

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud U.S. serie No. 62/059.056, presentada el 2 de octubre de 2014, y de la solicitud U.S. serie No. 62/120.149, presentada el 24 de febrero de 2015, solicitudes que se incorporan a la presente por referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El virus de la hepatitis B (abreviado "HBV", por sus siglas en inglés) es un miembro de la familia de los Hepadnavirus. La partícula del virus (algunas veces denominada virión) incluye una envuelta lipídica externa y un núcleo, la nucleocápside icosaédrica compuesto por proteína. La nucleocápside encierra al ADN viral y a la ADN polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa. La envuelta externa contiene proteínas incorporadas que están involucradas en la unión viral de, y la entrada en, células susceptibles, típicamente hepatocitos del hígado. Además de las partículas virales infecciosas, se pueden hallar cuerpos filamentosos y esféricos que no tienen un núcleo en el suero de individuos infectados. Estas partículas no son infecciosas y están compuestas por el lípido y la proteína que forma parte de la superficie del virión, que es denominado el antígeno de superficie (HBsAg), y es producido en exceso durante el ciclo vital del virus.

[0003] El genoma de HBV está hecho de ADN circular, Pero es inusual debido a que el ADN no es completamente de doble hebra. Un extremo de la hebra de longitud completa está unido a la ADN polimerasa viral. El genoma tiene 3020-3320 nucleótidos de largo (para la hebra de longitud completa) y 1700-2800 nucleótidos de largo (para la hebra más corta). El sentido negativo (no codificador) es complementario al mRNA viral. El ADN viral se encuentra en el núcleo rápidamente después de la infección de la célula. Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma, denominados C, X, P y S. La proteína del núcleo es codificada por el gen C (HBcAg), y su codón de inicio es precedido por un codón de inicio en marco, corriente arriba, a partir del cual se produce la proteína pre-núcleo. El HBeAg es producido por el procesamiento proteolítico de la proteína pre-núcleo. La ADN

polimerasa es codificada por el gen P. El gen S es el gen que codifica para el antígeno de superficie (HBsAg). El gen HBsAg es un marco de lectura abierto largo pero contiene tres codones (ATG) de "inicio" en marco que dividen el gen en tres secciones, pre-S1, pre-S2 y S. Debido a los múltiples codones de inicio, se producen polipéptidos de tres tamaños diferentes denominados largo, mediano y pequeño. La función de la proteína codificada por el gen X no se comprende aún completamente pero está asociada con el desarrollo de cáncer hepático. La replicación de HBV es un proceso complejo. Aunque la replicación se produce en el hígado, el virus se disemina a la sangre en donde se encuentran proteínas virales y anticuerpos contra estos en las personas infectadas. La estructura, replicación y biología de HBV es revisada en D. Glebe y C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, Vol. 33, No. 2, páginas 103-112 (2013).

[0004] La infección de humanos con HBV puede causar una enfermedad inflamatoria infecciosa del hígado. Los individuos infectados pueden no exhibir síntomas durante muchos años. Se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial ha sido infectada en algún momento en su vida, incluyendo 350 millones que son portadores crónicos.

[0005] El virus es transmitido por exposición a sangre o a fluidos corporales infecciosos. La infección perinatal también puede ser una vía de infección importante. La enfermedad aguda causa inflamación del hígado, vómitos, ictericia, y posiblemente muerte. La hepatitis crónica B puede causar eventualmente cirrosis y cáncer hepático.

[0006] Aunque la mayoría de las personas que están infectados con HBV eliminan la infección a través de la acción de su sistema inmunitario, algunas personas infectadas padecen un curso de infección agresivo (hepatitis fulminante); mientras que otras están infectadas crónicamente, aumentando de este modo su posibilidad de enfermedad hepática. Varias medicaciones han sido aprobadas actualmente para el tratamiento de la infección por HBV, pero los individuos infectados responden con varios grados de éxito a estas medicaciones, y ninguna de estas medicaciones elimina el virus de la persona infectada.

[0007] El virus de la hepatitis D (HDV) es un virus de ARN envuelto circular pequeño que puede propagarse sólo en presencia del virus de la hepatitis B (HBV). En particular, el HDV requiere la proteína del antígeno de superficie del HBV para propagarse. La

infección con ambos, HBV y HDV, da por resultado complicaciones más severas en comparación con la infección con HBV sólo. Estas complicaciones incluyen una mayor probabilidad de experimentar insuficiencia hepática en infecciones agudas y una rápida progresión a la cirrosis hepática, con una mayor posibilidad de desarrollar cáncer hepático en las infecciones crónicas. En combinación con el virus de la hepatitis B, la hepatitis D tiene la mayor tasa de mortalidad de todas las infecciones por hepatitis. Las vías de transmisión de HDV son similares a aquellas para la HBV. La infección está restringida en gran parte a personas con alto riesgo de padecer una infección por HBV, particularmente usuarios de fármacos que se inyectan y personas que reciben concentrados de factor de coagulación.

[0008] Por lo tanto, existe una necesidad continua de contar con composiciones y métodos para el tratamiento de la infección por HBV en humanos, así como también para el tratamiento de la infección por HBV/HDV en humanos.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0009] Como se describe con mayor detalle en la presente, en un aspecto la presente invención proporciona moléculas de siARN, de doble hebra, aisladas, que incluyen cada una, una hebra sentido y una hebra antisentido que es hibridada a la hebra sentido. El siARN de este aspecto de la invención tiene como objetivo uno o más genes y/o transcriptos del genoma del HBV. Ejemplos de moléculas de siARN de este aspecto de la invención son las moléculas de siARN presentadas en la Tabla A en la presente. Las moléculas de siARN de la invención son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de la infección por HBV y/o la infección por HDV cuando se administra en una cantidad terapéutica a un sujeto humano infectado con HBV o HBV/HDV. Más generalmente la invención proporciona moléculas de siARN que son capaces de inhibir o silenciar la expresión del gen de HBV *in vitro* e *in vivo*.

[0010] En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico, de hebra simple, aisladas, tales como las hebras sentido y antisentido aisladas de las moléculas de siARN presentadas en la Tabla A. Las hebras sentido y antisentido aisladas antes mencionadas se presentan en la Tabla B en la presente. Como se describe con mayor detalle en la presente, las moléculas de siARN y de ácido nucleico de hebra simple de la invención son modificadas e incluyen una o más partes de UNA y/o

una o más modificaciones 2'O-metilo (ver, por ejemplo, Tablas A y B).

[0011] La presente invención también proporciona composiciones, tales como composiciones farmacéutica, que incluyen una o más moléculas de siARN de la invención (ver, por ejemplo, las moléculas de siARN descritas en la Tabla A). En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones que incluyen dos diferentes moléculas de siARN de la invención (por ejemplo, dos moléculas de siARN diferentes seleccionadas de las moléculas de siARN divulgadas en la Tabla A en la presente). En otra forma de realización, la presente invención proporciona composiciones que incluyen tres moléculas de siARN diferentes de la invención (por ejemplo, tres moléculas de siARN diferentes seleccionadas de las moléculas de siARN divulgadas en la Tabla A en la presente). Todas las combinaciones posibles de dos siARNs diferentes ("combinaciones de dos vías") seleccionadas de las moléculas de siARN divulgadas en la Tabla A en la presente se presentan en el Ejemplo 2 en la presente. Todas las combinaciones posibles de tres siARNs diferentes ("combinaciones de tres vías") seleccionadas de las moléculas de siARN divulgadas en la Tabla A en la presente se presentan en el Ejemplo 3 en la presente. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que incluyen una de las combinaciones de dos vías o de tres vías antes mencionadas de las siARNs presentadas en la Tabla A.

[0012] La presente invención también proporciona partículas de ácido nucleico-lípidos, y formulaciones de éstas, en donde las partículas de lípidos incluyen cada una, uno o más (por ejemplo, un cóctel) del siARN descrito en la presente, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas. Ejemplos de moléculas de siARN que pueden ser incluidas en las partículas de lípidos de la invención son las moléculas de siARN presentadas en la Tabla A, y combinaciones del siARN precedente (por ejemplo, las combinaciones de dos vías y de tres vías descritas en la presente). Típicamente, el siARN está completamente encapsulado dentro de la partícula del lípido. Las partículas de lípidos de la invención son útiles, por ejemplo, para suministrar una cantidad terapéuticamente efectiva de siARN en las células (por ejemplo, células hepáticas) de un cuerpo humano infectado con HBV o HBV/HDV, tratando de este modo a la infección por HBV y/o la

infección por HDV y/o mejorando uno o más síntomas de la infección por HBV y/o la infección por HDV.

[0013] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una o un cóctel de moléculas de siARN que tienen como objetivo la expresión génica de HBV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen cada una, uno, dos o tres de las moléculas de siARN presentadas en la Tabla A que tienen como objetivo la expresión génica de HBV. Con respecto a las formulaciones que incluyen un cóctel de siARNs encapsulados dentro de partículas de lípidos, las diferentes moléculas de siARN pueden estar co-encapsuladas en la misma partícula de lípido o cada tipo de especie de siARN presente en el cóctel puede ser encapsulada en su propia partícula, o alguna especie de siARN puede ser co-encapsulada en la misma partícula mientras que otras especies de siARN están encapsuladas en diferentes partículas dentro de la formulación. Típicamente, las moléculas de siARN de la invención están completamente encapsuladas en la partícula de lípido.

[0014] Las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención son útiles para el suministro profiláctico o terapéutico, a un humano infectado con HBV o HBV/HDV, de moléculas de siARN que silencian la expresión de uno o más genes de HBV, mejorando de este modo al menos un síntoma de la infección por HBV y/o de infección por HDV en el humano. En algunas formas de realización, una o más de las moléculas de siARN descritas en la presente son formuladas en partículas de ácido nucleico-lípido, y las partículas son administradas a un mamífero (por ejemplo, un humano) que requiere tal tratamiento. En algunos casos, una cantidad terapéuticamente efectiva de la partícula de ácido nucleico-lípido puede ser administrada al mamífero, (por ejemplo, para tratar una infección por HBV y/o HDV en un ser humano). Las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención son particularmente útiles para ser direccionadas a células hepáticas en humanos que es el sitio de mayor expresión génica de HBV. La administración de la partícula ácido nucleico-lípido puede ser por cualquier vía conocida en el arte, tal como, por ejemplo, oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea o intradérmica. En formas de realización particulares, la partícula de ácido nucleico-lípido es administrada sistémicamente, por ejemplo, por

vía de administración enteral o parenteral.

[0015] En algunas formas de realización, la regulación hacia abajo de la expresión génica de HBV es determinada detectando ARN de HBV o niveles de proteína en una muestra biológica de un mamífero después de la administración de la partícula de ácido nucleico-lípido. En otras formas de realización, la regulación hacia abajo de la Expresión génica de HBV es determinada detectando el mRNA de HBV o niveles de proteína en una muestra biológica de un mamífero después de la administración de una partícula de ácido nucleico-lípido. En algunas formas de realización, la regulación hacia abajo de la expresión génica de HBV es detectada monitoreando síntomas asociados con la infección por HBV en un mamífero después de la administración de la partícula.

[0016] En otra forma de realización, la presente invención proporciona métodos para introducir un siARN que silencia la expresión génica de HBV en una célula viva, el método comprende la etapa de poner en contacto la célula con una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención, en donde la partícula de ácido nucleico-lípido incluye un siARN que tiene como objetivo HBV, bajo condiciones por las que el siARN entra en la célula y silencia la expresión de un gen del virus de la hepatitis B dentro de la célula.

[0017] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar uno o más síntomas asociados con la infección por el virus de la hepatitis B y/o el virus de la hepatitis D en un humano, el método incluye la etapa de administrar al humano una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención. En algunas formas de realización, las partículas de ácido nucleico-lípidos usadas en los métodos de este aspecto de la invención incluyen uno, dos o tres o más diferentes siARN seleccionados independientemente de los siARNs presentados en la Tabla A.

[0018] En otra forma de realización, la presente invención proporciona métodos para silenciar la expresión génica de HBV en un mamífero (por ejemplo, un humano) que lo necesita, en donde los métodos incluyen cada uno la etapa de administrar al mamífero una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención.

[0019] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar y/o mejorar uno o más síntomas asociados con una infección por HBV y/o HDV en un humano, en donde los métodos

incluyen cada uno la etapa de administrar al humano una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención.

[0020] Algunas formas de realización de la presente invención proporcionan composiciones y métodos para inhibir la replicación de HDV, y/o mejorar uno o más síntomas de una infección por HDV, administrando a un individuo infectado con HDV una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más composiciones o partículas de ácido nucleico de la presente invención que inhiben la síntesis del antígeno de superficie de HBV.

[0021] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para inhibir la expresión de HBV en un mamífero que lo necesita (por ejemplo, un humano infectado con HBV o HBV/HDV), en donde los métodos incluyen cada uno la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención.

[0022] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de una infección por HBV y/o HDV en un humano, en donde los métodos incluyen cada uno la etapa de administrar al humano una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención.

[0023] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una molécula de siARN de la presente invención para inhibir la expresión génica del virus de la hepatitis B en una célula viva.

[0024] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición farmacéutica de la presente invención para inhibir la expresión génica del virus de la hepatitis B en una célula viva.

[0025] Las composiciones de la invención (por ejemplo, moléculas de siARN y hebras sentido y antisentido aisladas de éstas, y partículas de ácido nucleico-lípido) son útiles también, por ejemplo, en ensayos biológicos (por ejemplo, ensayos *in vivo* o *in vitro*) para inhibir la expresión de uno o más genes de HBV y/o transcriptos para investigar la replicación y la biología de HBV y/o HDV, y/o para investigar o modular la función de uno o más genes o transcriptos de HBV. Por ejemplo, las moléculas de siARN de la invención pueden ser rastreadas usando un ensayo biológico para identificar a las moléculas de siARN que inhiben la replicación de HBV y/o HDV y que son agentes terapéuticos candidatos para el tratamiento de la infección por HBV y/o HDV en

humanos, y/o la mejora de al menos un síntoma asociado con la infección por HBV y/o HDV en un humano.

[0026] Otros objetos, características, y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para el experto en el arte a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Introducción

[0027] La terapia con el fármaco de siARN descrita en la presente proporciona ventajosamente nuevas composiciones y métodos significativos para el tratamiento de la infección por HBV y/o HDV en seres humanos y los síntomas asociados con ésta. Formas de realización de la presente invención pueden ser administradas, por ejemplo, una vez por día, una vez por semana, o una vez cada varias semanas (por ejemplo, una vez cada dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas).

