina se lavó con 3xDCM, 2xMeOH y 3 xDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

C8-Dab(Boc)-OH ($M_w=344,49$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (5 x 30 ml durante 2 min se filtró a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

5 C8-Dab(Boc)-C8 ($M_w=455,74$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa 2,32 ml (11,7 mmol) de C8-amina (Sigma, $M_w=129325$, $d=0,782$), se añadieron 4,84 g (11,7 mmol) de HCTU ($M_w=473,7$) y 2,23 ml (12,87 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 1 h se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x NaCO₃ al 10% y 3 x NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó.

10 C8-Dab-C8 ($M_w=355,74$). Al residuo oleoso de la reacción previa, se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 1 h el disolvente se evaporó.

C8-norArg(diBoc)-C8 ($M_w=597,74$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadió 2,23 g (5,85 mM, 1,5 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4horas se evaporó el DCM.

15 C8-norArg-C8 ($M_w=398,8$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 95% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 3 horas se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en MeOH/AcCN/0,5 M HCl 1:1:1 y se purificó mediante RP_Akta Explorer en una columna Phenomenex C18 (Phenomenex RP, 250 X 21,2 mm, N° de serie: 234236-1, volumen de Columna 83 ml) y se eluyó con 50-100% de gradiente de acetonitrilo utilizando agua como fase móvil dentro de 3 CV; $\lambda=215$ nm. Se evaporó el acetonitrilo y el producto fue liofilizado. Rendimiento: 1,1 g.

20 Ejemplo 2

De igual manera que en el Ejemplo 1 se realizaron C10-norArg-C10 (Rendimiento: 1,2 g), C12-norArg-C12 (Rendimiento: 2,9 g), C14-norArg-C14 (Rendimiento: 630 mg), y C16-norArg-C16 (Rendimiento: 1,0 g).

Ejemplo 3

Preparación de C12-norArg-C12

25 N-(4-guanidino-1-oxo-1-(dodecilamino)butan-2-il)dodecanamida

Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 8 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 100 ml de DCM seco en una cuba de reacción de 500 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 5g (11,35 mmol, 1,2 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 4 ml (22,7 mmol, 2,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

30 Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas de agitación en el agitador la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3XDCM, 2XDMF, 3XDCM y se desprotegió el grupo Fmoc 2 veces con 50 ml de piperidina/DMF al 20% durante 15min.

35 C12-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y para la reacción de acoplamiento se añadieron 4,54 g (22,7 mmol) de ácido C12 (Sigma, $M_w=200,32$), 9,48 g (22,7 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 4,52ml (26 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 100 ml de DMF.

Después de 1 hora de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

C12-Dab(Boc)-OH ($M_w=400,59$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (se filtró 5 x 50 ml durante 2 min a un matraz con 10 ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

40 C12-Dab(Boc)-C12 ($M_w=567,95$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 2,168 g (11,7 mmol) de amina C12- (Sigma, $M_w=185,36$), 4,48 g (11,7 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,23 ml (12,87 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 1 h, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,1 M HCl, 3x 5% NaCO₃ y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó.

45 C12- Dab-C12 ($M_w=467,9$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 150 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 1 h se evaporó el disolvente.

5 C12- norArg(diBoc)-C12 ($M_w=710,13$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9-10 con TEA. Se añadieron 9 g (23 mM) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 3 horas se evaporó el DCM. El producto se purificó en un instrumento TELEDYNE Isco CombiFlash Rf, 120g en columna de gel de sílice en fase normal, 100% DCM para 5,4 CV(volumen de columna) y 0-5% MeOH para 6,3 CV, detección 215 nm, flujo 70 ml/min.

C12-norArg-C12 ($M_w=509,92$) Al residuo de la reacción previa se añadieron 150 ml de 70% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 1 h se evaporó el disolvente. El residuo se precipitó mediante 0,5 M HCl.

Ejemplo 4

Preparación de C18-norArg-C18

10 N-(4-guanidino-1-oxo-1-(octadecilamino)butan-2-il)octadecanamida

Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 3 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 30 ml de DCM seco en una cuba de reacción de 30 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 2,577g (5,85 mmol, 1,5 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,03 ml (11,7 mmol, 3,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

15 Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3xDCM, 2xDMF, 3xDCM y el grupo Fmoc fue desprotegido con 30 ml de piperidina/DMF al 20% durante 30min.

C18-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM2 y para la reacción de acoplamiento se añadieron 2,21 g (7,8 mmol) de ácido C18 (Sigma, $M_w=284,48$), 3,32 g (7,8 mmol) de HCTU ($M_w=473,7$) y 1,49 ml (8,58 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 30 ml de DMF.

20 Después de 1 hora de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

C18-Dab(Boc)-OH ($M_w=568,56$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (5 x 30 ml durante 2 min se filtró a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

25 C18-Dab(Boc)-C18 ($M_w=735,95$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 2,1g (7,8 mmol) de amina C18- (Sigma, $M_w=269,52$), 3,32 g (7,8 mmol) de HCTU ($M_w=473,7$) y 1,49 ml (8,58 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 1 h, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x 10% NaCO₃ y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó.

30 C18-Dab-C18 ($M_w=635,9$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 1 h se evaporó el disolvente.

C18-norArg(diBoc)-C18 ($M_w=872,13$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadieron 2,23 g (5,85 mM, 1,5 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4 horas se evaporó el DCM.

35 C18-norArg-C18 ($M_w=677,92$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 95% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 3 h se evaporó el disolvente. El residuo se precipitó por la mezcla de AcCN/0,5 M HCl 1:1.

Ejemplo 5

Preparación de C18(oleico)-norArg-C8

N-(4-guanidino-1-oxo-1-(octilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida

40 Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 5 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 50 ml de DCM seco, en una cuba de reacción de 50 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 5,726 g (13 mmol, 2 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,26 ml (13 mmol, 2,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas la resina se lavó 3x con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3XDCM, 2XDMF, 3XDCM y se desprotegió el grupo Fmoc 2 veces con 40 ml de piperidina/DMF al 20% durante 30 min.

C18oleico-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM, y para la reacción de acoplamiento se añadieron 3,7 g (13 mmol) de ácido oleico (Sigma, $M_w=282,47$, $d=0,891$), 5,37 g (13 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,62 ml (13 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF.

- 5 Después de 2 horas de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

C18oleico-Dab(Boc)-OH ($M_w=538,56$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (se filtró 5 x 50 ml durante 2 min a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

- 10 C18oleico-Dab(Boc)-C8 ($M_w=594,01$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 1,227 g (9,75 mmol) de amina C8- (Sigma, $M_w=129,25$), 4,033 g (9,75 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 1,69 ml (9,75 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 4 horas, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x 10% NaCO_3 y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó.

- 15 C18oleico-Dab-C8 ($M_w=493,92$). Al residuo oleoso de la reacción previa, se añadieron 70 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se retiró el disolvente bajo presión reducida.

C18oleico-norArg(diBoc)-C8 ($M_w=735,95$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadió 2,543 g (6,5 mM, 1 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4horas se evaporó el DCM.

- 20 C18oleico-norArg-C8 ($M_w=535,89$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se evaporó el disolvente. El producto crudo se purificó en un instrumento TELEDYNE Isco CombiFlash Rf, utilizando una columna de 40 g de gel de sílice en fase normal, 100% DCM para 3 CV (volumen de columna) y 0-15% MeOH para 7 CV, detección 214 nm, flujo 45 ml/min TLC: $R_f=0,2$ (CH_2Cl_2 : MeOH=9:1). El DCM/MeOH se evaporó y el residuo se precipitó mediante 0,1M HCl. Rendimiento: 0,7 g.

Ejemplo 6

- 25 Preparación de C18(oleico)-norArg-C12

N-(4-guanidino-1-oxo-1-(dodecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida

- 30 Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 5 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 50 ml de DCM seco, en una cuba de reacción de 50 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 5,726 g (13 mmol, 2 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,26 ml (13 mmol, 2,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3XDCM, 2XDMF, 3XDCM y se desprotegió el grupo Fmoc 2 veces con 40 ml de piperidina/DMF al 20% durante 30 min.

- 35 C18oleico-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM, y para la reacción de acoplamiento se añadieron 3,7 g (13 mmol) de ácido oleico (Sigma, $M_w=282,47$, $d=0,891$), 5,37 g (13 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,62 ml (13 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF.

Después de 2 horas de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

- 40 C18oleico-Dab(Boc)-OH ($M_w=538,56$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (se filtró 5 x 50 ml durante 2 min a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

- 45 C18oleico-Dab(Boc)-C12 ($M_w=650,03$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 1,76 g (9,75 mmol) de amina C12- (Sigma, $M_w=185,36$), 4,033 g (9,75 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 1,69 ml (9,75 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 4 horas, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x 10% NaCO_3 y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO_4 anhidro y se evaporó.

C18oleico-Dab-C12 ($M_w=549,91$). Al residuo oleoso de la reacción previa, se añadieron 70 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se retiró el disolvente bajo presión reducida.

C18oleico-norArg(diBoc)-C12 ($M_w=792,5$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadieron 2,543 g (6,5 mM, 1 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4 horas se evaporó el DCM.

5 C18oleico-norArg-C12 ($M_w=591,55$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se evaporó el disolvente. El producto crudo se purificó en un instrumento TELEDYNE Isco CombiFlash Rf, utilizando una columna de 40 g de gel de sílice en fase normal, 100% DCM para 3 CV (volumen de columna) y 0-20% MeOH para 10 CV, detección 214 nm, flujo 45 ml/min. TLC: $R_f=0,2$ (CH_2Cl_2 : MeOH=9:1). El DCM/MeOH se evaporó y el residuo se precipitó mediante 0,1M HCl.