[0028] Además, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente permiten el suministro efectivo de un fármaco de ácido nucleico tal como un siARN en tejidos y células objetivo dentro del cuerpo. La presencia de la partícula de lípido confiere protección de la degradación por la nucleasa en la corriente sanguínea, permite una acumulación preferencial en el tejido objetivo y proporciona un medio de entrada del fármaco en el citoplasma celular en donde el siARNs puede realizar su función prevista de interferencia del ARN.

Definiciones

[0029] Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos a menos que se especifique de otro modo.

[0030] El término "virus de la hepatitis B" (abreviado como HBV) se refiere a una especie de virus del género orthohepadnavirus, que es una parte de la familia de virus hepadnaviridae, y que es capaz de causar inflamación hepática en humanos.

[0031] El término "virus de la hepatitis D" (abreviado como HDV) se refiere a una especie de virus del género Deltaviridae, que es capaz de causar inflamación hepática en humanos.

[0032] El término "ARN interferente pequeño" o "siARN" como se usa en la presente, se refiere a un ARN de doble hebra (es decir, ARN dúplex) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen o secuencia objetivo (por ejemplo, mediando en la degradación o

inhibiendo la traducción de mARNs que son complementarios a la secuencia de siARN) cuando el siARN se encuentra en la misma célula que el gen o secuencia objetivo. El siARN puede tener una identidad substancial o completa con el gen o secuencia objetivo, o puede comprender una región de mal apareamiento (es decir, motivo de mal apareamiento). En algunas formas de realización, el siARNs puede tener aproximadamente 19-25 nucleótidos (dúplex) de longitud, y tiene preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos (dúplex) de longitud. Los siARN dobles pueden comprender salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos fosfato 5'. Ejemplos de siARN incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótido de doble hebra formada por dos moléculas de hebras separadas, en donde una hebra es la hebra sentido y la otra es la hebra antisentido complementaria.

[0033] Preferentemente, el siARN es sintetizado químicamente. El siARN también puede ser generado por escisión de dsARN más largos (por ejemplo, dsARN mayor de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con la *E. coli* ARNasa III o Dicer. Estas enzimas procesan el dsARN en siARN biológicamente activo (ver, por ejemplo, Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom *et al.*, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight *et al.*, *Science*, 293:2269-2271 (2001); y Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)). Preferentemente, el dsARN tiene al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. Un dsARN puede tener tanto como 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos de longitud, o puede ser largo. El dsARN puede codificar un transcripto de gen entero o un transcripto de gen parcial. En algunos casos, el siARN puede ser codificado por un plásmido (por ejemplo, transcripto como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles de horquilla).

[0034] La frase "inhibe la expresión de un gen objetivo" se refiere a la capacidad de un siARN de la invención para silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen objetivo (por ejemplo, un gen dentro del genoma de HBV). Para examina la extensión del silenciamiento génico, se pone en contacto una muestra de prueba (por ejemplo, una muestra biológica de un organismo de interés que expresa el gen objetivo o una muestra de

células en cultivo que expresan el gen objetivo) con un siARN que silencia, reduce o inhibe la expresión del gen objetivo. La expresión del gen objetivo en la muestra de prueba se compara con la expresión del gen objetivo en una muestra control (por ejemplo, una muestra biológica de un organismo de interés que expresa el gen objetivo o una muestra de células en cultivo que expresan el gen objetivo) que no se pone en contacto con el siARN. A las muestras control (por ejemplo, muestras que expresan el gen objetivo) se les puede asignar un valor de 100%. En formas de realización particulares, el silenciamiento, la inhibición o la reducción de la expresión de un gen objetivo se logra cuando el valor de la muestra de prueba con relación a la muestra control (por ejemplo, buffer solamente, una secuencia de siARN que está direccionada a un gen diferente, una secuencia de siARN *scrambled*, etc.) es de aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 0%. Los ensayos adecuados incluyen, sin limitación, el examen de los niveles de proteína o mRNA usando técnicas conocidas por los expertos en el arte, tales como, por ejemplo, transferencias en manchas, transferencias northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como también ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en el arte. Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" de un ácido nucleico terapéutico, tal como un siARN, es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, una inhibición de la expresión de una secuencia objetivo en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de un siARN. En formas de realización particulares, la inhibición de la expresión de un gen objetivo o secuencia objetivo se logra cuando el valor obtenido con un siARN con relación al control (por ejemplo, buffer solamente, una secuencia de siARN que tiene como objetivo un gen diferente, una secuencia de siARN *scrambled*, etc.) es de aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 0%. Ensayos adecuados para medir la expresión de un gen objetivo o secuencia objetivo incluyen, pero no están limitados a, el examen de los niveles de proteína o mRNA usando técnicas conocidas por

los expertos en el arte, tales como, por ejemplo, transferencias en manchas, transferencias northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como también ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en el arte.

[0035] El término "ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos (es decir, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) ya sea en forma de hebra simple o doble e incluye ADN y ARN. Los "nucleótidos" contienen un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base y un grupo fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen además compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero no están limitados a, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero no limitados a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos, y alquilhaluros. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de esqueletos modificados o uniones, que son sintéticos, que existen naturalmente, y que existen no naturalmente, y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Ejemplos de tales análogos y/o residuos modificados incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, quiral-metil fosfonatos, 2'-O-metilribonucleótidos y ácidos péptidonucleicos (PNAs). Adicionalmente, los ácidos nucleicos pueden incluir una o más partes de UNA.

[0036] El término "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, con fragmentos que contienen hasta 60 nucleótidos denominados generalmente oligonucleótidos, y fragmentos más largos denominados polinucleótidos. Un desoxirribooligonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos denominado desoxirribosa unida en forma covalente con el fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero no ramificado alternante. El ADN puede estar en forma de, por ejemplo, moléculas antisentido, AND plásmido, AND precondensado, un producto de PCR, vectores, cassettes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados y combinaciones de estos grupos. Un ribooligonucleótido consiste en una estructura de repetición similar en donde el azúcar de 5 carbonos es ribosa. El ARN puede estar en la forma de, por ejemplo, ARN interferente

pequeño (siARN), dsARN de substrato Dicer, ARN de horquilla pequeño (shARN), ARN interferente asimétrico (aiARN), microARN (miARN), mRNA, tARN, rARN, tARN, ARN viral (vARN), y combinaciones de estos. Por consiguiente, en el contexto de esta invención, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consisten en bases, azúcares y uniones interazúcar (esqueleto) que existen naturalmente. Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros que no existen naturalmente, o partes de estos, que funcionan similarmente. Tales oligonucleótidos modificados o substituidos se prefieren frecuentemente en lugar de las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, mejor captación celular, inmunogenicidad reducida, y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

[0037] A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también comprende implícitamente sus variantes modificadas en forma conservadora (por ejemplo, substituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs, y secuencias complementarias así como también la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las substituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) es substituida con bases mixtas y/o residuos de desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

[0038] La invención comprende moléculas de ácido nucleico aisladas o substancialmente purificadas y composiciones que contienen estas moléculas. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN o una molécula de ARN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN o una molécula de ARN que existe aparte de su ambiente nativo. Una molécula de ADN o una molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un ambiente no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o una parte biológicamente activa de ésta "aislada" o "purificada", está substancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando es producida por técnicas recombinantes, o substancialmente libre de precursores químicos u otras

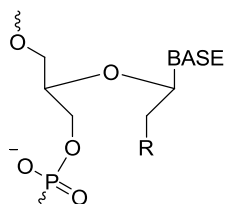
substancias químicas cuando se sintetiza químicamente. En una forma de realización, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias formas de realización, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente a la molécula de ácido nucleico en el AND genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico.

[0039] El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificadoras de longitud parcial o longitud completa necesarias para la producción de un polipéptido o un polipéptido precursor.

[0040] "Producto génico", como se usa en la presente, se refiere a un producto de un gen tal como un transcripto de ARN o un polipéptido.

[0041] El término "análogo de nucleobase desbloqueado" (abreviado como "UNA") se refiere a una nucleobase acíclica en la cual los átomos de C2' y C3' del anillo de ribosa no están unidos en forma covalente. El término "análogo de nucleobase desbloqueado" incluye análogos de nucleobase que tienen la siguiente estructura identificada como Estructura A:

Estructura A



en donde R es hidroxilo, y Base es cualquier base natural o no natural, tal como, por ejemplo, adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). UNAs útiles en la práctica de la presente invención incluyen las moléculas identificadas como monómeros 2'-3'-seco-nucleótidos acíclicos en la patente U.S. serie número 8.314.227 que se incorpora por referencia en la presente en su totalidad.

[0042] El término "lípidos" se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluyen, pero no están limitados a, ésteres de ácidos grasos y están caracterizados por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos solventes orgánicos. Están divididos usualmente en al menos tres clases: (1) "lípidos simples", que

incluyen grasas y aceites así como también ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; y (3) "lípidos derivados" tales como esteroides.

[0043] El término "partícula de lípido" incluye una formulación de lípido que se puede usar para suministrar un ácido nucleico (por ejemplo, siARN) terapéutico a un sitio objetivo de interés (por ejemplo, célula, tejido, órgano, y similares). En formas de realización preferidas, la partícula de lípido de la invención está formada típicamente por un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de la partícula. Una partícula de lípido que incluye una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de siARN) es denominada una partícula de ácido nucleico-lípido. Típicamente, el ácido nucleico está completamente encapsulado dentro de la partícula de lípido, protegiendo de este modo al ácido nucleico de la degradación enzimática.

[0044] En algunos casos, las partículas de ácido nucleico-lípido son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden exhibir tiempos de vida de circulación extendidos después de la inyección intravenosa (i.v.), se pueden acumular en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración), y pueden mediar silenciando la expresión del gen objetivo en estos sitios distales. El ácido nucleico puede ser complejoado con un agente de condensación y encapsulado dentro de una partícula de lípido como se presenta en la publicación PCT No. WO 00/03683, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[0045] Las partículas de lípido de la invención tienen típicamente un diámetro promedio de desde aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm,

120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm, y son substancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de lípido de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se divulgan, por ejemplo, en las publicaciones de patentes U.S. Nos. 20040142025 y 20070042031, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[0046] Como se usa en la presente, "lípido encapsulado" puede referirse a una partícula de lípido que proporciona un ácido nucleico terapéutico tal como un siARN, con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambos. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico (por ejemplo, siARN) está completamente encapsulado en la partícula de lípido (por ejemplo, para formar una partícula de ácido nucleico-lípido).

[0047] El término "lípido conjugado" se refiere a un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas de lípido. Tales lípidos conjugados incluyen, pero no están limitados a, conjugados PEG-lípido, tales como, por ejemplo, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (por ejemplo, conjugados PEG-DAA), PEG acoplado a diacilgliceroles (por ejemplo, conjugados PEG-DAG), PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, y PEG conjugado a ceramidas (ver, por ejemplo, patente U.S. No. 5.885.613), lípidos PEG catiónicos, conjugados polioxazolina (POZ)-lípido (por ejemplo, conjugados POZ-DAA), oligómeros de poliamida (por ejemplo, conjugados ATTA-lípido), y mezclas de estos. Ejemplos adicionales de conjugados POZ-lípido se describen en la publicación PCT No. WO 2010/006282. PEG o POZ pueden ser conjugados directamente al lípido o pueden ser unidos al lípido vía una parte ligadora. Cualquier parte ligadora adecuada para acoplar el PEG o el POZ a un lípido puede ser usada, incluyendo, por ejemplo, partes ligadoras que no contienen éster y partes ligadoras que contienen éster. En algunas formas de realización preferidas, se usan las partes ligadoras que no contienen éster, tales como las amidas o los carbamatos.

[0048] El término "lípido anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en donde la parte hidrófoba del material lípido se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas se derivan de la presencia de grupos

polares o cargados, tales como los grupos carbohidratos, fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo, y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede ser conferida por la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero no están limitados a, grupos hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos substituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos). Ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, pero no están limitados a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos.

[0049] Ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero no están limitados a, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que no tienen fósforo, tales como esfingolípidos, las familias de glicosfingolípidos, diacilglicerol, y β -aciloxiácidos, también están dentro del grupo denotado como lípidos anfipáticos. Adicionalmente, los lípidos anfipáticos descritos más arriba pueden ser mezclados con otros lípidos incluyendo los triglicéridos y los esteroides.

[0050] El término "lípidos neutros" se refiere a cualquiera de una cantidad de especies de lípidos que existen o bien en una forma zwitteriónica no cargada o neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilglicerol.

[0051] El término "lípidos no catiónicos" se refiere a cualquier lípidos anfipático así como también a cualquier otro lípidos neutro o lípidos aniónico.

[0052] El término "lípidos aniónicos" se refiere a cualquier lípidos que está cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no están limitados a, fosfatidilglicerol, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicerol, palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

[0053] El término "lípidido hidrófobo" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero no están limitados a, grupos hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos opcionalmente substituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Ejemplos adecuados incluyen, pero no están limitados a, diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano, y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

[0054] Los términos "lípidido catiónico" y "lípidido amino" se usan en forma intercambiable en la presente para incluir a aquellos lípidos y sales de estos que tienen uno, dos, tres, o más cadenas de ácidos grasos o de alquilo grasos y un grupo cabeza amino pH-titulable (por ejemplo, un grupo cabeza alquilamino o dialquilamino). El lípidido catiónico es típicamente protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH por debajo del pK_a del lípidido catiónico y es substancialmente neutro a un pH por encima del pK_a . Los lípidos catiónicos de la invención también pueden ser denominados lípidos catiónicos titulables. En algunas formas de realización, los lípidos catiónicos comprenden: un grupo cabeza amina terciaria protonatable (por ejemplo, pH-titulable); las cadenas alquilo C_{18} , en donde cada cadena alquilo tiene independientemente 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3) enlaces dobles; y uniones éter, éster, o cetel entre el grupo cabeza y las cadenas alquilo. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no están limitados a, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (también conocido como DLin-C2K-DMA, XTC2, y C2K), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (también conocido como MC2), y DLin-M-C3-DMA (también conocido como MC3).