Ejemplo 7

10 Preparación de C18(oleico)-norArg-C16

N-(4-guanidino-1-oxo-1-(hexadecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida

15 Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 5 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 50 ml de DCM seco, en una cuba de reacción de 50 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 5,726 g (13 mmol, 2 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,26 ml (13 mmol, 2,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

Dab(Boc)-resina. Después de 2 horas la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3XDCM, 2XDMF, 3XDCM y se desprotegió el grupo Fmoc 2 veces con 40 ml de piperidina/DMF al 20% durante 30 min.

20 C18oleico-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y para la reacción de acoplamiento se añadieron 3,7 g (13 mmol) de ácido oleico (Sigma, $M_w=282,47$, $d=0,891$), 5,37 g (13 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,62 ml (13 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF.

Después de 2 horas de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

25 C18oleico-Dab(Boc)-OH ($M_w=538,56$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (se filtró 5 x 50 ml durante 2 min a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

30 C18oleico-Dab(Boc)-C16 ($M_w=705,95$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 2,354 g (9,75 mmol) de amina C16- (Sigma, $M_w=241,46$), 4,033 g (9,75 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 1,69 ml (9,75 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 4 horas, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x 10% $NaCO_3$ y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con $MgSO_4$ anhidro y se evaporó.

C18oleico-Dab-C16 ($M_w=605,9$). Al residuo oleoso de la reacción previa, se añadieron 70 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se retiró el disolvente bajo presión reducida.

35 C18oleico-norArg(diBoc)-C16 ($M_w=842,13$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadieron 2,543 g (6,5 mM, 1 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4 horas se evaporó el DCM.

40 C18oleico-norArg-C16 ($M_w=647,92$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se evaporó el disolvente. El producto crudo se purificó en un instrumento TELEDYNE Isco CombiFlash Rf, utilizando una columna de 48 g de gel de sílice en fase normal, 100% DCM para 3 CV (volumen de columna) y 0-20% MeOH para 10 CV, detección 214 nm, flujo 45 ml/min. El DCM/MeOH se evaporó y el residuo se precipitó mediante 0,1M HCl.

Ejemplo 8

Preparación de C18(oleico)-norArg-C18

N-(4-guanidino-1-oxo-1-(octadecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida

45 Fmoc-Dab(Boc)-resina. A 5 g de resina de cloruro de 2-clorotritil con sustitución de 1,3 mmol/g (Novabiochem, 01-64-0114) en 50 ml de DCM seco, en una cuba de reacción de 60 ml para síntesis en fase sólida, se añadieron 5,726

ES 2 531 520 T3

g (13 mmol, 2 eq) de Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w=440,5$, (ácido Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α,γ -diaminobutírico, AnaSpec, 28246) y 2,26 ml (13 mmol, 2,0 eq) de DIPEA (Aldrich, $M_w=129,2$, $d=0,74$).

Dab(Boc)-resina. Después de 3 horas la resina se lavó 3X con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3xDCM, 2xDMF, 3xDCM y se desprotegió el grupo Fmoc 2 veces con 50 ml de piperidina/DMF al 20% durante 15 min.

- 5 C18:1-Dab(Boc)-resina. Después de la desprotección de Fmoc la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y para la reacción de acoplamiento se añadieron 3,7 g (13 mmol) de ácido oleico (Sigma, $M_w=282,47$, $d=0,891$), 5,37 g (13 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 2,62 ml (13 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF.

Después de 1 hora de reacción la resina se lavó con 3XDCM, 2XMeOH y 3 XDCM y el progreso de la reacción se comprobó mediante la prueba de Kaiser que fue negativa (sin presencia de grupos amina libres).

- 10 C18:1-Dab(Boc)-OH ($M_w=566,56$) se separó de la resina mediante TFA/DCM al 1% (se filtró 5 x 50 ml durante 2 min a un matraz con 2ml de piridina/ MeOH al 10%) y se evaporó el disolvente.

C18:1-Dab(Boc)-C18:1 ($M_w=734,95$). El segundo acoplamiento se realizó en solución. Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 3,725 g (9,75 mmol) de oleil-amina (Sigma, $M_w=267,49$, 70%), 4,033 g (9,75 mmol) de HCTU ($M_w=413,7$) y 1,69 ml (9,75 mmol) de DIPEA ($M_w=129,2$, $d=0,74$) en 50 ml de DMF. Después de 4 horas, se añadieron 100 ml de AcOEt y se lavó la capa orgánica en un embudo de decantación con 3 X 0,5 M HCl, 3x 10% NaCO₃ y 3 X NaCl. La capa de AcOEt se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó.

- 15 C18:1-Dab-C18 ($M_w=635,9$). Al residuo oleoso de la reacción previa, se añadieron 100 ml de 80% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 20 min se evaporó el disolvente.

- 20 C18:1-norArg(diBoc)-C18:1 ($M_w=874,13$). El residuo se disolvió en 50 ml de DCM y se ajustó el pH a 9 con TEA. Se añadieron 2,348 g (6 mM, 1 eq) de 1,3-Di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina ($M_w=391,36$, Aldrich 15033) y después de 4 horas se evaporó el DCM.

- 25 C18:1-norArg-C18:1 ($M_w=674,1$). Al residuo oleoso de la reacción previa se añadieron 100 ml de 95% TFA/DCM 2,5 % TIS y después de 3 horas se evaporó el disolvente. El producto crudo se purificó en un instrumento TELEDYNE Isco CombiFlash Rf, utilizando una columna de 48 g de gel de sílice en fase normal, 100% DCM para 3 CV (volumen de columna) y 0-20% MeOH para 10 CV, detección 214 nm, flujo 45 ml/min. El DCM/MeOH se evaporó y el residuo se precipitó mediante 0,1M HCl. Rendimiento: 3,2 g.

Ejemplo 9

Ejemplo de ensayo *in vitro* para la disminución (knockdown) de la expresión de genes LacZ en células 9L

- 30 9L/LacZ es una línea celular de gliosarcoma de rata que expresa de manera estable el gen LacZ que codifica la galactosidasa bacteriana. Las mediciones del knockdown del gen LacZ pueden ser utilizadas como un ensayo primario *in vitro* basado en la actividad para las formulaciones de administración del ARN de interferencia.

Para las mediciones del knockdown del gen LacZ, fueron transfectadas células 9L/LacZ con una formulación de ARNi, y se realizó un ensayo de β -galactosidasa en células cosechadas en el día 3 posterior a la transfección. Se realizó un ensayo adicional para cuantificar la concentración de proteínas.

- 35 Se colocaron células 9L/LacZ en placas a razón de 8000 células/pocillo y se incubaron en un medio durante la noche. La confluencia fue de aproximadamente 15-20% en el momento de la transfección. El complejo de transfección se preparó añadiendo un ARN de interferencia a un medio OptiMEM™ y vortizando, añadiendo por separado una formulación de administración al medio OptiMEM™ y vortizando, y finalmente mezclando el ARN de interferencia en el medio, con la formulación de administración en el medio para crear el complejo de transfección. El medio para las células incubadas se reemplazó con medio fresco sin suero (OptiMEM™ sin suero), y el complejo de transfección se añadió a cada pocillo. Las células se incubaron 5 horas, a continuación después de la adición de 100 microlitros de medio completo (DMEM más suero fetal bovino al 10%) se incubaron durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5%. Al día siguiente, 24 horas después de la transfección, el medio se cambió a medio fresco completo y las células se incubaron otras 48 horas a 37 °C y CO₂ al 5%.

- 45 Para el knockdown del gen LacZ, las células 9L/LacZ cosechadas se lavaron en PBS, se lisaron en Reactivo M-PER™ (Pierce), y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. El lisado se tomó de cada pocillo para ensayo de proteínas con un kit Micro BCA (Pierce, ThermoFisher Scientific) y un ensayo de β -gal con reactivo de ensayo de β -Galactosidasa All-in-One™ (Pierce).

Ejemplo de ensayo in vitro para Knockdown de la expresión de genes PPIB en células A549

Las mediciones del knockdown de genes de Ciclofilina B (PPIB) pueden ser utilizadas como un ensayo primario *in vitro* basado en la actividad para las formulaciones de administración de ARN de interferencia. Se midió el knockdown de la expresión de genes de ciclofilina B (PPIB) en células A549 epiteliales alveolares basales humanas. Para las mediciones del knockdown de genes PPIB, fueron transfectadas células A549 con una formulación de ARN de interferencia, el ARN total fue preparado 24 horas después de la transfección, y el ARNm de PPIB sometido a ensayo mediante RT-PCR. Se realizó QRT-PCR de la expresión de ARNm de 36B4 (fosfoproteína ribosómica ácida PO) para su normalización.

Se sembraron células A549 a razón de 7.500 células/pocillo (96-pocillos) y se incubaron durante la noche en un medio. La confluencia fue de aproximadamente el 50% en el momento de transfección. El complejo de transfección se preparó añadiendo un ARN de interferencia al medio (OptiMEM™) y vortizando, y añadiendo por separado una formulación de administración a un medio (OptiMEM™) y vortizando, y finalmente mezclando el ARN de interferencia en el medio con la formulación de administración en el medio e incubando 20 minutos a temperatura ambiente para elaborar el complejo de transfección. El medio para las células incubadas se reemplazó con OptiMEM™ fresco y el complejo de transfección se añadió a cada pocillo. Se incubaron células durante 5 horas a 37 °C y CO₂ al 5%, a continuación se añadió el medio completo (a una concentración final de suero fetal bovino del 10%) y la incubación continuó hasta 24 horas después de la transfección.