[0055] El término "sales" incluye cualquier complejo aniónico y catiónico, tal como el complejo formado entre un lípidido catiónico y uno o más aniones. Ejemplos no limitativos de aniones incluyen aniones inorgánicos y orgánicos, por ejemplo, hidruro, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, oxalato (por ejemplo, hemioxalato), fosfato, fosfonato, hidrógeno fosfato, dihidrógeno fosfato, óxido, carbonato, bicarbonato, nitrato, nitrito, nitruro, bisulfito, sulfuro, sulfito, bisulfato, sulfato, tiosulfato, hidrógeno sulfato, borato, formato, acetato, benzoato, citrato, tartrato, lactato, acrilato, poliacrilato, fumarato, maleato, itaconato, glicolato, gluconato, malato, mandelato, tiglat, ascorbato, salicilato, polimetacrilato, perclorato, clorato,

clorito, hipoclorito, bromato, hipobromito, yodato, un alquilsulfonato, un arilsulfonato, arsenato, arsenito, cromato, dicromato, cianuro, cianato, tiocianato, hidróxido, peróxido, permanganato, y mezclas de estos. En formas de realización particulares, las sales de los lípidos catiónicos divulgados en la presente son sales cristalinas.

[0056] El término "alquilo" incluye un hidrocarburo alifático saturado, cíclico o no cíclico, de cadena recta o ramificada, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilos de cadena recta saturados representativos incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, y similares, mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen, sin limitación, isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares, mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen, sin limitación, ciclopentenilo, ciclohexenilo, y similares.

[0057] El término "alqueno" incluye un alquilo, como se definió más arriba, que contiene al menos un enlace doble entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen a ambos isómeros, *cis* y *trans*. Los alquenos de cadena recta y ramificada representativos incluyen, pero no están limitados a, etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares.

[0058] El término "alquino" incluye cualquier alquilo o alqueno, como se definió más arriba, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre carbonos adyacentes. Los alquinos de cadena recta y ramificada representativos incluyen, sin limitación, acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares.

[0059] El término "acilo" incluye cualquier alquilo, alqueno o alquino en donde el carbono en el punto de unión está substituido con un grupo oxo, como se define más abajo. Los siguientes son ejemplos no limitativos de grupos acilo: -C(=O)alquilo, -C(=O)alqueno, y -C(=O)alquino.

[0060] El término "heterociclo" incluye un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros, o un anillo heterocíclico, bicíclico de 7 a 10

miembros, que es o bien saturado, insaturado, o aromático, y que contiene de 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden ser opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede ser opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en donde cualquier de los heterociclos arriba mencionados son fusionados a un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen, pero no están limitados a, heteroarilos, como se definen más abajo, así como también morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

[0061] Los términos "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido", y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno es reemplazado con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. A este respecto, los sustituyentes incluyen, pero no están limitados a, oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x, y -SO_nNR^xR^y, en donde n es 0, 1, o 2, R^x y R^y son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo, o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes alquilo y heterociclo puede ser sustituido adicionalmente con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR^x, heterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x, y -SO_nNR^xR^y. El término "opcionalmente sustituido", cuando se usa antes de una lista de sustituyentes, significa que cada uno de los sustituyentes en la lista puede estar opcionalmente sustituido como se describe en la presente.

[0062] El término "halógeno" incluye fluoro, cloro, bromo, y yodo.

[0063] El término "fusogénica" se refiere a la capacidad de una partícula de lípido de fusionarse con las membranas de una

célula. Las membranas pueden ser o bien la membrana o las membranas plasmáticas que rodean a los orgánulos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

[0064] Como se usa en la presente, el término "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende en su totalidad o en parte, agua.

[0065] Como se usa en la presente, el término "solución orgánica de lípido" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un solvente orgánico que tiene un lípido.

[0066] El término "núcleo denso de electrones", cuando se usa para describir una partícula de lípido de la presente invención, se refiere al aspecto oscuro de la parte interior de una partícula de lípido cuando es visualizada usando criomicroscopía electrónica de transmisión ("cryoTEM"). Algunas partículas de lípidos de la presente invención tienen un núcleo denso de electrones y no tienen una estructura bicapa de lípido. Algunas partículas de lípidos de la presente invención tienen un núcleo denso de electrones, no tienen una estructura bicapa de lípido, y tienen una estructura de fase Cúbica o Hexagonal inversa. Si bien no se pretende quedar limitado por una teoría, se cree que la envuelta del lípido no bicapa proporciona una red 3-dimensional de cilindros de lípido con agua y ácido nucleico en el interior, es decir, esencialmente una gota de lípido interpenetrada con canales acuosos que contienen el ácido nucleico.

[0067] "Sitio distal", como se usa en la presente, se refiere a un sitio físicamente separado, que no está limitado a un lecho capilar adyacente, pero incluye sitios ampliamente distribuidos en un organismo.

[0068] "Estable en suero" con relación a partículas de ácido nucleico-lípido significa que la partícula no es degradada en forma significativa después de ser expuesta a un ensayo en suero o nucleasa que degradaría significativamente al ADN o ARN libre. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo de suero estándar, un ensayo ADNsa, o un ensayo ARNsa.

[0069] "Suministro sistémico", como se usa en la presente, se refiere al suministro de partículas de lípido que lleva a una amplia biodistribución de un agente activo, tal como un siARN dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden llevar al suministro sistémico de algunos agentes, pero no otros. El suministro sistémico significa que una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un agente es expuesta a la

mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener una amplia biodistribución se requiere generalmente una vida útil en sangre tal que el agente no sea degradado o eliminado rápidamente (tal como en la primera pasada por un órgano (hígado, pulmón, etc.) o por una unión celular rápida, no específica) antes de alcanzar un sitio de la enfermedad distal con respecto al sitio de la administración. El suministro sistémico de partículas de lípido puede ser por cualquier medio conocido en el arte incluyendo, por ejemplo, intravenoso, subcutáneo e intraperitoneal. En una forma de realización preferida, el suministro sistémico de las partículas de lípido es por suministro intravenoso.

[0070] "Suministro local", como se usa en la presente, se refiere al suministro de un agente activo, tal como siARN directamente a un sitio objetivo dentro de un organismo. Por ejemplo, un agente puede ser suministrado localmente por inyección directa en un sitio de la enfermedad, otro sitio objetivo, o un órgano objetivo, tal como el hígado, el corazón, el páncreas, el riñón, y similares.

[0071] El término "carga de partículas de virus", como se usa en la presente, se refiere a una medida del número de partículas de virus (por ejemplo, HBV y/o HDV) presentes en un fluido corporal, tal como sangre. Por ejemplo, la carga de partículas puede ser expresada como el número de partículas de virus por mililitro de, por ejemplo, sangre. El testeo de la carga de partículas puede ser realizado usando tests basados en la amplificación del ácido nucleico, así como también tests no basados en ácido nucleico (ver, por ejemplo, Puren et al., The Journal of Infectious Diseases, 201:S27-36 (2010)).

[0072] El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de mamífero tal como un humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un hámster, un cobayo, un conejo, ganado vacuno, y similares.

Descripción de algunas formas de realización

[0073] La presente invención proporciona moléculas de siARN que tienen como objetivo la expresión de uno o más genes de HBV, partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más (por ejemplo, un cóctel) de los siARNs, y métodos de suministro y/o administración de las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, para el tratamiento de la infección por HBV y/o HDV en humanos).

[0074] En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas

de siARN que tienen como objetivo la expresión de uno o más genes de HBV. En algunos casos, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una combinación (por ejemplo, un cóctel, pool, o mezcla) de siARNs que tienen como objetivo diferentes regiones del genoma de HBV. En algunos casos, las moléculas de siARN de la invención son capaces de inhibir la replicación de HBV y/o HDV *in vitro* o *in vivo*.

[0075] En formas de realización particulares, la presente invención proporciona las moléculas de siARN mostradas en la Tabla A, en donde la hebra superior de cada molécula de siARN de doble hebra es la hebra sentido que corre en una dirección 5' a 3' de izquierda a derecha; y la hebra inferior de cada molécula de siARN de doble hebra es la hebra antisentido que corre en una dirección 5' a 3' de derecha a izquierda. Como se muestra en la Tabla A, las moléculas de siARN pueden comprender uno o más ribonucleótidos con una modificación 2'-O-metilo y/o una o más partes de UNA. Los valores CI50 mostrados en la Tabla A más abajo fueron determinados usando el ensayo descrito en el Ejemplo 1.

Tabla A.

Nom- bre	Secuencias dúplex	CI 50 (nM)
1m	5' (SEQ ID NO:1) ' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' <u>U</u> <u>U</u> U C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' (SEQ ID NO:3) ' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' (SEQ ID NO:5) ' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A <u>U</u> <u>U</u> 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' (SEQ ID NO:7) ' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A <u>U</u> <u>U</u> 3' <u>U</u> <u>U</u> C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31
5m	5' (SEQ ID NO:9) ' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06

Nom- bre	Secuencias dúplex	CI 50 (nM)
6m	5' 3' (SEQ ID ' NO:11) 3' 5' (SEQ ID ' NO:12)	0.05
7m	5' 3' (SEQ ID ' NO:13) 3' 5' (SEQ ID ' NO:14)	0.06
8m	5' 3' (SEQ ID ' NO:15) 3' 5' (SEQ ID ' NO:16)	0.24
9m	5' 3' (SEQ ID ' NO:17) 3' 5' (SEQ ID ' NO:18)	0.13
10m	5' 3' (SEQ ID ' NO:19) 3' 5' (SEQ ID ' NO:20)	0.34
11m	5' 3' (SEQ ID ' NO:21) 3' 5' (SEQ ID ' NO:22)	0.31
12m	5' 3' (SEQ ID ' NO:23) 3' 5' (SEQ ID ' NO:24)	0.16
13m	5' 3' (SEQ ID ' NO:25) 3' 5' (SEQ ID ' NO:26)	0.2
14m	5' 3' (SEQ ID ' NO:27) 3' 5' (SEQ ID ' NO:28)	0.16

Nom- bre	Secuencias dúplex	CI 50 (nM)
15m	5' (SEQ ID NO:29) ' C u g G C u C A G U U u A C U A G U G U 3' (SEQ ID NO:30) ' U U G A C C g A G U C A A A U G A U C A C	0.17
Minúscula = Modificación 2'O-metilo Subrayado = Parte UNA		

[0076] En otras formas de realización, como se presenta en la Tabla B en la presente, la presente invención proporciona las hebras sentido y las hebras antisentido aisladas (es decir, moléculas de ácido nucleico de hebra simple aisladas) de las moléculas de siARN presentadas en la Tabla A. Las secuencias de ácido nucleico presentadas en la Tabla B están ordenadas como pares de secuencias, en donde cada par incluye una hebra sentido y su hebra antisentido complementaria. Cada par de secuencias (hebra sentido más antisentido) es identificada con un nombre particular, que corresponde a los nombres mostrados en la Tabla A.

[0077] Estas hebras sentido y antisentido aisladas, mostradas en la Tabla B, son útiles, por ejemplo, para preparar moléculas de siARN que son útiles para reducir la expresión de uno o más genes de HBV *in vivo* o *in vitro*. Estas hebras sentido y antisentido aisladas también son útiles, por ejemplo, las sondas de hibridación para identificar y medir la cantidad de genoma de HBV en un material biológico, tal como una muestra de tejido o sangre de un ser humano infectado con HBV o HBV/HDV.

[0078] En formas de realización particulares, un oligonucleótido (tal como las hebras de ARN sentido y antisentido presentadas en la Tabla B) de la invención se hibrida específicamente, o es complementario, a una secuencia de polinucleótido objetivo. Los términos "específicamente hibridable" y "complementario" como se usan en la presente indican un grado suficiente de complementariedad tal que se produce una unión estable y específica entre el ADN o ARN objetivo y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100% complementario con su secuencia de ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. En formas de realización preferidas, un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia objetivo interfiere con la función normal de la secuencia objetivo para

causar una pérdida de utilidad o expresión de allí, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del oligonucleótido a las secuencias no objetivo bajo condiciones en las cuales se desea una unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, bajo condiciones en las cuales se realizan los ensayos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3, o más sustituciones de bases en comparación con la región de una secuencia de un gen o mRNA al que está direccionado o al cual se hibrida específicamente.

Tabla B.

Nombre	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5' - 3')
1m	<u>AgGuAUguUGCCCGuUUGUUU</u> (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAACAuACCUUU (SEQ ID NO:2)
2m	<u>GCucAgUUUACUAGUGCcAUU</u> (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:4)
3m	<u>CCGUguGCACUuCGCuCAUU</u> (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:6)
4m	<u>GCucAgUUUACUAGUGCcAUU</u> (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:8)
5m	<u>CCGUguGCACUuCGCuUCAUU</u> (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:10)
6m	<u>CuggCUCAGUUUACuAgUGUU</u> (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU (SEQ ID NO:12)
7m	<u>CCGUguGCACUuCGCuUCAUU</u> (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:14)
8m	<u>GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU</u> (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:16)
9m	<u>AgGuAUGuUGCCCGuUUGUUU</u> (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAACAuACCUUU (SEQ ID NO:18)
10m	<u>GCCgAuCCAUAUCugCggAAUU</u> (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:20)
11m	<u>GCCgAuCCAUAUCugCggAAUU</u> (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:22)
12m	<u>GCCgAuCCAUAUCugCGgAAUU</u> (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:24)
13m	<u>GCCgAuCCAUAUCugCGgAAUU</u> (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:26)
14m	<u>GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU</u> (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:28)
15m	<u>CugGCuCAGUUuACUAGUGUU</u> (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAGUU (SEQ ID NO:30)

Minúsculas = modificación 2'O-metilo Subrayado = parte UNA

[0079] Por lo tanto, algunas formas de realización de la invención proporcionan una molécula de siARN, de doble hebra, aislada, seleccionada del grupo que consiste en 1m (SEQ ID NO:1 y 2), 2m (SEQ ID NO:3 y 4), 3m (SEQ ID NO:5 y 6), 4m (SEQ ID NO:7 y 8), 5m (SEQ ID NO:9 y 10), 6m (SEQ ID NO:11 y 12), 7m (SEQ ID NO:13 y 14), 8m (SEQ ID NO:15 y 16), 9m (SEQ ID NO:17 y 18), 10m (SEQ ID NO:19 y 20), 11m (SEQ ID NO:21 y 22), 12m (SEQ ID NO:23 y 24), 13m (SEQ ID NO:25 y 26), 14m (SEQ ID NO:27 y 28), 15m (SEQ ID NO:29 y 30).

[0080] Algunas formas de realización de la invención también proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:29.

[0081] Algunas formas de realización de la invención también proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30.

[0082] La presente invención también proporciona una composición que comprende una o más moléculas de siARN, de doble hebra, aisladas, descritas en la presente (por ejemplo, una molécula de siARN descrita en la Tabla A).

[0083] En algunas formas de realización, la composición comprende dos moléculas de siARN de doble hebra diferentes seleccionadas del grupo que consiste en de 1m (SEQ ID NO:1 y 2), 2m (SEQ ID NO:3 y 4), 3m (SEQ ID NO:5 y 6), 4m (SEQ ID NO:7 y 8), 5m (SEQ ID NO:9 y 10), 6m (SEQ ID NO:11 y 12), 7m (SEQ ID NO:13 y 14), 8m (SEQ ID NO:15 y 16), 9m (SEQ ID NO:17 y 18), 10m (SEQ ID NO:19 y 20), 11m (SEQ ID NO:21 y 22), 12m (SEQ ID NO:23 y 24), 13m (SEQ ID NO:25 y 26), 14m (SEQ ID NO:27 y 28), 15m (SEQ ID NO:29 y 30). En algunas formas de realización, una combinación de las dos moléculas de siARN de doble hebra diferentes es seleccionada de una cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2.

[0084] En algunas formas de realización, la composición comprende tres moléculas de siARN de doble hebra diferentes seleccionadas

del grupo que consiste en 1m (SEQ ID NO:1 y 2), 2m (SEQ ID NO:3 y 4), 3m (SEQ ID NO:5 y 6), 4m (SEQ ID NO:7 y 8), 5m (SEQ ID NO:9 y 10), 6m (SEQ ID NO:11 y 12), 7m (SEQ ID NO:13 y 14), 8m (SEQ ID NO:15 y 16), 9m (SEQ ID NO:17 y 18), 10m (SEQ ID NO:19 y 20), 11m (SEQ ID NO:21 y 22), 12m (SEQ ID NO:23 y 24), 13m (SEQ ID NO:25 y 26), 14m (SEQ ID NO:27 y 28), 15m (SEQ ID NO:29 y 30). En algunas formas de realización, una combinación de las tres moléculas de siARN de doble hebra diferentes es seleccionada de una cualquiera de las combinaciones descriptas en el Ejemplo 3.

[0085] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más (por ejemplo, un cóctel) de los siARNs descriptos en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0086] En algunas formas de realización, una composición descrita en la presente comprende una o más moléculas de siARN, que silencia la expresión de un gen del virus de la hepatitis B.

[0087] En otro aspecto, la presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido que tiene como objetivo la expresión génica de HBV. Las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden típicamente una o más (por ejemplo, un cóctel) de las moléculas de siARN de doble hebra, aisladas, descriptas en la presente (por ejemplo, como se describe en la Tabla A), un lípido catiónico, y un lípido no catiónico. En algunos casos, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden además un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Preferentemente, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden una o más (por ejemplo, un cóctel) de las moléculas de siARN de doble hebra, aisladas, descriptas en la presente, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas.

[0088] En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende dos moléculas de siARN de doble hebra diferentes seleccionadas del grupo que consiste en 1m (SEQ ID NO:1 y 2), 2m (SEQ ID NO:3 y 4), 3m (SEQ ID NO:5 y 6), 4m (SEQ ID NO:7 y 8), 5m (SEQ ID NO:9 y 10), 6m (SEQ ID NO:11 y 12), 7m (SEQ ID NO:13 y 14), 8m (SEQ ID NO:15 y 16), 9m (SEQ ID NO:17 y 18), 10m (SEQ ID NO:19 y 20), 11m (SEQ ID NO:21 y 22), 12m (SEQ ID NO:23 y 24), 13m (SEQ ID NO:25 y 26), 14m (SEQ ID NO:27 y 28), 15m (SEQ ID NO:29 y 30). En algunas formas de realización, una combinación de las dos moléculas de siARN de doble hebra diferentes es seleccionada de una cualquiera de las combinaciones

descriptas en el Ejemplo 2.

[0089] En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende tres moléculas de siARN de doble hebra diferentes seleccionadas del grupo que consiste en 1m (SEQ ID NO:1 y 2), 2m (SEQ ID NO:3 y 4), 3m (SEQ ID NO:5 y 6), 4m (SEQ ID NO:7 y 8), 5m (SEQ ID NO:9 y 10), 6m (SEQ ID NO:11 y 12), 7m (SEQ ID NO:13 y 14), 8m (SEQ ID NO:15 y 16), 9m (SEQ ID NO:17 y 18), 10m (SEQ ID NO:19 y 20), 11m (SEQ ID NO:21 y 22), 12m (SEQ ID NO:23 y 24), 13m (SEQ ID NO:25 y 26), 14m (SEQ ID NO:27 y 28), 15m (SEQ ID NO:29 y 30).. En algunas formas de realización, una combinación de las tres moléculas de siARN de doble hebra diferentes es seleccionada de una cualquiera de las combinaciones descriptas en el Ejemplo 3.

[0090] En algunas formas de realización, los siARNs de la presente invención están completamente encapsulados en la partícula de ácido nucleico-lípido. Con respecto a las formulaciones que comprenden un cóctel de siARN, los diferentes tipos de especies de siARN presentes en el cóctel (por ejemplo, compuestos de siARN con secuencias diferentes) pueden ser co-encapsulados en la misma partícula, o cada tipo de especie de siARN presente en el cóctel puede ser encapsulada en una partícula separada. El cóctel de siARN puede ser formulado en las partículas descriptas en la presente usando una mezcla de dos, tres o más siARNs individuales (cada uno teniendo una secuencia única) a relaciones molares o concentraciones idénticas, similares, o diferentes. En una forma de realización, un cóctel de siARNs (correspondiente a una pluralidad de siARNs con diferentes secuencias) es formulado usando relaciones molares o concentraciones idénticas, similares, o diferentes, de cada especie de siARN, y los diferentes tipos de siARNs son co-encapsulados en la misma partícula. En otra forma de realización, cada tipo de especie de siARN presente en el cóctel es encapsulado en diferentes partículas a relaciones molares o concentraciones de siARN idénticas, similares, o diferentes, y las partículas así formadas (cada una conteniendo un diferente carga útil de siARN) son administradas separadamente (por ejemplo, a diferentes tiempos de acuerdo con un régimen terapéutico), o son combinadas y administradas juntas como una sola dosis unitaria (por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las partículas descriptas en la presente son estables en suero, son resistentes a la degradación por nucleasa, y son substancialmente no tóxicas para los

mamíferos, tales como los humanos.

[0091] El lípido catiónico en las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de Fórmula I-III descriptos en la presente o cualquier otras especie de lípido catiónico. En una forma de realización, el lípido catiónico es un lípido dialquilo. En otra forma de realización, el lípido catiónico es un lípido trialquilo. En una forma de realización particular, el lípido catiónico es seleccionado del grupo que consiste en 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), dilinoileilmetil-3-dimetilaminopropionato (DLin-M-C2-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-M-C3-DMA; Compuesto (7)), sales de estos, y mezclas de estos.

[0092] En otra forma de realización particular, el lípido catiónico es seleccionado del grupo que consiste en 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (DLin-MP-DMA; Compuesto (8)), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (Compuesto (7)), (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto (13)), una sal de estos, o una mezcla de estos.

[0093] En algunas formas de realización, el lípido catiónico comprende desde aproximadamente 48 moles % a aproximadamente 62 moles % del lípido total presente en la partícula.

[0094] El lípido no catiónico en las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos aniónicos y/o lípidos neutros. En algunas formas de realización, el lípido no catiónico comprende uno de los siguientes componentes lípidos neutros: (1) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de estos; (2) colesterol o un derivado de éste; o (3) un fosfolípido. En algunas formas de realización preferidas, el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina

(DSPC), o una mezcla de éstas. En una forma de realización preferida, el lípido no catiónico es una mezcla de DPPC y colesterol. En una forma de realización preferida, el lípido no catiónico es una mezcla de DSPC y colesterol.

[0095] En algunas formas de realización, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de estos, en donde el fosfolípido comprende desde aproximadamente 7 moles % a aproximadamente 17 moles % del lípido total presente en la partícula y el colesterol o derivado de éste comprende desde aproximadamente 25 moles % a aproximadamente 40 moles % de lípido total presente en la partícula.

[0096] El lípido conjugado en las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención inhibe la agregación de partículas y puede comprender, por ejemplo, uno o más de los lípidos conjugados descritos en la presente. En una forma de realización particular, el lípido conjugado comprende un conjugado PEG-lípido. Ejemplos de conjugados PEG-lípido incluyen, pero no están limitados a, conjugados PEG-DAG, conjugados PEG-DAA, y mezclas de estos. En algunas formas de realización, el conjugado PEG-lípido es seleccionado del grupo que consiste en un conjugado PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado PEG-dialquiloxypropilo (PEG-DAA), un conjugado PEG-fosfolípido, un conjugado PEG-ceramida (PEG-Cer), y una mezcla de estos. En algunas formas de realización, el conjugado PEG-lípido es un conjugado PEG-DAA. En algunas formas de realización, el conjugado PEG-DAA en la partícula de lípido puede comprender un conjugado PEG-dideciloxypropilo (C_{10}), un conjugado PEG-dilauroiloxypropilo (C_{12}), un conjugado PEG-dimiristiloxypropilo (C_{14}), un conjugado PEG-dipalmitiloxypropilo (C_{16}), un conjugado PEG-diesteariloxypropilo (C_{18}), o mezclas de estos. En algunas formas de realización, en donde el conjugado PEG-DAA es un conjugado PEG-dimiristiloxypropilo (C_{14}). En otra forma de realización, el conjugado PEG-DAA es un compuesto **(66)** conjugado (PEG-C-DMA). En otra forma de realización, el lípido conjugado comprende un conjugado POZ-lípido, tal como un conjugado POZ-DAA.

[0097] En algunas formas de realización, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende desde aproximadamente 0,5 moles % a aproximadamente 3 moles % del lípido total presente en la partícula.

[0098] En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación de masa total lípido:siARN de

desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1.

[0099] En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene un diámetro medio de desde aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.

[00100] En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene un núcleo denso en electrones.

[00101] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) uno o más lípidos catiónicos o sales de estos que comprenden desde aproximadamente 50 moles % a aproximadamente 85 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden desde aproximadamente 13 moles % a aproximadamente 49,5 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden desde aproximadamente 0,5 moles % a aproximadamente 2 moles % del lípido total presente en la partícula.

[00102] En un aspecto de esta forma de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ej, ver., Tabla A); (b) un lípido catiónico o una sal de éste que comprende desde aproximadamente 52 moles % a aproximadamente 62 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de éste que comprende desde aproximadamente 36 moles % a aproximadamente 47 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende desde aproximadamente 1 mol % a aproximadamente 2 moles % del lípido total presente en la partícula. En una forma de realización particular, la formulación es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 1,4 moles % de conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG2000-C-DMA), aproximadamente 57,1 moles % de lípido catiónico (por ejemplo, DLin-K-C2-DMA) o una sal de éste, aproximadamente 7,1 moles % DPPC (o DSPC), y aproximadamente 34,3 moles % de colesterol (o un derivado de éste).

[00103] En otro aspecto de esta forma de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) un lípido catiónico o una sal de éste

que comprende desde aproximadamente 56,5 moles % a aproximadamente 66,5 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) colesterol o un derivado de éste que comprende desde aproximadamente 31,5 moles % a aproximadamente 42,5 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende desde aproximadamente 1 mol % a aproximadamente 2 moles % del lípido total presente en la partícula. En una forma de realización particular, la formulación es un sistema de tres componentes que está libre de fosfolípido y comprende aproximadamente 1,5 moles % de conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG2000-C-DMA), aproximadamente 61,5 moles % de lípido catiónico (por ejemplo, DLin-K-C2-DMA) o una sal de éste, y aproximadamente 36,9 moles % de colesterol (o un derivado de éste).

[00104] Formulaciones adicionales se describen en la publicación PCT No. WO 09/127060 y la publicación de la solicitud de patente US publicada número US 2011/0071208 A1, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00105] En otras formas de realización, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) uno o más lípidos catiónicos o sales de estos que comprenden desde aproximadamente 2 moles % a aproximadamente 50 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden desde aproximadamente 5 moles % a aproximadamente 90 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden desde aproximadamente 0,5 moles % a aproximadamente 20 moles % del lípido total presente en la partícula.

[00106] En un aspecto de esta forma de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) un lípido catiónico o una sal de éste que comprende desde aproximadamente 30 moles % a aproximadamente 50 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de estos que comprende desde aproximadamente 47 moles % a aproximadamente 69 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) un

conjugado PEG-lípido que comprende desde aproximadamente 1 mol % a aproximadamente 3 moles % del lípido total presente en la partícula. En una forma de realización particular, la formulación es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 2 moles % de conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG2000-C-DMA), aproximadamente 40 moles % de lípido catiónico (por ejemplo, DLin-K-C2-DMA) o una sal de éste, aproximadamente 10 moles % DPPC (o DSPC), y aproximadamente 48 moles % de colesterol (o un derivado de éste).

[00107] En otras formas de realización, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) de moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) uno o más lípidos catiónicos o sales de estos que comprenden desde aproximadamente 50 moles % a aproximadamente 65 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden desde aproximadamente 25 moles % a aproximadamente 45 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden desde aproximadamente 5 moles % a aproximadamente 10 moles % del lípido total presente en la partícula.

[00108] En un aspecto de esta forma de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más (por ejemplo, un cóctel) moléculas de siARN descritas en la presente (por ejemplo, ver, Tabla A); (b) un lípido catiónico o una sal de éste que comprende desde aproximadamente 50 moles % a aproximadamente 60 moles % del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de éste que comprende desde aproximadamente 35 moles % a aproximadamente 45 moles % del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende desde aproximadamente 5 moles % a aproximadamente 10 moles % del lípido total presente en la partícula. En algunos casos, la mezcla de lípido no catiónico en la formulación comprende: (i) un fosfolípido de desde aproximadamente 5 moles % a aproximadamente 10 moles % del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado de éste de desde aproximadamente 25 moles % a aproximadamente 35 moles % del lípido total presente en la partícula. En una forma de realización particular, la formulación es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 7 moles % de conjugado

PEG-lípido (por ejemplo, PEG750-C-DMA), aproximadamente 54 moles % de lípido catiónico (por ejemplo, DLin-K-C2-DMA) o una sal de éste, aproximadamente 7 moles % de DPPC (o DSPC), y aproximadamente 32 moles % de colesterol (o un derivado de éste).