Para el knockdown de genes PPIB se lisaron las células y se preparó el ARN (kit "Invisorb RNA Cell HTS 96-Kit/C", de Invitrogen, Berlin, o kit "RNeasy 96", de Qiagen). La RT-PCR cuantitativa fue realizada utilizando el kit One-Step qRT-PCR (Invitrogen) en un termociclador "DNA Engine Opticon2" (BioRad).

Los cebadores utilizados para PPIB fueron:

(SEQ ID NO: 1)

5'-GGCTCCCAGTTCTTCATCAC-3' (directo) y

(SEQ ID NO: 2)

5'-CCTTCCGCACACCTC-3' (inverso) con

(SEQ ID NO: 3)

5'-FAM-CTAGATGGCAAGCATGTGGTGGTTGG-TAMRA-3' para la sonda.

Para 36B4, los cebadores fueron:

(SEQ ID NO: 4)

5'-TCTATCATCAACGGGTACAAACGA-3' (directo) y

(SEQ ID NO: 5)

5'-CTTTTCAGCAAGTGGGAAGGTG-3' (inverso) con

(SEQ ID NO: 6)

5'-FAM-CCTGGCCTTGTCTGTGGAGACGGATTA-TAMRA-3' para la sonda.

Ejemplo de ensayo in vivo para el knockdown de título viral de gripe en ratón

Las mediciones del knockdown de título viral de gripe en ratones pueden ser utilizadas como un calibre de eficacia *in vivo* para las formulaciones de administración de lipoaminoácidos de ARN de interferencia.

En este ensayo, habitualmente se administró 50 uL de una formulación de lipoaminoácidos de ARNbc, o PBS para un grupo de control, por vía intranasal en ratones Balb/C de 7-9 semanas de vida anestesiados con ketamina/xilazina. La dosificación diaria se realizó durante 3 días consecutivos en los días -2, -1, y 0. La infección fue inducida después de la última dosificación.

La infección de gripe fue inducida con Gripe A/Puerto Rico/8/34 (PR8, subtipo H1N1). Para la infección, se administraron 50 µl de 20 pfu de PR8 diluido en 0,3%BSA/1XPBS/PS por vía intranasal en ratones anestesiados con ketamina/xilazina. 48 horas después de la infección, los pulmones se cosecharon y homogenizaron en 600 uL 0,3%BSA/1XPBS/PS. Los homogenados se congelaron y se descongelaron dos veces para liberar el virus. Un ensayo TCID50 (Dosis infectiva de cultivo tisular 50%) se realizó para titular virus en homogenados de pulmón. En placas de fondo plano, de 96 pocillos se sembraron 2×10^4 células MDCK por pocillo, y 24 horas más tarde, el medio que contiene suero se retiró. Se añadieron 30 uL de homogenados de pulmón, diluidos o no diluidos de 10^1 a 10^7 veces (en etapas de 10 veces), en pocillos cuadruplicados. Después de la incubación durante 1 h, se añadió a cada pocillo 170 µl de medio de infección (DMEM/0,3%BSA/10 mM HEPES/PS) que contenía 4 µg/ml de tripsina. Después de la incubación durante 48 horas a 37 °C, la presencia o ausencia de virus en los sobrenadantes del cultivo se determinó mediante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. Los títulos de virus fueron calculados utilizando la fórmula Spearman y Karber.

Ejemplo de ensayo SYBR™ “Gold” para las concentraciones de ARNip

La concentración de ARNbc en una formulación puede ser determinada por el ensayo SYBR™ Gold tal como sigue a continuación: 10 ul de una formulación de ARNbc se añade a 100 ul MeOH y se incubaron durante 5 minutos a 55 °C. Se añaden 50 ul de Heparina (200 mg/ml) y la solución se incuba durante 5 minutos a 55 °C. Se añade 790 ul de PBS (solución tampón de fosfatos), y la muestra se centrifuga en microcentrifugadora para granular. Una muestra de 90 ul del granulado se incuba con 10 ul del reactivo SYBR™ Gold (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Se lee la fluorescencia en Em 535 nm con excitación a 495 nm.

Ejemplo de aislamiento de ARN y ensayo de RT-PCR cuantitativa para el knockdown del mensaje de ApoB

Para este protocolo genético doméstico, pulmonar o sistémico, en el día 1 se dosificó a ratones hembra C57/B6 o Balb/C de 8-10 semanas de vida (5 ratones por grupo) con 50 ul o 200 uL de la formulación de ARNbc por vía de administración intranasal o intravenosa, respectivamente. El anestésico era ketamina/xilazina (IP – 0,2 ml dosis/ratón). En el día 2 todo el pulmón fue aislado de los ratones bien 1 día después de la dosis o el próximo día después de 3 días consecutivos de dosificación para el modelo pulmonar o pulmón, hígado, riñón, bazo, corazón y/o sangre entera para un modelo sistémico. Los tejidos se colocaron en una placa de 24 pocillos que contenía 2 ml de reactivo de estabilización RNALATER RNA (Qiagen 76106). Las placas se colocaron en hielo seco para congelar inmediatamente, y se almacenaron a -80 °C hasta que se preparó el homogenato.

El ARN total se extrajo de muestras de tejido almacenadas en una solución RNALATER en el momento de la necropsia. El aislamiento del ARN total se realizó utilizando el kit de aislamiento de Invitrogen PURELINK 96 RNA de acuerdo con el protocolo del fabricante para el aislamiento del tejido de un mamífero. Estos aislados del ARN total se cuantificaron a continuación utilizando el espectrómetro NanoDrop, y a continuación se aseguró la calidad utilizando el sistema Agilent Bioanalyzer 2100 para determinar la integridad del ARN. Después de que la calidad y cantidad del ARN total fuera determinada, las muestras se normalizaron a concentraciones iguales y 50- 100 ng del ARN total se sintetizó en ADNc utilizando el kit Agilent Bioanalyzer 2100 de Applied Biosystems, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADNc se volvió a revisar a continuación para su concentración utilizando el Nanodrop y a continuación se diluyó 1:10 para su análisis qRT-PCR.

El análisis de la expresión de genes utilizando qRT-PCR se realizó utilizando las muestras de ADNc y la tecnología ecológica SYBR con concentraciones finales de cebadores de 200 nM. Las muestras se procesaron utilizando el Quanta PerfectCta SYBR Green FastMix, ROX usando un volumen de reacción de 10 µL. Las muestras se procesaron utilizando un formato de placa de 384 pocillos en la plataforma Applied Biosystems 7900HT, usando condiciones de ciclo rápido. Los datos se exportaron a continuación del software SDS 2.3 utilizando un valor umbral de 0,2. Estos se formatearon para su análisis utilizando un software QBASE de algoritmos introducidos por el usuario en Excel. Los genes elegidos para los controles endógenos estaban basados en análisis geNorm. Para las muestras de hígado de ratón, GAPDH y PPIA y TBP han demostrado ser normalizadores muy buenos y estables para el análisis de la expresión génica.

Ensayo de colesterol en suero

El propósito de este ensayo era determinar los niveles de colesterol en suero sanguíneo en la sangre de ratón 48 horas después de la dosificación con un ARNbc. Se utilizó el kit de Invitrogen “Amplex Red Cholesterol Assay kit” (cat# A12216). Se extrajo sangre entera de ratón y se colocó en Tubos separadores de suero (SST- BD cat #365956), y a continuación se centrifugó para separar el suero del resto de la sangre. El suero se diluyó en DI-H₂O 1:40, a continuación se diluyó adicionalmente 1:5 (total de 1:200) en el 1X tampón de reacción del kit “Amplex assay kit”. Los estándares se realizaron a partir del estándar de referencia de colesterol, suministrado con el kit, en concentraciones de 20ug/ml, 10ug/ml, 8ug/ml, 6ug/ml, 4ug/ml, 2ug/ml y 1ug/ml. Las muestras, estándares y los blancos se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano negro (Costar Catalogue #3916). La mezcla del ensayo Amplex se realizó y se añadió a los pocillos de ensayo. Después de al menos 30 minutos de incubación a 37 °C, la placa se leyó utilizando SpectraMax M5 de Molecular Devices. Se seleccionó el protocolo “End point” (punto

final), y el rango de excitación se estableció para 530-590 (preferiblemente 544nM), y la detección de emisión en ~590. Una vez la placa se leyó, los datos fueron exportados a Excel, donde se calculó el control de Porcentaje, reducción del porcentaje y el colesterol en suero sanguíneo total en ug/ml.