[00109] En otro aspecto de esta forma de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNsi (por ejemplo, un cóctel) descritas en la presente (por ejemplo, ver la Tabla A); (b) un lípido catiónico o una de sus sales que comprende de aproximadamente 55 % mol a aproximadamente 65 % mol del lípido total presente en la partícula; (c) colesterol o uno de sus derivados que comprende de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 40 % mol del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 10 % mol del lípido total presente en la partícula. En una forma de realización particular, la formulación es un sistema de tres componentes que está libre de fosfolípidos y que comprende de aproximadamente 7 % mol de conjugado PEG-lípido (por ejemplo, PEG750-C-DMA), aproximadamente 58 % mol de lípido catiónico (por ejemplo, DLin-K-C2-DMA) o una de sus sales, y aproximadamente 35 % mol de colesterol (o de uno de sus derivados).

[00110] Formas de realización adicionales de formulaciones útiles se describen en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N° 2011/0076335 A1, cuya divulgación se incorpora en la presente como referencia en su totalidad para cualquier finalidad.

[00111] En determinadas formas de realización de la invención, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNsi (por ejemplo, un cóctel) descritas en la presente (por ejemplo, ver la Tabla A) (b) un lípido catiónico o una de sus sales que comprende de aproximadamente 48 % mol a aproximadamente 62 % mol del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o derivado del mismo, en donde el fosfolípido comprende de aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 17 % mol del lípido total presente en la partícula, y en donde el colesterol o su derivado comprende de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 40 % mol del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 3,0 % mol del lípido total presente en la partícula. En la que sigue se incluyen ejemplos de formulaciones A-Z de este aspecto de la invención.

[00112] El ejemplo de formulación A incluye los siguientes componente (en donde los valores porcentuales de los componentes están expresados en % mol): PEG-lípido (1,2%), lípido catiónico (53,2%), fosfolípido (9,3%), colesterol (36,4%), en donde las cantidades reales de los lípidos presentes puede variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto **(66)**) (1,2%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (53,2%), el fosfolípido es DPPC (9,3%), y el colesterol se halla presente a 36,4%, en donde las cantidades reales de los lípidos presentes puede variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido-lípido basada en la formulación A, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación A puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi es seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación A puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi es seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación de masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, o de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de estos valores o intervalo de estos. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación de masas total lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00113] El ejemplo de formulación B que incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes están expresados en % de mol): PEG-lípido (0,8%), lípido

catiónico (59,7%), fosfolípido (14,2%), colesterol (25,3%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (0,8%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (59,7%), el fosfolípido es DSPC (14,2%), y el colesterol se halla presente a 25,3%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación B, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación B puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación B puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00114] El ejemplo de formulación C incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,9%), lípido catiónico (52,5%), fosfolípido (14,8%), colesterol (30,8%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden

variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (1,9%), el lípido catiónico es 1,2-di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)) (52,5%), el fosfolípido es DSPC (14,8%), y el colesterol se halla presente en un 30,8%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación C puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación C puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00115] El ejemplo de formulación D incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (0,7%), lípido catiónico (60,3%), fosfolípido (8,4%), colesterol (30,5%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1$

% mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (0,7%), el lípido catiónico es 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (DLin-MP-DMA; Compuesto (8) (60,3%), el fosfolípido es DSPC (8,4%), y el colesterol se halla presente en un 30,5%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación D, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación D puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación D puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00116] El ejemplo de formulación E incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,8%), lípido catiónico (52,1%), fosfolípido (7,5%), colesterol (38,5%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa,

el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (1,8%), el lípido catiónico es (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato) (Compuesto (7)) (52,1%), el fosfolípido es DPPC (7,5%), y el colesterol se halla presente en un 38,5%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación E, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación E puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación E puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00117] La formulación F dada a título de ejemplo incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (0,9%), lípido catiónico (57,1%), fosfolípido (8,1%), colesterol (33,8%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67))

(0,9%), el lípido catiónico es 1,2-dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)) (57,1%), el fosfolípido es DSPC (8,1%), y el colesterol se halla presente en un 33,8%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación F, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación F puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación F puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00118] El ejemplo de formulación G incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,7%), lípido catiónico (61,6%), fosfolípido (11,2%), colesterol (25,5%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67))

(1,7%), el lípido catiónico es 1,2-dilinolenoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linolenoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)) (61,6%), el fosfolípido es DPPC (11,2%), y el colesterol se halla presente en un 25,5%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación G, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación G puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación G puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00119] El ejemplo de formulación H incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,1%), lípido catiónico (55,0%), fosfolípido (11,0%), colesterol (33,0%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66))

(1,1%), el lípido catiónico es (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto **(13)**) (55,0%), el fosfolípido es DSPC (11,0%), y el colesterol se halla presente en un 33,0%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación H, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación H puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación H puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00120] El ejemplo de formulación I incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,6%), lípido catiónico (53,1%), fosfolípido (9,4%), colesterol (35,0%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto **(66)**) (2,6%), el lípido catiónico es (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto **(13)**) (53,1%), el fosfolípido

es DSPC (9,4%), y el colesterol se halla presente en un 35,0%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación I, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación I puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación I puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00121] El ejemplo de formulación J incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (0,6%), lípido catiónico (59,4%), fosfolípido (10,2%), colesterol (29,8%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5 \%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4 \%$ mol, $\pm 3 \%$ mol, $\pm 2 \%$ mol, $\pm 1 \%$ mol, $\pm 0,75 \%$ mol, $\pm 0,5 \%$ mol, $\pm 0,25 \%$ mol, o $\pm 0,1 \%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (0,6%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (59,4%), el fosfolípido es DPPC (10,2%), y el colesterol se halla presente en un 29,8%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por*

ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación J, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación J puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación J puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00122] El ejemplo de formulación K incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (0,5%), lípido catiónico (56,7%), fosfolípido (13,1%), colesterol (29,7%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (0,5%), el lípido catiónico es (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato) (Compuesto (7)) (56,7%), el fosfolípido es DSPC (13,1%), y el colesterol se halla presente en un 29,7%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol).

mol, $\pm 0,25$ % mol, o $\pm 0,1$ % mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación K, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación K puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación K puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00123] El ejemplo de formulación L incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,2%), lípido catiónico (52,0%), fosfolípido (9,7%), colesterol (36,2%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, ± 5 % (o por ejemplo, ± 4 % mol, ± 3 % mol, ± 2 % mol, ± 1 % mol, $\pm 0,75$ % mol, $\pm 0,5$ % mol, $\pm 0,25$ % mol, o $\pm 0,1$ % mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (2,2%), el lípido catiónico es 1,2-di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto (15)) (52,0%), el fosfolípido es DSPC (9,7%), y el colesterol se halla presente en un 36,2%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, ± 5 % (o por ejemplo, ± 4 % mol, ± 3 % mol, ± 2 % mol, ± 1 % mol, $\pm 0,75$ % mol, $\pm 0,5$ % mol, $\pm 0,25$ % mol, o $\pm 0,1$ % mol). Por lo tanto, determinadas formas de realización de la invención proveen

una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación L, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación L puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación L puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00124] El ejemplo de formulación M incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,7%), lípido catiónico (58,4%), fosfolípido (13,1%), colesterol (25,7%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (2,7%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (58,4%), el fosfolípido es DPPC (13,1%), y el colesterol se halla presente en un 25,7%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación M, que comprende una o más moléculas de ARNsi

descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación M puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación M puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00125] El ejemplo de formulación N incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (3,0%), lípido catiónico (53,3%), fosfolípido (12,1%), colesterol (31,5%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (3,0%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (53,3%), el fosfolípido es DPPC (12,1%), y el colesterol se halla presente en un 31,5%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación N, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la

formulación N puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación N puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00126] El ejemplo de formulación O incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,5%), lípido catiónico (56,2%), fosfolípido (7,8%), colesterol (34,7%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (**66**)) (1,5%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (56,2%), el fosfolípido es DPPC (7,8%), y el colesterol se halla presente en un 34,7%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación O, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación O puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre

cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación O puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00127] El ejemplo de formulación P incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,1%), lípido catiónico (48,6%), fosfolípido (15,5%), colesterol (33,8%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (2,1%), el lípido catiónico es 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (DLin-MP-DMA; Compuesto (8)) (48,6%), el fosfolípido es DSPC (15,5%), y el colesterol se halla presente en un 33,8%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación P, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación P puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en

el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación P puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00128] El ejemplo de formulación Q incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,5%), lípido catiónico (57,9%), fosfolípido (9,2%), colesterol (30,3%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto **(66)**) (2,5%), el lípido catiónico es (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto **(13)**) (57,9%), el fosfolípido es DSPC (9,2%), y el colesterol se halla presente en un 30,3%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación Q, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación Q puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido

nucleico basada en la formulación Q puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00129] El ejemplo de formulación R incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,6%), lípido catiónico (54,6%), fosfolípido (10,9%), colesterol (32,8%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (66)) (1,6%), el lípido catiónico es 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (Compuesto (8)) (54,6%), el fosfolípido es DSPC (10,9%), y el colesterol se halla presente en un 32,8%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación R, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación R puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación R puede comprender tres

moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00130] El ejemplo de formulación S incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,9%), lípido catiónico (49,6%), fosfolípido (16,3%), colesterol (31,3%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto **(66)**) (2,9%), el lípido catiónico es (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto **(13)**) (49,6%), el fosfolípido es DPPC (16,3%), y el colesterol se halla presente en un 31,3%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación S, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación S puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación S puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las

tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00131] El ejemplo de formulación T incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (0,7%), lípido catiónico (50,5%), fosfolípido (8,9%), colesterol (40,0%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (0,7%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (50,5%), el fosfolípido es DPPC (8,9%), y el colesterol se halla presente en un 40,0%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación T, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación T puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación T puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En

determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00132] El ejemplo de formulación U incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,0%), lípido catiónico (51,4%), fosfolípido (15,0%), colesterol (32,6%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (1,0%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (51,4%), el fosfolípido es DSPC (15,0%), y el colesterol se halla presente en un 32,6%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación U, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación U puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación U puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una

relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (por ejemplo, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00133] El ejemplo de formulación V incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,3%), lípido catiónico (60,0%), fosfolípido (7,2%), colesterol (31,5%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (1,3%), el lípido catiónico es 1,2-dilinolenoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA) (60,0%), el fosfolípido es DSPC (7,2%), y el colesterol se halla presente en un 31,5%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ (o por ejemplo, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación V, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación V puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación V puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1,

14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00134] El ejemplo de formulación W incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (1,8%), lípido catiónico (51,6%), fosfolípido (8,4%), colesterol (38,3%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (**66**)) (1,8%), el lípido catiónico es 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) (51,6%), el fosfolípido es DSPC (8,4%), y el colesterol se halla presente en un 38,3%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación W, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación W puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación W puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido

nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00135] El ejemplo de formulación X incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,4%), lípido catiónico (48,5%), fosfolípido (10,0%), colesterol (39,2%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto **(66)**) (2,4%), el lípido catiónico es 1,2-di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA; Compuesto **(15)**) (48,5%), el fosfolípido es DPPC (10,0%), y el colesterol se halla presente en un 39,2%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación X, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación X puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación X puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales

lípidos:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípidos:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00136] El ejemplo de formulación Y incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,6%), lípido catiónico (61,2%), fosfolípido (7,1%), colesterol (29,2%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DMA (compuesto (**66**)) (2,6%), el lípido catiónico es (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (Compuesto (**13**)) (61,2%), el fosfolípido es DSPC (7,1%), y el colesterol se halla presente en un 29,2%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación Y, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación Y puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación Y puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualesquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípidos:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípidos:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación

lípidos:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00137] El ejemplo de formulación Z incluye los siguientes componentes (en donde los valores porcentuales de los componentes se expresan en forma de por ciento molar): PEG-lípido (2,2%), lípido catiónico (49,7%), fosfolípido (12,1%), colesterol (36,0%), en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por ejemplo, en una forma de realización representativa, el PEG-lípido es PEG-C-DOMG (compuesto (67)) (2,2%), el lípido catiónico es (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato) (Compuesto (7)) (49,7%), el fosfolípido es DPPC (12,1%), y el colesterol se halla presente en un 36,0%, en donde las cantidades reales de los lípidos pueden variar en, *por ejemplo*, $\pm 5\%$ (o *por ejemplo*, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol). Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido basada en la formulación Z, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación Z puede comprender dos moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las dos moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 2. En determinadas otras formas de realización, la partícula de ácido nucleico basada en la formulación Z puede comprender tres moléculas de ARNsi diferentes, en donde una combinación de las tres moléculas de ARNsi diferentes está seleccionada entre cualquiera de las combinaciones descritas en el Ejemplo 3. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, o 15:1, o cualquier fracción de ellos o en su intervalo. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación entre masas totales lípido:ARNsi de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a

9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00138] Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente, en donde los lípidos están formulados como se describe en cualquier de las formulaciones A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y o Z.

[00139] La presente invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de ácido nucleico-lípido y un portador farmacéuticamente aceptable.

[00140] Las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención son útiles, por ejemplo, para la entrega terapéutica de ARNsi s que silencian la expresión de uno o más genes de HBV. En algunas formas de realización, un cóctel de ARNsi s que apuntan a regiones diferentes (*por ejemplo*, secuencias que se superponen y/o no se superponen) de un gen o transcritos de HBV es formulado en la misma de ácido nucleico-lípido, o en distintas partículas de ácido nucleico-lípido, y las partículas son administradas a un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que requiera un tratamiento de este tipo. En algunos casos, una cantidad terapéuticamente efectiva de la partícula de ácido nucleico-lípido puede ser administrada al mamífero, *por ejemplo*, para tratar una infección de HBV y/o en un ser humano.