Ejemplo 10

5 Las estructuras de algunos ARN de doble cadena (ARNbc) de la presente revelación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: ARN de doble cadena

ARN	SECUENCIAS
DX4227 ApoB	(SEQ ID NO: 7) Sentido 5'-GGAAUC _m U _m UA _m UA _m U _m UGAUC _m CA _s A-3' (SEQ ID NO:8) Antisentido 5'- _m U _m UGGAU _m CAA _m UA _m UAAGA _m UUC _m Cs _m CsU-3'
DX3030 Gripe	(SEQ ID NO:9) Sentido 5'-GGAUCUUAUUUCUUCGGAGACAAdTdG-3' (SEQ ID NO: 10) Antisentido 5'-CAUUGUCUCCGAAGAAUAAGAUCUU-3'
DX2816 Qneg no diana	(SEQ ID NO:11) Sentido 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' (SEQ ID NO: 12) Antisentido 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'
DX2940 LacZ	(SEQ ID NO:13) Sentido 5'-CUACACAAAUCAGCGAUUUdTdT-3' (SEQ ID NO: 14) Antisentido 5'-AAAUCGCUGAUUUGUGUAGdTdC-3'
DX2742 PPIB MoCypB	(SEQ ID NO:15) Sentido 5'-GGAAAGACUGUCCAAAAAUU-3' (SEQ ID NO: 16) Antisentido 5'-UUUUUGGAACAGUCUUUCCUU-3'
DX 2744 G1498 gripe	(SEQ ID NO:17) Sentido 5'-GGAUCUUAUUUCUUCGGAGdTdT-3' (SEQ ID NO: 18) Antisentido 5'-CUCCGAAGAAAUAGAUCcdTdT-3'
DX 2918 Inm4 TNFa modificado	(SEQ ID NO: 19) Sentido 5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATTT-3' (SEQ ID NO:20) Antisentido 5'-p-AUAGCAAATCGGCTGACGGTT-3'

En la Tabla 1, "mU" representa 2'-O-metil uridina, "mC" representa 2'-O-metil citidina, y "s" representa un enlace fosforotioato.

10 **Ejemplo 11**

Las formulaciones de ARN activo de la presente revelación pueden prepararse disolviendo un ARN de interferencia en un tampón o en un medio de cultivo celular y vortizando, mezclando por separado una formulación de

administración con tampón o medio de cultivo celular y vortizando, y finalmente mezclando la mezcla de ARN de interferencia con la mezcla de formulación de administración para elaborar una formulación de transfección de ARNi activo.

5 Para preparar una formulación de administración, pueden solubilizarse lipoaminoácidos con otros lípidos y/o excipientes en CHCl₃/MeOH, secarse bajo N₂, e hidratarse en 10 nM HEPES con dextrosa al 5% a pH 7,4. La mezcla puede ser sonicada, o extruida, dializada, y/o sometida a filtración de flujo tangencial.

Diversos métodos conocidos en el arte pueden además ser utilizados para preparar las formulaciones de ARN activo de la presente revelación.

10 Un ejemplo de formulación de ARN de interferencia de la presente invención se muestra en la Tabla 2. En este ejemplo de referencia, el lipoaminoácido designado C8-Arg-C8 proporciona su propia formulación para la administración intracelular de un agente terapéutico de ARNi de interferencia. La cantidad de lipoaminoácido se proporciona como el porcentaje molar de los compuestos de administración, sin incluir el agente de ARN activo. La designación "C16-Arg-C14" hace referencia a (C15alquil)-(C=O)-Arg-NH-(C14alquilo) que es la misma que (C16acil)-Arg-NH-(C14alquilo).

15 Tabla 2: Formulación de ARNbc

Componente	Cantidad
ARNbc	50 nM
lipoaminoácido C16-Arg-C14	100% mol

20 Un ejemplo de formulación de ARN de interferencia de la presente revelación se muestra en la Tabla 3. En este ejemplo, el lipoaminoácido designado C14-norArg-C14 proporciona su propia formulación para la administración intracelular de un agente terapéutico de ARNi de interferencia. La cantidad de lipoaminoácidos se proporciona como el porcentaje molar de los componentes de administración, sin incluir el agente de ARN activo. La designación "C14-norArg-C14" hace referencia a (C13alquil)-(C=O)-norArg-NH-(C14alquilo), que es la misma que (C 14acil)-norArg-NH-(C 14alquilo).

Tabla 3: Formulación de ARNbc

Componente	Cantidad
ARNbc	50 nM
lipoaminoácido C14-norArg-C14	100% mol

25 Un ejemplo de formulación de ARN de interferencia de la presente revelación se muestra en la Tabla 4. En este ejemplo, el lipoaminoácido designado C10-norArg-C10 se combina con un lípido no catiónico en una formulación de co-administración. La designación "C10-norArg-C10" hace referencia a (C9alquil)-(C=O)-norArg-NH-(C10alquilo) que es la misma que (C10acil)-norArg-NH-(C12alquilo).

Tabla 4: Formulación de ARNbc

Componente	Cantidad
ARNbc DX3030	50 nM
lipoaminoácido C10-norArg-C10	50% mol
DOPE	50% mol

30 Un ejemplo de formulación de ARNi de la presente revelación se muestra en la Tabla 5. En este ejemplo de referencia, el lipoaminoácido designado C12-homoArg-C12 se combina con un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido pegilado en una formulación de administración multi-componente. La designación "C12-homoArg-C12" hace referencia a (C11alquil)-(C=O)-homoArg-NH-(C12alquilo) que es la misma que (C12acil)-homoArg-NH-(C12alquilo).

35

Tabla 5: Formulación de ARNbc

Componente	Cantidad
ARNbc	25 nM
C12-norArg-C12	30% mol
DSPC	20% mol
colesterol	49% mol
DSPE-PEG2000	1% mol

Un ejemplo de una composición de una emulsión de ARN de interferencia de la presente invención se muestra en la Tabla 6. En este ejemplo, el lipoaminoácido catiónico es designado C14-norArg-C14.

5

Tabla 6: Emulsión de ARNbc

Componente	Cantidad
dsRNA	25 nM, N/P 4
C14-norArg-C14	11% (peso/peso de fase oleosa);
Dio-leoil-fosfatidiletanolamina	1:1 relación molar de lípido catiónico con respecto a emulsionante
LABRAFAC PG	89% (peso/peso de fase oleosa)
agua	80%

Un ejemplo de composición de dispersión de ARN de interferencia de la presente revelación se muestra en la Tabla 7. En este ejemplo, el lipoaminoácido catiónico se designa C14-norArg-C14.

Tabla 7: Composición de dispersión de ARNbc

Componente	Cantidad
dsRNA	25 nM, N/P 4
C14-norArg-C14	12% (peso/peso de lípido/ fase dispersante)
LABRASOL	88% (peso/peso de lípido/fase dispersante)
agua	80%

10

Ejemplo 12

Ejemplo de formulaciones liposomales de composiciones de ARN de interferencia de la presente revelación se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Ejemplo de formulaciones

Composición (mol%)	
C18-norArg(NH ₃ Cl)-C18/DSPE-PEG2k/DSPC/chol.	(30;1;20;49)
C16-norArg(NH ₃ Cl)-C16/DSPE-PEG2k/DSPC/chol.	(30;1;20;49)
C14-norArg(NH ₃ Cl)-C14/DMPE-PEG2k/DSPC/chol.	(30;1;20;49)

15

Ejemplo 13

Tamaño de partícula de las composiciones de administración de ARN

Se muestran ejemplos de formulaciones de ARN de interferencia de lipoaminoácidos liposomales en la Tabla 9. Cada una de las formulaciones de la Tabla 9 tenían un N/P de 1,8 y mostraron tamaños de partícula de 106-139 nm con valores de dispersidad de aproximadamente 0,08 a 0,19.

5 Tabla 9: tamaño de partícula de composiciones de administración de ARN

Composición (mol %)	N/P	Tamaño de partícula (nm)	PDI
C12-norArg(N-H ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30;1;20;49)	1,8	139	0,19

Se muestran ejemplos de formulaciones de ARN de interferencia de lipoaminoácidos en la Tabla 10. Las formulaciones de la Tabla 10 tenían relaciones N/P de 1,5 a 1,9 y mostraron tamaños de partícula de 140-148 nm con valores de dispersidad de aproximadamente 0,18 a 0,30.

10 Tabla 10: Tamaño de partícula de composiciones de administración de ARN

Composición (mol %)	N/P	Tamaño de partícula (nm)	PDI
C12-nor-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1,51	148,3	0,18

15 Una micrografía electrónica de transmisión obtenida en un JEOL 1230 TEM de un modo de realización liposomal de la presente invención, se muestra en la Figura 2. La figura 2 muestra partículas de vesícula de doble capa lipídica esférica formada con el lipoaminoácido C12-norArg-C12. El marcador de longitud de la micrografía es de 0,5 micrómetros, y la muestra se coloreó con acetato de uranilo al 3%. La parte lipídica de la formulación liposomal fue [C12-norArg(NH₃+Cl⁻)-C12 / DSPC / colesterol / DSPE-PEG-2000] en las cantidades de [30%/20%/49%/1%] respectivamente, como un porcentaje molar del lípido total. Los liposomas contenían el ARNbc DX3030 del sustrato de Dícer activo anti-gripe.

Ejemplo 14

20 Actividad de knockdown del gen LacZ *In vitro* para composiciones binarias de ARNi de lipoaminoácidos

Los lipoaminoácidos proporcionaron una composición de administración de ARN de interferencia efectiva, tal como se muestra en la Tabla 11 mediante un ensayo *in vitro* basado en la actividad de LacZ. Los resultados en la Tabla 11 mostraron que el knockdown de genes mediante un ARN de interferencia en una composición de lipoaminoácidos puede exceder el obtenido con RNAIMAX (Invitrogen).

25 Tabla 11: Knockdown de LacZ para las formulaciones de ARN de interferencia con lipoaminoácidos

Composición	% Knockdown vs. Qneg
C8-norArg-C8:DOPE (1:1)	88
C10-norArg-C10:DOPE (1:1)	89
C12-norArg-C12:DOPE (1:1)	88
C8-norArg-C8:DPhPE (1:1)	43
C10-norArg-C10:DPhPE (1:1)	73
RNAI-MAX	92

En la Tabla 11, la concentración final de ARNbc fue de 100nM y la relación de N/P fue de 1,8 para cada composición.

Ejemplo 15

Knockdown de LacZ *In vitro* para composiciones liposomales de ARNi con lipoaminoácidos

5 Los lipoaminoácidos proporcionaron composiciones de administración de ARN de interferencia efectivas, tal como se muestra en la Tabla 12 por el ensayo *in vitro* basado en la actividad de LacZ.

Tabla 12: Knockdown del gen LacZ normalizado para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos

Composición	% Knockdown
C12-norArg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	60
RNAIMAX	82

10 Los resultados del knockdown de LacZ normalizados en la Tabla 12 mostraron que se observó al menos un 60% de Knockdown para todos las composiciones de lipoaminoácidos. Los resultados en la Tabla 12 mostraron que el knockdown de genes mediante un ARN de interferencia en una composición de lipoaminoácidos puede exceder el obtenido con RNAIMAX.

Ejemplo 16

Respuesta de la concentración del knockdown de genes *In vitro* para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos

15 La actividad de knockdown de genes para diversas composiciones de ARNi con lipoaminoácidos ternarias se determinó *in vitro*.

20 Los lipoaminoácidos proporcionaron composiciones de administración de ARN de interferencia eficaces, tal como se muestra en la Figura 3 por un ensayo *in vitro basado en la actividad* de knockdown de PPIB en células A549. Los resultados en la Figura 3 mostraron que el knockdown de genes mediante un ARN de interferencia en una composición de lipoaminoácidos, tal como queda representado por los valores de PPIB normalizados, puede exceder al obtenido con RNAIMAX.

25 En la Figura 3 se muestra la respuesta de concentración de los valores de PPIB normalizados para dos formulaciones de lipoaminoácidos, comparados con los resultados para RNAIMAX. La formulación 1 en la Figura 3 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL (50/32/18)] y la formulación 2 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE (50/32/18)].

30 Los lipoaminoácidos proporcionaron una composición de administración de ARN de interferencia eficaz, tal como se muestra en la Figura 4 por un ensayo *in vitro* basado en la actividad del knockdown de LacZ en células 9L. los resultados en la Figura 4 mostraron que el knockdown de genes mediante ARN de interferencia en una composición de lipoaminoácidos, según se ve representado por los valores de beta-galactosidasa normalizada, puede exceder al obtenido con RNAIMAX.

En la Figura 4 se muestra la respuesta de concentración de los valores de beta-galactosidasa normalizados para las dos formulaciones de lipoaminoácidos, comparada con los resultados para RNAIMAX. La formulación 1 en la FIG. 4 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL (50/32/18)] y la formulación 2 fue [C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE (50/32/18)].

35 Los datos de la actividad de knockdown de genes *in vitro* para diversas formulaciones de lipoaminoácidos que contienen tres componentes lipídicos se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Knockdown de genes para composiciones de ARNi con aminoácidos *In vitro*

Formulación	ARNbc (nM)	% Knockdown (vs. QNeg)	
		A549 PPIB	9L LacZ
C12norArgC12/CHEMS/chol. (50/32/18) (N/P = 1,8)	25	85	95
	10	74	74
	1	9	49
C12norArgC12/DOPE/chol. (50/32/18) (N/P = 5,0)	25	92	97
	10	93	91
	1	34	30
C12norArgC12/CHEMS/DLPE (50/32/18) (N/P = 1,8)	25	98	97
	10	97	94
	1	23	39
C12norArg/chol./DLPE (50/32/18) (N/P = 5,0)	25	78	83
	10	43	57
	1	2	24
RNAIMAX	25	87	89
	10	42	67
	1	7	16

5 Tal como se muestra en la Tabla 13, los resultados obtenidos a una concentración de 10 nM de ARNbc mostraron que estos ejemplos de formulaciones de lipoaminoácidos que contienen C12-norArg-C12 proporcionaron una actividad del knockdown de genes *in vitro* que excedió los resultados obtenidos con RNAIMAX.

Los datos de la actividad de knockdown de genes *in vitro* para algunas de las formulaciones de lipoaminoácidos que contienen tres componentes lipídicos obtenidos con o sin presencia de suero (suero fetal bovino), se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14: knockdown del gen PPIB para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos *in vitro* con o sin suero

Formulación	N:P	ARNbc (nM)	% Knockdown (vs. QNeg)	
			A549 PPIB	9L LacZ
C12-norArg-C12/CHEMS/chol.	4	25	94	91
	4	2,5	69	83
	4	0,25	42	23
C12-norArg-C12/CHEMS/chol.	4	25	96	95
	4	2,5	95	96
	4	0,25	65	47
RNAIMAX (cantidad fija por preparación)	---	25	98	97
	---	2,5	97	94
	---	0,25	56	48

Tal como se muestra en la Tabla 14, las formulaciones de lipoaminoácidos que contienen C12-norArg-C12 proporcionaron una elevada actividad de knockdown de genes *in vitro*, con y sin presencia de suero. Estas formulaciones de lipoaminoácidos fueron realizadas mediante diversos métodos de rehidratación y dilución.

5 Los datos de la actividad del knockdown de genes *in vitro* para algunas formulaciones de lipoaminoácidos que contienen tres y cuatro componentes lipídicos se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Knockdown (KD) del gen LacZ para las composiciones de ARNi con lipoaminoácidos *in vitro*

Composición	% (peso/peso) de lípidos	ARNbc (nM)	% KD vs Qneg 9L/LacZ
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	43
		5	56
	50/32/18	25	72
		5	73
C18:1-norArg-C12/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	92
C18:1-norArg-C8/CHEMS/chol.	50/32/18	25	92
		5	95
C18:2-norArg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	33
	50/20/30	25	92
	50/24/26	25	93
	50/28/22	25	92
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol./DSPC	40/16/34/10	25	79
	40/19/31/10	25	82
	40/22/28/10	25	82
	40/26/24/10	25	88

10 Tal como se muestra en la Tabla 15, algunas formulaciones de lipoaminoácidos que contienen tres y cuatro componentes proporcionaron una actividad de knockdown del gen 9L/LacZ elevada *in vitro*. Se observó una elevada actividad de knockdown de 9L/LacZ para formulaciones que utilizan una mezcla de lipoaminoácidos, y para formulaciones que tienen CHEMS o colesterol como lípido adicional.

Ejemplo 15

Respuesta de la concentración del knockdown del gen ApoB *In vitro* para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos

15 La actividad de knockdown del gen ApoB para diversas composiciones de ARNi con lipoaminoácidos de cuatro componentes se determinó *in vitro*.

20 En la Figura 5 se muestra un ejemplo de la actividad de knockdown del gen ApoB obtenida a partir de un ensayo *in vitro* en células HepG2. Se muestra la respuesta de concentración en 25, 2,5, y 0,25 nM de ARN de los valores de expresión de ARNm de ApoB normalizados para tres formulaciones de lipoaminoácidos de un ARN de interferencia. La formulación 1 fue [Lípido catiónico no-aminoácido/DSPC/chol./DMPE-PEG2k (40/10/48/2)]. La Formulación 2 y 3 fueron ambas [C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPEPEG2k (50/32/16/2)].

El ARNbc de ApoB fue DX4227 (ApoB-2 P2098).

Se obtuvo una respuesta de concentración para el porcentaje de knockdown de la expresión de ARNm de ApoB en células HepG2. Para el cribado/examen de células HepG2 el protocolo fue tal como sigue a continuación: En el día 1

5 las células HepG2 fueron refrescadas con medio de cultivo fresco que contenía FBS al 10%, 1x aminoácido no esencial, y 0,125 % de bicarbonato sódico en DEM. En el día 2, se añadió 25 microL del complejo a los pocillos, a continuación se añadió 75 microL de suspensión monocelular de HepG2 en OPTIMEM a los pocillos (15.000 células/pocillo). Después de 4 horas, se añadió a cada pocillo 100 ul de DEM con FBS al 20%. A las 24 horas del día 3 las células fueron lisadas, se preparó el ARN, y se realizó una qRT-PCR para el ARNm de ApoB y rGAPDH.

La actividad de knockdown del gen ApoB para diversas composiciones de ARNi con lipoaminoácidos de cuatro componentes se resume en la Tabla 16.

Tabla 16: Knockdown del gen ApoB para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos *in vitro*

Composición	N/P		% Knockdown vs UNT			
	pH 7,4	pH 5,0	100 nM	25 nM	2,5 nM	0,25 nM
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	1,8	4,9	84	93	36	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DMPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0,8	2,1	94	84	0	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DPPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0,8	2,1	96	82	19	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DPLC/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0,8	2,1	96	89	0	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DSPC/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0,8	2,1	94	89	37	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0,8	2,1	95	82	13	13
RNAIMAX	---	---		87	24	24

10 **Ejemplo 16**

Knockdown del gen ApoB *In vivo* para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos

15 La actividad de knockdown del gen ApoB para algunas composiciones de ARNi con lipoaminoácidos de tres y cuatro componentes se determinó en ratón *in vivo*. La actividad de reducción de ARNm de ApoB *in vivo* se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Knockdown del gen ApoB para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos *in vivo*

Composición	% Knockdown <i>In vivo</i>
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	88
C18:1-norArg-C16/chol./DMPE-PEG2k (50/48/2)	45
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol./DMPE-PEG2k (50/15/33/2)	46
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol./DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	88

Se obtuvo la respuesta a dosis del knockdown del gen ApoB en ratón *in vivo* para diversas composiciones de ARNi con lipoaminoácidos de cuatro componentes y se comparó con los niveles de colesterol en suero de ratón. La reducción de ARNm de ApoB y la correspondiente reducción del colesterol en suero *in vivo* se resume en la Tabla 18.