[00141] En determinadas formas de realización, la presente invención provee un método para Introducir una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente en una célula, mediante la puesta en contacto de la célula con una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente.

[00142] En determinadas formas de realización, la presente invención provee un método para introducir una o más moléculas de ARNsi que silencian la expresión del virus de Hepatitis B en una célula, para lo cual se pone en contacto la célula con la partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente bajo condiciones en las que el ARNsi ingresa en la célula y silencia la expresión del gen del virus de la Hepatitis B dentro de la célula. En determinadas formas de realización, la célula es de un mamífero, tal como un ser humano. En determinadas formas de realización, al ser humano se le ha diagnosticado una infección por virus de Hepatitis B/ una infección por virus de Hepatitis B. En determinadas formas de realización, el silenciamiento de la expresión del gen de la Hepatitis B reduce la carga de las

partículas virales del virus de la Hepatitis B y/o del de la hepatitis D en el mamífero en por lo menos aproximadamente 50% (*por ejemplo*, en aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%) referido a la carga de partículas de virus de Hepatitis B y/o de Hepatitis D en la ausencia de la partícula de ácido nucleico-lípido.

[00143] En determinadas formas de realización, la presente invención provee un método para silenciar la expresión del gen del virus de Hepatitis B en una célula, en donde el método comprende la etapa de poner en contacto una célula que comprende un gen expresado del virus de hepatitis B con una partícula de ácido nucleico-lípido o con una composición (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) descrita en la presente bajo condiciones en las que el ARNsi ingresa en la célula y silencia la expresión del gen del virus de la Hepatitis B dentro de la célula. En determinadas formas de realización, la célula se halla en un mamífero, tal como ser humano. En determinadas formas de realización, al ser humano sería diagnosticado una infección por virus de Hepatitis B/infección por virus de Hepatitis D. En determinadas formas de realización, al ser humano se la diagnosticado una enfermedad hepática causada por una infección por virus de Hepatitis B o una infección por virus de Hepatitis D. En determinadas formas de realización, el silenciamiento de la expresión del gen del virus de Hepatitis reduce la carga de las partículas virales del virus hepatitis B/ hepatitis D en el mamífero en por lo menos aproximadamente 50% (*por ejemplo*, a aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%) en comparación con la carga de partículas de virus de Hepatitis B y/o Hepatitis D en la ausencia de la partícula de ácido nucleico-lípido.

[00144] En algunas formas de realización, las partículas de ácido nucleico-lípido, o sus composiciones (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) descritas en la presente se administran por medio de una de las siguientes vías de administración: oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal e intradérmica. En formas de realización particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido se administran sistémicamente, *por ejemplo*, por vías de administración enteral o parenteral.

[00145] En determinados aspectos, en la presente invención se proveen métodos para silenciar la expresión del gen de HBV en un

mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que lo necesite, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende uno o más ARNsi descritos en la presente (*por ejemplo*, uno o más ARNsi mostrados en la Tabla A). En algunas formas de realización, la administración de las partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más ARNsi descritos en la presente reduce los niveles de ARN del HBV RNA en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (o cualquier intervalo entre estos valores) en comparación con los niveles de ARN del HBV detectados en la ausencia de los ARNsi (*por ejemplo*, un control por tampón o un control por ARNsi irrelevante que no apunte a HBV). En otras formas de realización, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más ARNsi que apunten al HBV reduce los niveles de ARN de HBV a por lo menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 días o más (o cualquier intervalo de estos valores) referido a un control negativo tal como *por ejemplo* un control por tampón o un control de ARNsi irrelevante que no apunte a HBV.

[00146] En otros aspectos, en la presente invención se proveen métodos para silenciar la expresión del gen de HBV en un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que lo necesite, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectivo de una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende uno o más ARNsi descritos en la presente (*por ejemplo*, ARNsi descritos en la Tabla A). En algunas formas de realización, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más ARNsi de HBV reduce los niveles de ARNm del HBV en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (o cualquier intervalo entre estos valores) en comparación con los niveles de ARNm del HBV detectados en la ausencia del ARNsi (*por ejemplo*, un control por tampón o un control por ARNsi irrelevante que no apunte al HBV). En otras formas de realización, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más ARNsi que apunten al HBV reduce los niveles

de ARNm del HBV el por lo menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 días o más (o cualquier intervalo entre estos valores) referido a un control negativo, tal como, *por ejemplo*, un control por tampón o un control por ARNsi irrelevante que no apunte al HBV.

[00147] En determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente destinadas a ser utilizadas en el silenciamiento de la expresión de un virus de hepatitis B en una célula en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

[00148] En determinadas formas de realización de la invención se provee la utilización de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente para preparar un medicamento para el silenciamiento de la expresión del gen del virus de hepatitis B en una célula en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

[00149] En otros aspectos, en la presente invención se proveen métodos para tratar, prevenir, reducir el riesgo o probabilidad de desarrollar (*por ejemplo*, para reducir la sensibilidad), retardar la presentación de, y/o para obtener una mejoría en uno o más síntomas asociados con la infección por HBV y/o HDV en un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que lo necesite, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectivo de una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente (*por ejemplo*, como se describe en la Tabla A) que apuntan a la expresión del gen de HBV. Los ejemplos de síntomas asociados con una infección por HBV y/o por HDV en un ser humano incluyen fiebre, dolor abdominal, orina oscura, dolor en las articulaciones, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, debilidad, fatiga y amarillamiento de la piel (ictericia).

[00150] En determinadas formas de realización de la invención se provee un método para tratar una infección por virus de hepatitis B y/o de hepatitis D en un mamífero, comprendiendo el método la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectivo de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente.

[00151] En determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido o a composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para ser utilizada en el tratamiento de una infección por virus de hepatitis B y/o de hepatitis en un mamífero (por ejemplo, en un ser humano).

[00152] En determinadas formas de realización de la invención se provee la utilización de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para preparar un medicamento para tratar un infección por virus de hepatitis B y/o de hepatitis en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

[00153] En determinadas formas de realización de la invención se provee un método para ocasionar una mejoría en uno o más síntomas asociados con la infección por virus de hepatitis B y/o por virus de hepatitis en un mamífero, comprendiendo el método la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente, que comprende una o más moléculas de ARNsi descritas en la presente (por ejemplo, como se describe en la Tabla A). En determinadas formas de realización, la partícula se administra por una vía sistémica. En determinadas formas de realización, el ARNsi de la partícula de ácido nucleico-lípido inhibe la expresión de un gen de virus de Hepatitis B en el mamífero. En determinadas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En determinadas formas de realización, el ser humano tiene una enfermedad hepática.

[00154] En determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente para su uso en la mejoría de uno o más síntomas asociados con una infección por virus de hepatitis B y/o de hepatitis en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

[00155] En determinadas formas de realización de la invención se provee la utilización de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descritas en la presente para preparar un medicamento para ocasionar una mejoría en uno o más síntomas asociados con una infección por virus de hepatitis B y/o de hepatitis en un mamífero (por ejemplo, en un ser humano).

[00156] En determinadas formas de realización de la presente

invención se provee un método para inhibir la replicación del HDV y/o para ocasionar una mejoría en uno o más síntomas de una infección por HDV en un mamífero (por ejemplo, en un ser humano), comprendiendo el método la etapa de administrar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descrita en la presente al mamífero, en donde la administración de la partícula de ácido nucleico-lípido o composición al mamífero inhibe la síntesis del antígeno de superficie del HBV.

[00157] En determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descrita en la presente para ser utilizada en la inhibición de la replicación del HDV y/o para ocasionar una mejoría en uno o más síntomas de una infección por HDV en un mamífero (por ejemplo, en un ser humano), en donde la partícula de ácido nucleico-lípido o composición inhibe la síntesis del antígeno de superficie del HBV.

[00158] En determinadas formas de realización de la invención se provee la utilización de una partícula de ácido nucleico-lípido o de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descrita en la presente para preparar un medicamento para inhibir la replicación del HDV y/o para ocasionar una mejoría en uno o más síntomas de una infección por HDV en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), en donde la partícula de ácido nucleico-lípido o composición inhibe la síntesis del antígeno de superficie del HBV.

[00159] En determinadas formas de realización de la invención se provee una partícula de ácido nucleico-lípido o a composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) descrita en la presente para ser utilizada en terapia médica.

[00160] En otros aspectos, la presente invención provee un método para desactivar el HBV y/o el HDV en un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que lo necesite (*por ejemplo*, un ser humano que sufre de una infección por HBV o de una infección por HBV/HDV), comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende uno o más ARNsi descritos en la presente que apuntan a la expresión del gen de HBV. En algunas formas de realización, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más ARNsi que apunten al HBV reduce, disminuye y decrementa los niveles de proteína de HBV (*por*

ejemplo, la proteína del antígeno de superficie del HBV) en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (o cualquier intervalo entre estos valores) en comparación con los niveles de la proteína de HBV detectados en la ausencia del ARNsi (*por ejemplo*, un control por tampón o un control por ARNsi irrelevante que no apunte al HBV).

[00161] A título de *ejemplo*, el ARNm del HBV puede medirse mediante un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene®; Affymetrix). El ensayo de ADN ramificado es un método de hibridación de ácido nucleico a sándwich que utiliza moléculas de ADNb para amplificar las señales recibidas procedentes del ARN objetivo capturado.

[00162] Además de su utilidad para silenciar la expresión de cualquier de los genes de HBV para fines terapéuticos, los ARNsi descrito en la presente también son útiles en aplicaciones de investigación y desarrollo como también para fines de diagnóstico, profilaxis, pronóstico, clínico, y otras aplicaciones en la salud. Como *ejemplo* no limitante, los ARNsi pueden utilizarse en estudios de validación de objetivos para comprobar si un miembro específico de la familia de genes de HBV tiene el potencial de ser un agente terapéutico.

Generación de moléculas de ARNsi

[00163] Los ARNsi pueden ser provistos en varias formas que incluyen, *por ejemplo*, en forma de uno o más duplexes de ARNsi aislados de interferencia pequeña ARNsi), como ARN más largos de cadena doble (ARNds), o como ARNsi o ARNds transcrito desde un casete transcripcional en un plásmido de ADN. En algunas formas de realización, los ARNsi pueden producirse enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total, y es posible introducir ribonucleótidos modificados mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. En algunos casos, cada cadena se prepara químicamente. En la técnica se conocen métodos para la sintetización de moléculas de ARN, *por ejemplo*, los métodos de síntesis química descritos en Verma and Eckstein (1998) o descritos en la presente.

[00164] En la técnica son bien conocidos los métodos para aislar ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, preparar y seleccionar bibliotecas de ADNc, y para llevar a cabo PCR. (*ver, por ejemplo*, Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*), como también los

métodos para llevar a cabo los PCR (véase las patentes de EE.UU. Nos. 4,683,195 y 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son muy conocidas para las personas expertas en la especialidad. Los textos básicos adicionales que divulgan métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994). Las divulgaciones de estas referencias se incorporan en la presente en su totalidad como referencias, para cualquier finalidad.

[00165] Es preferible que los ARNsi sean sintetizados químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNsi de la invención puede ser sintetizados mediante cualquiera de entre una variedad de técnicas conocidas en la especialidad, tal como las divulgadas en Usman e al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). La síntesis de los oligonucleótidos utiliza los grupos comunes que protegen y acoplan los ácidos nucleicos, tales el dimetoxitritilo en el extremo -5' y las fosfoamiditas en el extremo -3'. A título de ejemplo no limitante, es posible llevar a cabo síntesis en pequeña escala en un sintetizador utilizando un protocolo de escala de 0,2 μ mol. Como alternativa, es posible llevar a cabo síntesis en la escala de 0,2 μ mol en un sintetizador de placas de 96 cavidades de Protogene (Palo Alto, CA). Sin embargo, una escala de síntesis en una escala más grande o más pequeña también se halla dentro de los alcances de esta invención. Los reactivos adecuados para la síntesis de los oligonucleótidos, métodos para la desprotección del ARN, para la purificación del ARN, son conocidos de las personas con pericia en la especialidad.

[00166] Las moléculas de ARNsi pueden ser ensambladas a partir de dos oligonucleótidos distintos, en donde uno de los oligonucleótidos comprende la cadena de sentido, y el otro comprende la cadena antisentido del ARNsi. Por ejemplo, cada cadena puede ser sintetizada por separado, y se los ensambla entre sí mediante hibridación o ligación después de síntesis y/o desprotección.

Sistemas portadores que contienen ácidos nucleicos terapéuticos

A. Partículas de lípidos

[00167] En determinados aspectos, la presente invención provee partículas de lípido que comprenden una o más moléculas de ARNsi (*por ejemplo*, una o más moléculas de ARNsi descritas en la Tabla A) y uno o más (amino) lípidos o sus sales. En algunas formas de realización, las partículas de lípido de la invención comprenden además uno o más lípidos no catiónicos. En otras formas de realización, las partículas de lípido comprenden además uno o más lípidos conjugados con la capacidad de reducir o inhibir la agregación de las partículas.

[00168] Es preferible que las partículas de la invención comprendan uno o más ARNsi (*por ejemplo*, moléculas de ARNsi descritas en la Tabla A), un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas. En algunas formas de realización, la molécula de ARNsi está completamente encapsulada dentro de la porción lipídica de la partícula de lípido por lo que la molécula de ARNsi presente en dentro de la partícula de lípido, en solución acuosa, tiene una resistencia a su degradación de la nucleasa. En otras formas de realización, las partículas de lípido descritas en la presente son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos, tal como los seres humanos. Típicamente, las partículas de lípido de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm. En determinadas formas de realización, las partículas de lípido de la invención tienen un diámetro mediano de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm. Típicamente, las partículas de lípido de la invención tienen también una relación lípido: ácido nucleico (*por ejemplo*, una relación lípido:ARNsi) (relación entre masas) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 100:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 20:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1. En determinadas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación de masas lípido:ARNsi de

aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1.