5 Tabla 18: Respuesta a dosis del knockdown (KD) del gen ApoB para composiciones de ARNi con lipoaminoácidos *in vivo*

Composición	ARNm de ApoB %KD (ApoB 9133)	ARNm de ApoB %KD (ApoB 12211)	% Cambio de colesterol en suero (+/- ganancia/pérdida)
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1,8, 2mg/kg)	72,0	72,6	-7,1
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1,8, 1mg/kg)	35,2	39,6	-4,0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1,8, 0,5mg/kg)	17,6	20,6	10,6
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 0,8, 4mg/kg)	69,9	70,6	-38,9
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 0,8, 2mg/kg)	46,3	47,8	-14,5
PBS	---	1,2	0

Ejemplo 17

Efectos antivirales para las composiciones de ARNi con lipoaminoácidos

- 10 Se muestran en la Tabla 19 ejemplos de formulaciones de ARN de interferencia con lipoaminoácidos que tienen cuatro componentes. Las formulaciones de la Tabla 19 se utilizaron para demostrar actividad anti-viral *in vivo* en un modelo de gripe en ratón.

Tabla 19: Ejemplo de formulaciones de administración de ARN y comparativas

Grupo	Composición	ARNbc	Dosis de ARNbc (cant./kg/día)		Dosis de lípido (µmol/kg/día)
			Mg	nmol	
1	C 12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
2	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1,6	120	28,8
3	C14-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36

Tabla 19 (continuación)

Grupo	Composición	ARNbc	Dosis de ARNbc (cant./kg/día)		Dosis de lípido (μ mol/kg/día)
			Mg	nmol	
4	C14-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1,6	120	28,8
5	C16-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
6	C16-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1,6	120	28,8
7	C18-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX2816	2	120	36
8	C18-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1,6	120	28,8
9	C18oleico-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE- PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
10	C18oleico-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE- PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1,6	120	28,8
11	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPEPEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	NINGUNO	---	---	36
12	PBS	---	---	---	---

Cada una de las Formulaciones de la Tabla 19 tenía un N/P de 1,8 y mostró tamaños de partícula desde 127-183 nm (excepto los grupos 7-8), con valores de dispersidad de aproximadamente 0,1 a 0,3, tal como se muestra en la Tabla 20.

5

Tabla 20: Caracterización de Formulaciones c de administración de ARN y comparativas

Grupo	Composición	N/P	Tamaño (nm)	PDI
1	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	151,1	0,315
2	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	128	0,134
3	C14-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	144,5	0,201
4	C14-norArg (N-H ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	126,6	0,114
5	C16-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	182,8	0,141

Tabla 20 (continuación)

Grupo	Composición	N/P	Tamaño (nm)	PDI
6	C16-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	174	0,157
7	C18-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	977,4	1
8	C18-norArg (NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	625	0,925
9	C18oleico-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	139,3	0,155
10	C18oleic-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1,8	130,2	0,109

Los grados de la reducción del título viral para las formulaciones de la Tabla 19 se muestran en la Tabla 21. Cada valor para la reducción del título viral refleja datos para ocho ratones.

5

Tabla 21: Reducción del título viral para las formulaciones de administración de ARNi

Grupo	ARNbc	Número de veces de reducción en el título viral en comparación con el control de PBS (medias)	Número de veces de reducción en el título viral en comparación con el control de PBS (medianas)	Valor p
1	DX3030	165,0	1698,0	0,0002
2	Qneg DX2816	2,1	2,3	0,034
3	DX3030	25,3	100,0	0,002
4	Qneg DX2816	3,8	5,6	0,008
5	DX3030	13,8	17,8	0,0003
6	Qneg DX2816	6,3	6,7	0,002
7	DX3030	26,7	31,6	0,001
8	Qneg DX2816	2,6	5,6	0,037
9	DX3030	25,7	22,8	0,0002
10	Qneg DX2816	20,0	17,8	0,0003

En general, los resultados en la Tabla 21 mostraron que las formulaciones de lipoaminoácidos de ARN de interferencia administraron el ARN de interferencia a las células *in vivo*, por lo que se redujo el título viral de gripe en hasta aproximadamente 1600 veces o más, en relación al PBS como control. Los grupos de control fueron #2, 4, 6, 8, y 10, los cuales se dosificaron con Qneg.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NASTECH PHARMACEUTICAL CO.

<120> LIPOAMINOÁCIDOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 07-10PCT

5 <140>

<141>

<150> 61/022,571

<151> 2008-01-22

<150> 60/972,590

10 <151> 2007-09-14

<150> 60/972,653

<151> 2007-09-14

<150> 60/953,667

<151> 2007-08-02

15 <150> 60/947,282

<151> 2007-06-29

<150> 60/916,131

<151> 2007-05-04

<160> 20

20 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 1

ggctcccagt tctcatcac 20

<210> 2

30 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 2

5 ccttccgcac cacctc 16

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Sonda sintética

<400> 3

ctagatggca agcatgtggt gtttgg 26

<210> 4

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 4

tctatcatca acgggtacaa acga 24

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5

ctttcagca agtggaagg tg 22

30 <210> 6

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Sonda sintética

5 <400> 6

cctggccttg tctgtggaga cggatta 27

<210> 7

<211> 21

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

15 <222> (7).. (8)

<223> 2'-O-metil uridina

<220>

<221> base_modificada

<222> (10)

20 <223> 2'-O-metil uridina

<220>

<221> base_modificada

<222> (12).. (14)

<223> 2'-O-metil uridina

25 <220>

<221> base_modificada

<222> (19)

<223> 2'-O-metil citidina

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> enlace fosforotioato

<400> 7

ggaaucuuau auuugaucca a 21

<210> 8

5 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador sintético

10 <400> 5

ctttcagca agtggaagg tg 22

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Sonda sintética

<400> 6

cctggccttg tctgtggaga cggatta 27

20 <210> 7

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

<222> (7).. (8)

<223> 2'-O-metil uridina

30 <220>

<221> base_modificada

- <222> (10)
 <223> 2'-O-metil uridina
 <220>
 <221> base_modificada
- 5 <222> (12).. (14)
 <223> 2'-O-metil uridina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)
- 10 <223> 2'-O-metil citidina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> enlace fosforotioato
- 15 <400> 7
 ggaaucuuau auuugaucca a 21
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 9
 ggauuuuuu ucuucggaga caatg 25
- 25 <210> 10
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 30 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 10

cauugucucc gaagaaauaa gauccuu 27

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 11

uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 12

acgugacacg uucggagaat t 21

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 13

cuacacaaau cagcgauuut t 21

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 14

10 aaaucgcuga uuuguguagt c 21

<210> 15

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 15

ggaaagacug uuccaaaau u 21

<210> 16

20 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 16

uuuuuggaac agucuuuccu u 21

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 17

5 ggauuuuuu ucuucggagt t 21

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

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

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 18

15 cuccgaagaa auaagacct t 21

<210> 19

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 19

ccgtcagccg atttgctatt t 21

<210> 20

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 531 520 T3

<400> 20

auagcaaadc ggctgacggt t 21

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende la estructura mostrada en la Fórmula I para su uso en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad mediante la administración *in vivo* a una célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos, o un agente biológicamente activo,

5 $R^3-(C=O)-Xaa-Z-R^4$ Fórmula I

en donde

Xaa es norarginina o una versión N-metilada de la misma;

R^3 es independientemente un alquilo C(6-22) o alqueno C(6-22) sustituido o no sustituido;

R^4 es independientemente un alquilo C(6-22) o alqueno C(6-22) sustituido o no sustituido; y Z es NH

10 y sales de los mismos.

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde R^3 y R^4 son alquilo C(6-22) y son iguales o diferentes, o en donde R^3 y R^4 son alqueno C(6-22) y son iguales o diferentes.

3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde R^3 es alquilo C(6-22) y R^4 es alqueno C(6-22), o en donde R^4 es alquilo C(6-22) y R^3 es alqueno C(6-22).

15 4. Compuesto para su uso en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad mediante la administración *in vivo* a una célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos, o un agente biológicamente activo, cuyo compuesto es:

20 un multímero del compuesto de la reivindicación 1, en donde dos o más compuestos según la reivindicación 1 están entrecruzados; o un compuesto que comprende un conjugado del compuesto de la reivindicación 1, en donde un péptido está conjugado a la cadena lateral del residuo de aminoácido; o

un compuesto que comprende el compuesto de la reivindicación 1 enlazado a una estructura oligomérica o polimérica; o

un compuesto que comprende el compuesto de la reivindicación 1 enlazado a un compuesto de un compuesto farmacéutico.

25 5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, seleccionado de (aciloC10)-norArg-NH-(alquiloC10), (aciloC14)-norArg-NH-(alquiloC14), (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC16), (aciloC18)-norArg-NH-(alquiloC18), (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC12), (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC12), (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC18), N-(4-guanidino-1-oxo-1-(dodecilamino)butan-2-il)dodecanamida que es C12-norArg-C12, o N-(4-guanidino-1-oxo-1-(hexadecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida que es (oleico)C18-norArg-C16.

30 6. Composición para su uso en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad mediante la administración *in vivo* a una célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos, o un agente biológicamente activo,

cuya composición comprende uno o más compuestos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y uno o más ácidos nucleicos terapéuticos, preferiblemente:

en donde el ácido nucleico terapéutico es un agente de silenciamiento génico; o

35 en donde el ácido nucleico terapéutico es un agente inductor de ARNi; o

en donde el ácido nucleico terapéutico es un ARN de doble cadena; o

en donde el ácido nucleico terapéutico es un ARNm.