[00169] En formas de realización preferidas, las partículas de lípido de la invención son partículas de ácido nucleico-lípido, estables en el suero, que comprenden una o más moléculas de ARNsi (*por ejemplo*, una molécula de ARNsi como se describe en la Tabla A), un lípido catiónico (*por ejemplo*, uno o más lípidos catiónicos de las Fórmulas I-III o sus sales como se indica en la presente), una molécula de ARNsi (*por ejemplo*, mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol), y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (*por ejemplo*, uno o más Conjugados de PEG-lípido). La partícula de lípido puede comprender por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas de ARNsi (*por ejemplo*, moléculas de ASRs si descritas en la Tabla A) que apuntan a uno o más de los genes descritos en la presente. Las partículas de ácido nucleico-lípido y el método para su preparación se describen en, *por ejemplo*, las Patentes de EE.UU. Nos. 5,753,613; 5,785,992; 5,705,385; 5,976,567; 5,981,501; 6,110,745; y 6,320,017; y en la Publicación de PCT No. WO 96/40964, incorporados en la presente en su totalidad como referencia.

[00170] En las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención, la una o más moléculas de ARNsi (*por ejemplo*, un molécula de ARNsi como se describe en la Tabla A) pueden estar completamente envueltas de la partícula, con lo que se protegen los ARNsi contra su degradación por la nucleasa. En algunos casos, el ARNsi presente en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de la exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante por lo menos aproximadamente 20, 30, 45, o 60 minutos. En otros casos determinados, el ARNsi presente en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de la incubación de la partícula en suero a 37 °C durante por lo menos aproximadamente 30, 45, o 60 minutos o de por lo menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, o 36 horas. En otras formas de realización, el ARNsi forma un complejo con la porción lipídica de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones de la presente invención es que las composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido carecen sustancialmente de toxicidad para los mamíferos, tales como los seres humanos.

[00171] La expresión "completamente encapsulado" indica que el ARNsi (*por ejemplo*, una molécula de ARNsi como se describe en la

Tabla A) en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada de manera significativa después de su exposición en un ensayo con nucleasa degradaría de manera significativa el ADN o ARN libres. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente menos de aproximadamente el 25% del ARNsi se degradaría en un tratamiento que normalmente degradaría el 100% del ARNsi libre, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, y más preferentemente aun, menos de aproximadamente el 5% del ARNsi presente en la partícula se degrada. La expresión "completamente encapsulado" también indica que las partículas de ácido nucleico-lípido son estables en el suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes al ser administrados *in vivo*.

[00172] En el contexto de los ácidos nucleicos, es posible determinar la encapsulación completa llevando a cabo un ensayo de exclusión de tinte fluorescente por membrana impermeable, que utiliza un tinte que tiene una fluorescencia reforzada con ácido nucleico. Los tintes específicos tales como OliGreen® y RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) están disponibles para la determinación cuantitativa de ADN de plásmido, deoxiribonucleótidos de una sola cadena, o ribonucleótidos de doble cadena. Se determina la encapsulación mediante la adición de tinte a una formulación liposomal, midiéndose la fluorescencia resultante, y comparándola con la fluorescencia observada cuando se añade una pequeña cantidad de detergente no iónico. La disrupción, mediada por el detergente, libera el ácido nucleico, permitiéndole interactúa con el tinte de la membrana impermeable. La encapsulación del ácido nucleico puede calcularse como $E = (I_0 - I)/I_0$, donde I e I_0 se refieren a las intensidades de la fluorescencias antes y después de la adición del detergente (véase, Wheeler et al., *Gene Ther.*, 6:271-281 (1999)).

[00173] En otras formas de realización, la presente invención provee una composición de partículas de ácido nucleico-lípido composición que comprende una pluralidad de partículas de ácido nucleico-lípido.

[00174] En algunos casos, la composición de partículas de ácido nucleico-lípido composición comprende una molécula que está completamente encapsulada dentro de la porción lipídica de la partículas, de manera tal que de aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, de

aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) de las partículas tienen la molécula de ARNsi incorporada en ellas.

[00175] En otros casos, la composición de partículas de ácido nucleico-lípido composición comprende ARNsi que está completamente encapsulado dentro de la porción lipídica de la partículas, de manera tal que de aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del ANRsi

ingresado está encapsulado en las partículas.

[00176] En función de la utilización final prevista para las partículas de lípido de la invención, es posible variar las proporciones de los componentes por medio de la que es posible medir la eficiencia de entrega de una formulación en particular, utilizándose, *por ejemplo*, un parámetro de liberación endosomal (ensayo de ERP).

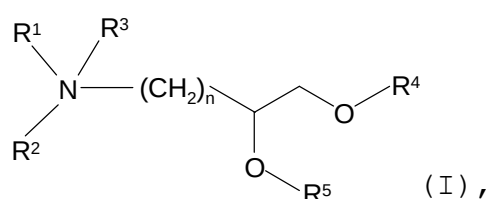
1. Lípidos catiónicos

[00177] Cualquiera de entre una variedad de lípidos catiónicos o de sus sales puede ser utilizado en las partículas de lípido de la presente invención sea solo sea en combinación con una o más especies de lípidos catiónicos o una molécula de especie de ARNsi. Los lípidos catiónicos incluyen sus enantiómeros (R) y/o (S).

[00178] En un aspecto de la invención, el lípido catiónico es un lípido dialquilico. Por ejemplo, los lípidos dialquílicos pueden incluir lípidos que comprenden dos cadenas alquilo saturadas o insaturadas, en donde cada una de las cadenas alquilo puede estar saturada o insaturada. En determinadas formas de realización, cada una de las dos cadenas alquilo comprende por lo menos, 8 átomos de carbono, 10 átomos de carbono, 12 átomos de carbono, 14 átomos de carbono, 16 átomos de carbono, 18 átomos de carbono, 20 átomos de carbono, 22 átomos de carbono o 24 átomos de carbono.

[00179] En un aspecto de la invención, el lípido catiónico es un lípido trialquilo. Por ejemplo, los lípidos trialquilo pueden incluir lípidos que comprenden tres cadenas saturadas o insaturadas, en donde cada uno de las cadenas alquilo puede estar saturada o insaturada. En determinadas formas de realización, cada una de las tres cadenas alquilo comprende por lo menos, por ejemplo, 8 átomos de carbono, 10 átomos de carbono, 12 átomos de carbono, 14 átomos de carbono, 16 átomos de carbono, 18 átomos de carbono, 20 átomos de carbono, 22 átomos de carbono o 24 átomos de carbono.

[00180] En un aspecto, los lípidos catiónicos de la Fórmula I que tiene la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



[00181] o sus sales, en donde:

[00182] R^1 y R^2 son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí hidrógeno (H) o un alquilo- C_1-C_6 opcionalmente sustituido, C_2-C_6 alquenoilo, o C_2-C_6 alquinoilo, o R^1 y R^2 pueden conjuntamente formar un anillo heterociclo opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos seleccionados del grupo consistente en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de ellos;

[00183] R^3 o se halla ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo- C_1-C_6 de manera de proveer una amina cuaternaria;

[00184] R^4 y R^5 son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí alquilo $C_{10}-C_{24}$ alquilo opcionalmente sustituido, C_0-C_{24} alquenoilo, $C_{10}-C_{24}$ alquinoilo, o $C_{10}-C_{24}$ acilo, en donde por lo menos uno de R^4 y R^5 comprende por lo menos dos sitios de insaturación; y

[00185] n es 0, 1, 2, 3, o 4.

[00186] En algunas formas de realización, R^1 y R^2 son independientemente entre sí un alquilo- C_1-C_4 opcionalmente sustituido, C_2-C_4 alquenoilo, o C_2-C_4 alquinoilo. En una forma de realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otras formas de realización preferidas, n es 1 ó 2. En otras formas de realización, R^3 está ausente cuando el pH es superior a pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH es inferior a pK_a del lípido catiónico de manera tal que el grupo cabecera amino está protonado. En una forma de realización alternativa, R^3 es un alquilo- C_1-C_4 opcionalmente sustituido de manera de proveer una amina cuaternaria. En otras formas de realización, R^4 y R^5 son independientemente entre sí un $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ alquilo opcionalmente sustituido, $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ alquenoilo, $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ alquinoilo, o $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ acilo, en donde por lo menos uno de los R^4 y R^5 comprende por lo menos dos sitios de insaturación.

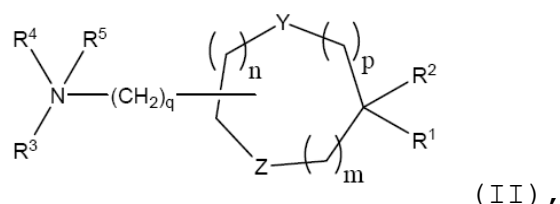
[00187] En determinadas formas de realización, R^4 y R^5 son independientemente entre sí del grupo consistente en una parte dodecadienilo, una parte tetradecadienilo, una parte hexadecadienilo, una parte octadecadienilo, una parte, icosadienilo, una parte dodecatrienilo, una parte tetradecatrienilo, una parte hexadecatrienilo, una parte octadecatrienilo, una parte icosatrienilo, una parte araquidonilo, y una parte docosaheptaenoilo como también sus derivados acilo (por ejemplo, linoleoilo, linolenoilo, y linolenoilo, etc.). En algunos casos, uno de R^4 y R^5 comprende un grupo alquilo ramificado (por ejemplo, una parte fitanilo) o uno

de sus derivados acilo (*por ejemplo*, una parte fitanoilo). En algunos casos, la parte octadecadienilo es una parte linoleilo. En otros casos determinados, la parte octadecatrienilo es una parte linolenilo o una parte γ -linolenilo. En determinadas formas de realización, R^4 y R^5 son ambas partes linoleilo, partes linolenilo, o partes γ -linolenilo. En formas de realización particulares, el lípido catiónico de la Fórmula I es 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-dilinoleiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDMA), 1,2-dilinoleoiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDAP), o mezclas de ellos.

[00188] En algunas formas de realización, el lípido catiónico de la Fórmula I forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o varios aniones. En una forma de realización particular, el lípido catiónico de la Fórmula I es su sal oxalato (*por ejemplo*, hemioxalato), que es preferentemente una sal cristalina.

[00189] La síntesis de los lípidos catiónicos tales como DLinDMA y DLenDMA, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación de Patentes US N° 20060083780, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. La síntesis de los lípidos catiónicos tales como C2-DLinDMA y C2-DLinDAP, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° WO2011/000106 cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00190] En otro aspecto, los lípidos catiónicos de la Fórmula II que tienen la siguiente estructura (o sus sales) son útiles en la presente invención:



[00191] en donde R^1 y R^2 son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí un C_{12} - C_{24} alquilo opcionalmente sustituido, C_{12} - C_{24} alquenilo, C_{12} - C_{24} alquinilo, o C_{12} - C_{24} acilo; R^3 y R^4 son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí un C_1 - C_6 alquilo opcionalmente sustituido, C_2 - C_6 alquenilo, o C_2 - C_6 alquinilo, o R^3 y R^4 pueden conjuntamente formar un anillo heterociclo opcionalmente sustituido de 4 a 6

átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno y oxígeno; R⁵ o se halla ausente o es hidrógeno (H) o a C₁-C₆ alquilo de manera de proveer una amina cuaternaria; m, n, y p son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí sea 0, 1, o 2, con la condición que m, n, y p no sean al mismo tiempo 0; q es 0, 1, 2, 3, o 4; y Y y Z son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí O, S, o NH. En una forma de realización preferida, q es 2.

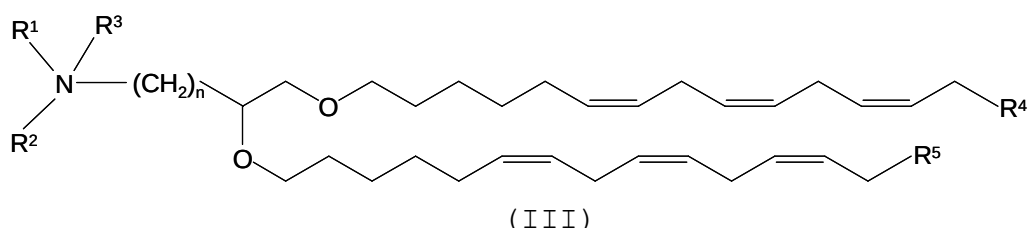
[00192] En algunas formas de realización, el lípido catiónico de la Fórmula II es 2,2-dilinoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" o "C2K"), 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-dilinoil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-dilinoil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dioleoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DO-K-DMA), 2,2-distearoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DS-K-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-morfolino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MA), 2,2-dilinoil-4-trimetilamino-[1,3]-dioxolano cloruro (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-dilinoil-4,5-bis(dimetilaminometil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K²-DMA), 2,2-dilinoil-4-metilpiperzin-[1,3]-dioxolano (D-Lin-K-N-metilpiperzina), o mezclas de ellos. En formas de realización preferidas, el lípido catiónico de la Fórmula II es DLin-K-C2-DMA.

[00193] En algunas formas de realización, el lípido catiónico de la Fórmula II forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o varios aniones. En una forma de realización particular, el lípido catiónico de la Fórmula II es su sal oxalato (*por ejemplo*, hemioxalato), que es preferentemente una sal cristalina.

[00194] La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-K-DMA, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT No. WO 09/086558, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K²-DMA, y D-Lin-K-N-metilpiperzina, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Solicitud PCT No. PCT/US2009/060251, titulada "Amino Lípidos Mejorados y Métodos para la entrega de Ácidos Nucleicos," presentada el 9 de octubre

de 2009, cuya revelación se incluye en su totalidad en la presente como referencia para toda finalidad.