7. Composición para su uso según la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico terapéutico contiene un nucleósido modificado.

40 8. Composición para su uso según la reivindicación 6, que además comprende:

(i) uno o más lípidos o esteroides no catiónicos no aminoácidos; o

(ii) hemisuccinato de colesteroil; o

(iii) uno o más lípidos catiónicos no aminoácidos; o

(iv) uno o más lípidos pegilados o esteroides pegilados.

5 9. Composición para su uso según la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico forma un complejo con uno o más lipoaminoácidos.

10. Composición para su uso según la reivindicación 6, en donde la composición contiene liposomas, o en donde la composición es una emulsión, o en donde la composición es una dispersión micelar.

10 11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el compuesto o composición es para su uso en la inhibición de la expresión de genes en una célula, preferiblemente para inhibir la expresión de genes en una célula de un mamífero, mediante la administración *in vivo* a la célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos o un agente biológicamente activo.

15 12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un humano, donde la enfermedad se selecciona de artritis reumatoide, enfermedad hepática, encefalitis, fractura ósea, enfermedad cardíaca, enfermedad viral incluyendo hepatitis y gripe, sepsis, y cáncer.

20 13. Uso de un compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para la administración *ex vivo* a una célula de un ácido nucleico terapéutico, uno o más agentes farmacológicos, o un agente biológicamente activo.

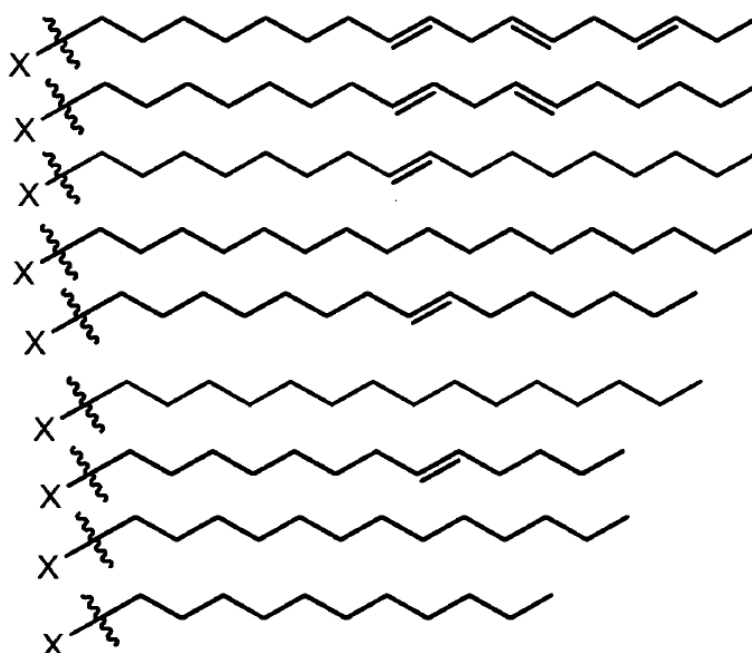
14. Compuesto que comprende la estructura que se muestra en la Fórmula I



en donde

Xaa es norarginina o una versión N-metilada de la misma;

25 R^3 y R^4 son independientemente colas lipofílicas que tienen una de las siguientes estructuras



o una cola derivada del ácido araquidónico o del ácido eicosapentaenoico; y

Z es NH,

y sales de los mismos.

15. Compuesto según la reivindicación 14, seleccionado de

- 5 (aciloC14)-norArg-NH-(alquiloC14), (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC16),
 (aciloC18)-norArg-NH-(alquiloC18), (aciloC16)-norArg-NH-(alquiloC12),
 (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC12), (oleicoC18)-norArg-NH-(alquiloC18), N-(4-guanidino-1-oxo-1-(dodecilamino)butan-2-il)dodecanamida que es C12-norArg-C12, o N-(4-guanidino-1-oxo-1-(hexadecilamino)butan-2-il)octadec-9-enamida que es
- 10 (oleico)C18-norArg-C16.

16. Compuesto que es un multímero del compuesto de la reivindicación 14, en donde dos o más compuestos según la reivindicación 14 están entrecruzados; o

compuesto que comprende un conjugado del compuesto de la reivindicación 14, en donde un péptido se conjuga a la cadena lateral del residuo de aminoácido; o

- 15 un compuesto que comprende el compuesto de la reivindicación 14 enlazado a una estructura oligomérica o polimérica; o

un compuesto que comprende el compuesto de la reivindicación 14 enlazado a un compuesto farmacéutico.

17. Composición que comprende uno o más compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15 y uno o más ácidos nucleicos terapéuticos según se define en la reivindicación 6, 7 o 9.

- 20 18. Composición según la reivindicación 17, en donde la composición contiene liposomas, o en donde la composición es una emulsión, o en donde la composición es una dispersión micelar.

19. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18 y uno o más agentes farmacológicos o agentes biológicamente activos.

FIG. 1

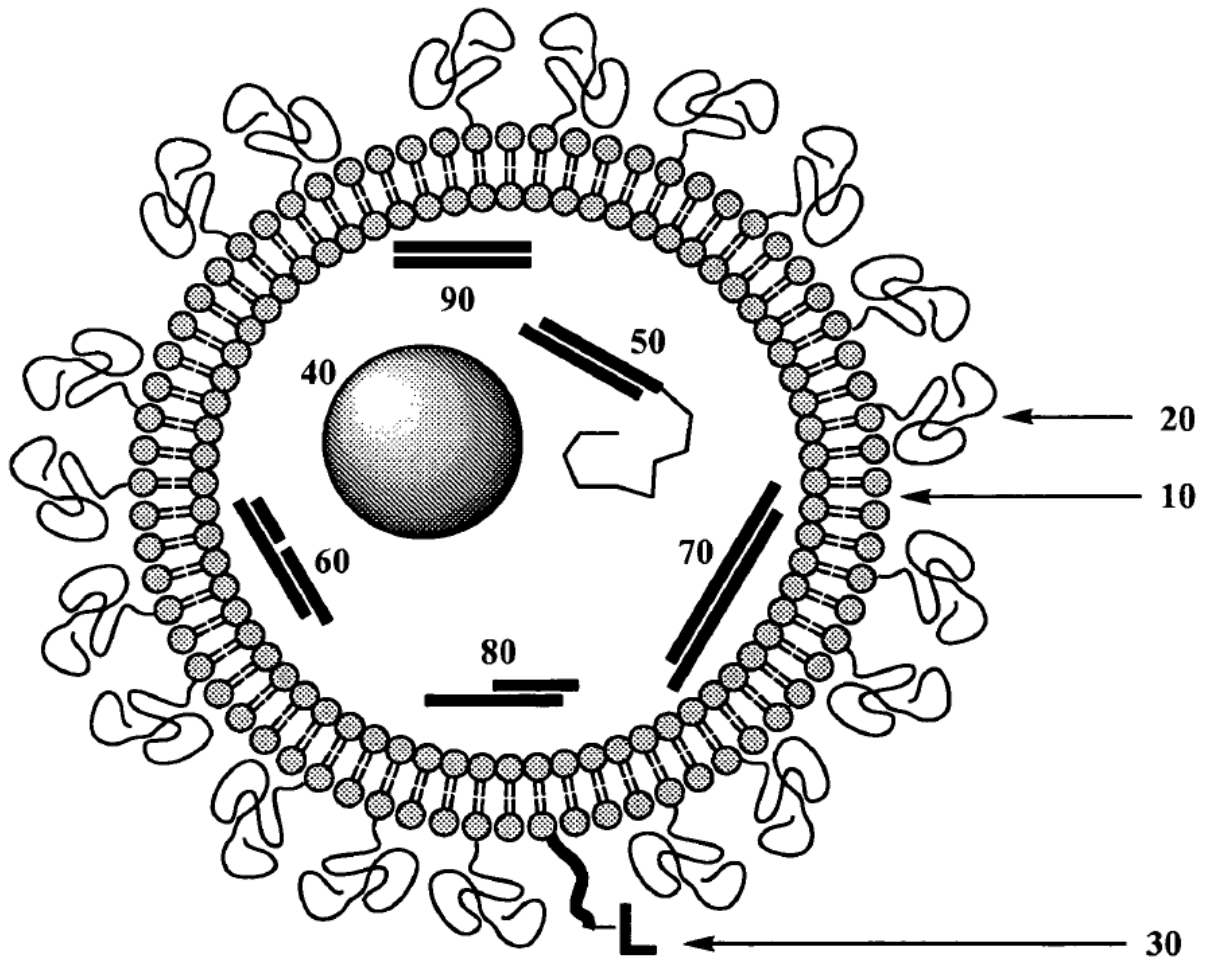


FIG. 2

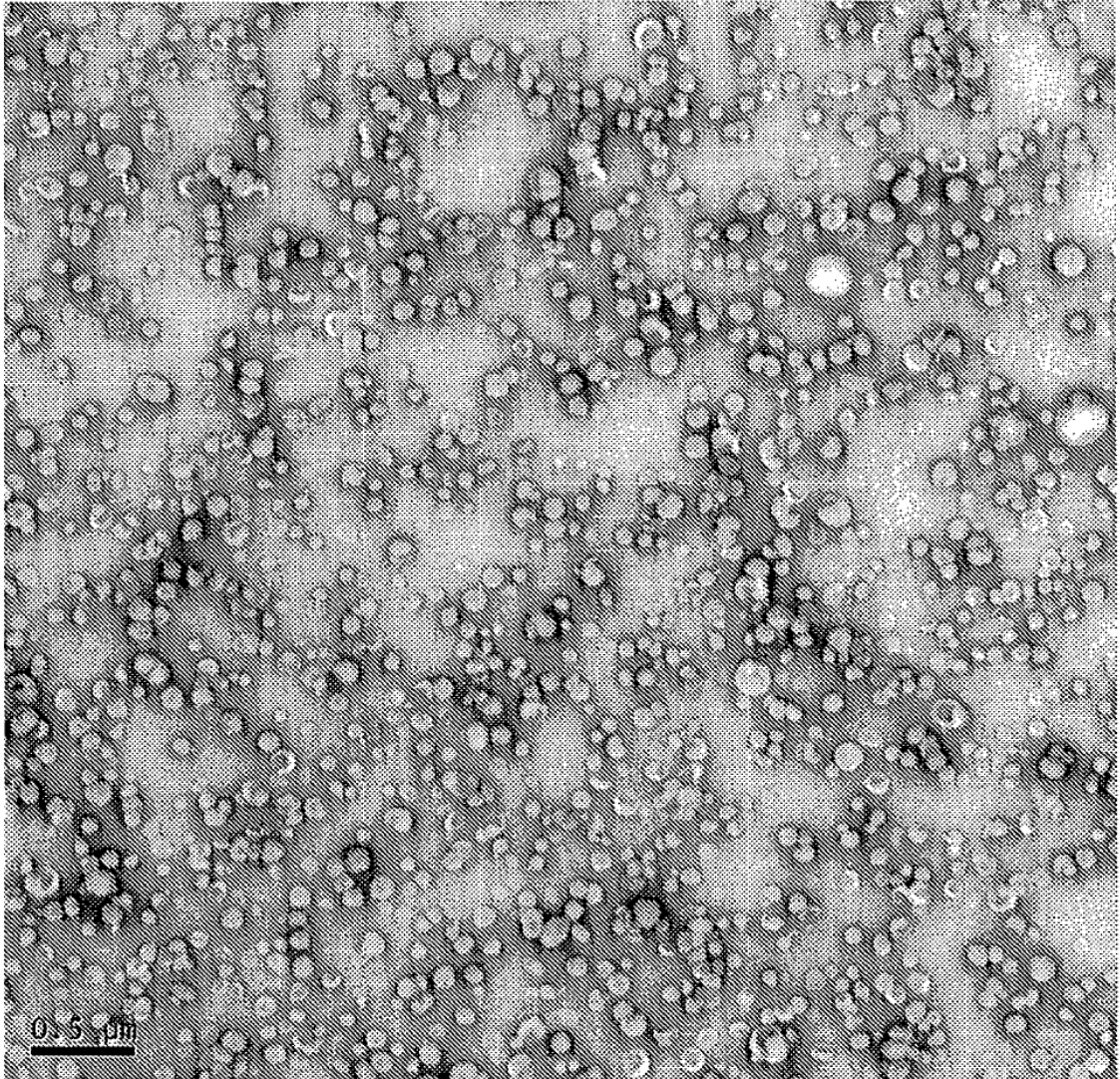


FIG. 3

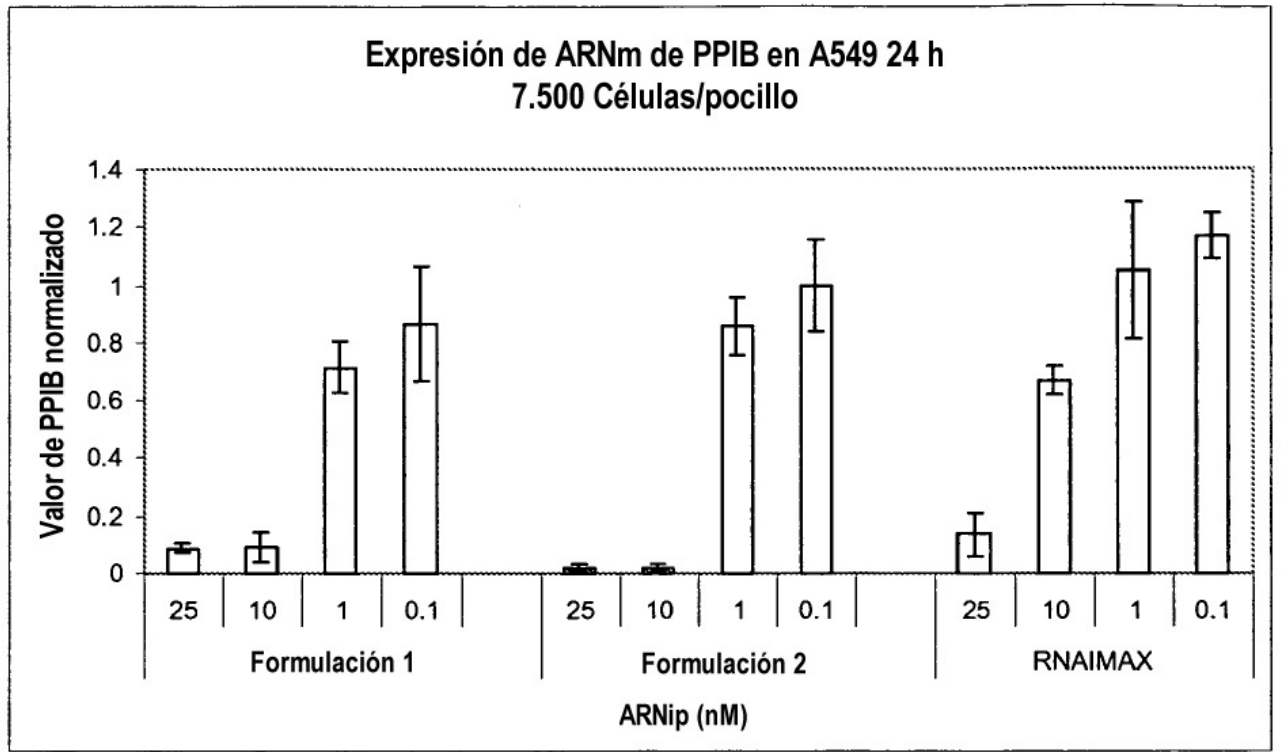


FIG. 4

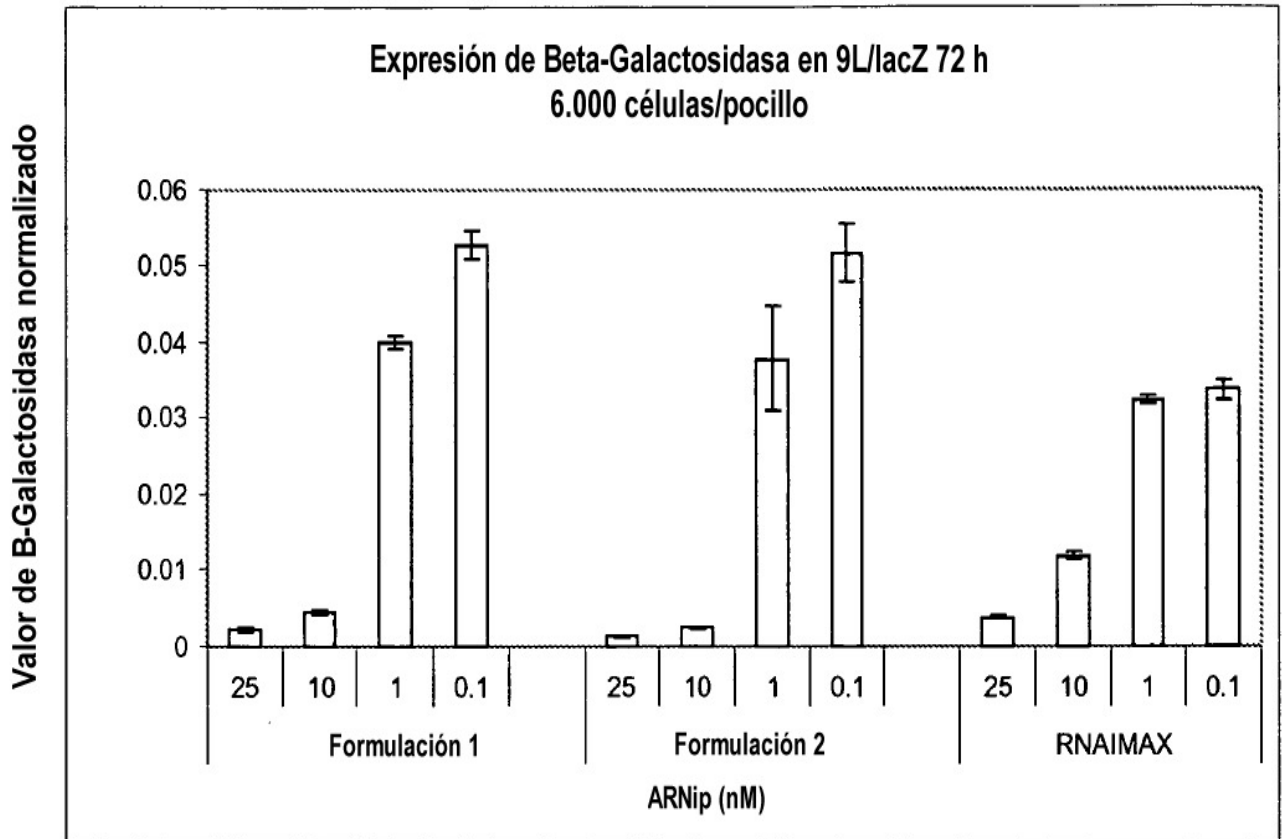


FIG. 5

Expresión de ARNm de ApoB en HepG2 24h
15.000 células/pocillo