[00195] En otro aspecto, los lípidos catiónicos de la Fórmula III que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



[00196] o sus sales, en donde: R^1 y R^2 son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí un alquilo-C₁-C₆ opcionalmente sustituido, C₂-C₆ alquenilo, o C₂-C₆ alquinilo, o R^1 y R^2 pueden conjuntamente formar un anillo heterociclo opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos seleccionados del grupo consistente en nitrógeno (N), oxígeno (O), y sus mezclas; R^3 o se halla ausente o es hidrógeno (H) o un C₁-C₆ alquilo de manera de proveer una amina cuaternaria; R^4 y R^5 o se hallan ausentes o presentes y cuando están presentes son iguales o distintos entre sí y son independientemente entre sí un alquilo-C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido o C₂-C₁₀ alquenilo; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

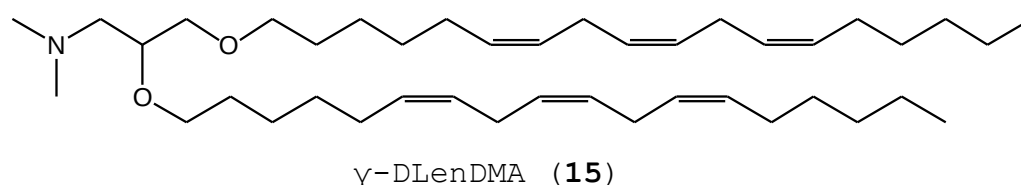
[00197] En algunas formas de realización, R^1 y R^2 are independientemente entre sí un alquilo-C₁-C₄ opcionalmente sustituido, C₂-C₄ alquenilo, o C₂-C₄ alquinilo. En una forma de realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra forma de realización preferida, R^4 y R^5 son ambos grupos butilo. Y en otra forma de realización más, n es 1. En otras formas de realización, R^3 está ausente cuando el pH es superior al pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH es inferior al pK_a del lípido catiónico de manera tal que el grupo cabecera amino está protonado. En una forma de realización alternativa, R^3 es un C₁-C₄ alquilo opcionalmente sustituido de manera de proveer una amina cuaternaria. En otras formas de realización, R^4 y R^5 son independientemente entre sí un C₂-C₆ o C₂-C₄ alquilo opcionalmente sustituido o C₂-C₆ o C₂-C₄ alquenilo.

[00198] En una forma de realización alternativa, el lípido catiónico de la Fórmula III comprende enlaces éster entre el grupo cabecera amino y uno de las cadenas alquilo o ambas cadenas alquilo. En algunas formas de realización, el lípido catiónico de la Fórmula III forma una sal (preferentemente una sal cristalina)

con uno o más aniones. En una forma de realización particular, el lípido catiónico de la Fórmula III es su sal oxalato (por ejemplo, hemioxalato), que es preferentemente una sal cristalina.

[00199] Si bien cada uno de las cadenas alquilo en la Fórmula III contiene enlaces dobles *cis* en las posiciones 6, 9, y 12 (es decir, *cis,cis,cis*- $\Delta^6,\Delta^9,\Delta^{12}$), en una forma de realización alternativa, uno, dos o tres de estos dobles enlaces en uno o ambas cadenas alquilo puede estar en la configuración *trans*.

[00200] En una forma de realización particularmente preferida, el lípido catiónico de la Fórmula III tiene la siguiente estructura:



[00201] La síntesis de lípidos catiónicos tales como γ -DLenDMA (15), como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Solicitud Provisoria U.S. No. 61/222,462, titulada "Lípidos Catiónicos Mejorados y Métodos para la Entrega de Ácidos Nucleicos," presentada el 1 de julio de 2009, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00202] La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-M-C3-DMA ("MC3"), como también de lípidos catiónicos adicionales (por ejemplo, determinados análogos de MC3), se describe en la Solución Provisoria U.S. No. 61/185,800, titulada "Lípidos Novedosos y Composiciones para la entrega de terapéuticos," presentada el 10 de junio de 2009, y en la Solicitud Provisoria U.S. No. 61/287,995, titulada "Métodos y Composiciones para la entrega de Ácidos Nucleicos," presentada el 18 de diciembre de 2009, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00203] Los ejemplos de otros lípidos catiónicos o de sus sales que pueden estar incluidas en las partículas de lípido de la presente invención incluyen, sin limitación, lípidos catiónicos tales como los descritos en el documento WO2011/000106, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad, como también lípidos catiónicos tales como N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio cloruro (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-disteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-

trimetilamonio cloruro (DOTMA), N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio bromuro (DDAB), N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio cloruro (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio bromuro (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoracetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimeti-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibenzilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoleioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoleioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoleiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano sal cloruro (DLin-TMA.Cl), 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano sal cloruro (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanedio (DOAP), 1,2-dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-dioeilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DO-C-DAP), 1,2-dimiristoleoil-3-dimetilaminopropano (DMDAP), 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano cloruro (DOTAP.Cl), dilinoleilmetil-3-dimetilaminopropionato (DLin-M-C2-DMA; también conocido como DLin-M-K-DMA o DLin-M-DMA), y mezclas de ellos. Lípidos catiónicos adicionales o sus sales que pueden estar incluidos en las partículas de lípido de la presente invención se describen en la Publicación de Patentes No. 20090023673, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00204] La síntesis de lípidos catiónicos tales como CLinDMA, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20060240554, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA,

DLin-2-DMAP, DLinTMA.Cl, DLinTAP.Cl, DLinMPZ, DLinAP, DOAP, y DLin-EG-DMA, como tambien de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT No. WO 09/086558, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. La síntesis de lípidos catiónicos tales como DO-C-DAP, DMDAP, DOTAP.Cl, DLin-M-C2-DMA, como también de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Solicitud de PCT No. PCT/US2009/060251, titulada "Lípidos Amino Mejorados y Métodos para la entrega de Ácidos Nucleicos," presentada el 9 de octubre de 2009, cuya revelación se incluye en su totalidad en la presente como referencia en la presente para toda finalidad. La síntesis de una cantidad de otros lípidos y de análogos relacionados ha sido descrita en Las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; y 5,785,992; y en la Publicación de PCT No. WO 96/10390, las revelaciones de cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para cualquier finalidad. Adicionalmente, es posible utilizar una cantidad de preparados comerciales de lípidos, tales como, *por ejemplo*, LIPOFECTIN[®] (lo que incluye DOTMA y DOPE, comercializado por Invitrogen); LIPOFECTAMINE[®] (lo que incluye DOSPA y DOPE, comercializado por Invitrogen); y TRANSFECTAM[®] (lo que incluye DOGS, comercializado por Promega Corp.).

[00205] En algunas formas de realización, el lípido catiónico comprende de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 90 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 85 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 80 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 75 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 70 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 65 % mol, de aproximadamente 50 % mol a aproximadamente 60 % mol, de aproximadamente 55 % mol a aproximadamente 65 % mol, o de aproximadamente 55 % mol a aproximadamente 70 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula. En formas de realización particulares, el lípido catiónico comprende aproximadamente 50 % mol, 51 % mol, 52 % mol, 53 % mol, 54 % mol, 55 % mol, 56 % mol, 57 % mol, 58 % mol, 59 % mol, 60 % mol, 61 % mol, 62 % mol, 63 % mol, 64 % mol, o 65 % mol (o cualquiera de sus fracciones) del lípido total presente en la partícula.

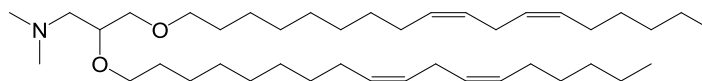
[00206] En otras formas de realización, el lípido catiónico

comprende de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 60 % mol, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 50 % mol, de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 50 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 50 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 40 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

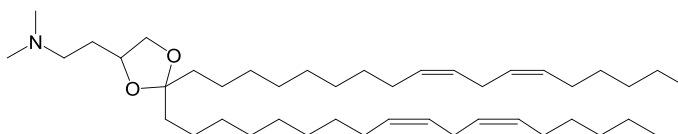
[00207] Porcentajes e intervalos adicionales de lípidos adecuados para su utilización en las partículas de lípido de la presente invención se describen en la Publicación de PCT No. WO 09/127060, la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0071208, la Publicación de PCT No. WO2011/000106, y la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0076335, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00208] Debe entenderse que el porcentaje de lípido catiónico presente en las partículas de lípido de la invención es una cantidad teórica, y que la cantidad real de lípido catiónico presente en la formulación puede variar en, por ejemplo, ± 5 % mol. Por ejemplo, en una formulación de lípido dada a título de ejemplo, la cantidad teórica de lípido catiónico es de 57,1 % mol, pero la cantidad real de lípido catiónico puede ser de ± 5 % mol, ± 4 % mol, ± 3 % mol, ± 2 % mol, ± 1 % mol, $\pm 0,75$ % mol, $\pm 0,5$ % mol, $\pm 0,25$ % mol, o $\pm 0,1$ % mol de dicha cantidad teórica, consistiendo el resto de la formulación en otros componentes lípido (con lo que se completa el 100 % mol de lípidos totales en la partícula; sin embargo, un experto en el arte comprenderá que el % mol total puede desviarse ligeramente del 100% debido al redondeo, por ejemplo, 99,9 % mol o 100,1 % mol.).

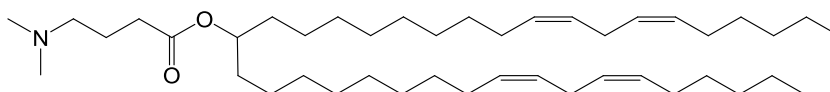
Seguidamente se muestran otros ejemplos de lípidos catiónicos útiles para ser incluidos en la presente invención:



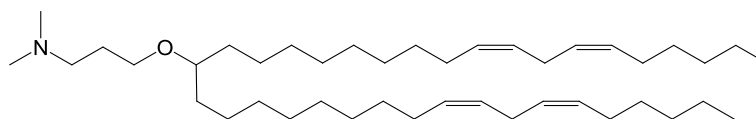
N,N-dimetil-2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-amina **(5)**



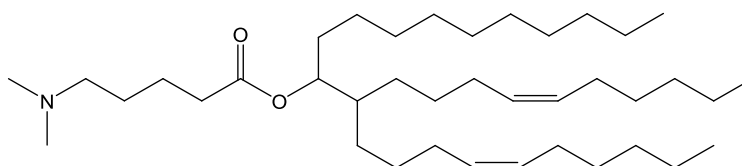
2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)-1,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina (6)



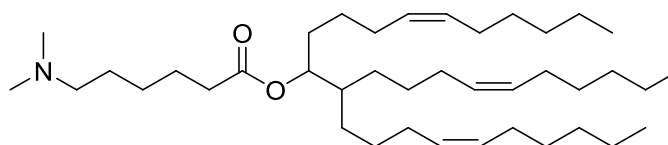
(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il (dimetilamino)butanoato (7) 4-



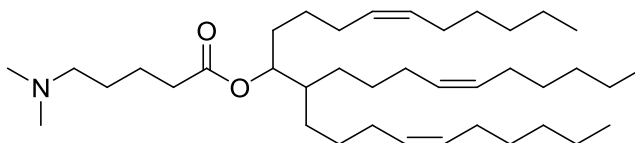
3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (8)



(Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docos-16-en-11-il (dimetilamino)pentanoato (53) 5-

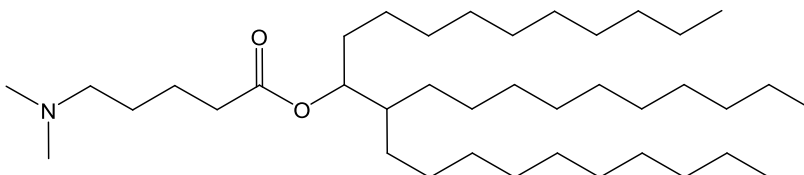


(6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-il (dimetilamino)hexanoato (11) 6-



(6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil) docosa-6,16-dien-11-il
(dimetilamino)pentanoato (**13**)

5-



12-decildocosan-11-il 5-(dimetilamino)pentanoato (**14**).

1. Lípidos no catiónicos

[00209] Los lípidos no catiónicos utilizados en las partículas de lípido de la invención pueden ser cualquiera de una variedad de lípidos neutros, sin carga, zwitteriónicos o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

[00210] Los ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamamina, fosfatidilseramina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomiyelina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrosidas, dicetilfosfato, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleiol-fosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), distearoil-

fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamamina, dimetil-fosfatidiletanolamamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolamina, dilinoleoilfosfatidilcolamina, y mezclas de ellos. También pueden utilizarse otros fosfolípidos diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferentemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C₁₀-C₂₄, *por ejemplo*, lauroílo, miristoílo, palmitoílo, estearoílo, o oleoílo.

[00211] Los ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen los esteroides tales como el colesterol y sus derivados. Los ejemplos no limitantes de derivados de colesterol incluyen los análogos polares tales como 5 α -colestanol, 5 β -coprostanol, colesteryl-(2'-hidroxi)-etil éter, colesteryl-(4'-hidroxi)-butil éter, y 6-cetocolestanol; análogos no polares tales como 5 α -colestano, colesteno, 5 α -colestano, 5 β -colestano, y colesteryl decanoato; y mezclas de ellos. En formas de realización preferidas, el derivado de colesterol es un análogo polar tal como colesteryl-(4'-hidroxi)-butil éter. La síntesis del colesteryl-(2'-hidroxi)-etil éter se describe en la Publicación de PCT No. WO 09/127060, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00212] En algunas formas de realización, la molécula de ARNsi presente en las partículas de lípido comprende, o consiste en, una mezcla de dos o fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste. En otras formas de realización, la molécula de ARNsi presente en las partículas de lípido comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, *por ejemplo*, a una formulación de partículas de lípido libre de colesterol. Y en otras formas de realización, la molécula de ARNsi presente en las partículas de lípido comprende o consiste en colesterol o un derivado de éste, *por ejemplo*, una formulación de partículas de lípido libre de fosfolípido.

[00213] Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para ser utilizados en la presente invención incluyen lípidos que no contienen fósforo tales como, *por ejemplo*, estearilamamina, dodecilamamina, hexadecilamamina, acetil palmitato, glicerolricinoleato, hexadecil estereato, isopropil miristato, polímeros acrílicos anfóteros, trietanolamina-lauril sulfato, alquil-aril sulfato amidas de ácidos grasos polietiloxilados,

dioctadecildimetil amonio bromuro, ceramida, esfingomielina, y similares.

[00214] En algunas formas de realización, la molécula de ARNsi comprende de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 60 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 55 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 50 % mol, de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 50 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 35 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 37 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 35 % mol, 36 % mol, 37 % mol, 38 % mol, 39 % mol, 40 % mol, 41 % mol, 42 % mol, 43 % mol, 44 % mol, o 45 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00215] En formas de realización en las que las partículas de lípido contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente 40 % mol, 45 % mol, 50 % mol, 55 % mol, o 60 % mol del lípido total presente en la partícula.

[00216] En algunas formas de realización, el componente fosfolípido presente en la mezcla puede comprender de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 20 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 15 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 12 % mol, de aproximadamente 4 % mol a aproximadamente 15 % mol, o de aproximadamente 4 % mol a aproximadamente 10 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula. En determinadas forma de realización, el componente fosfolípido presente en la mezcla comprende de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 17 % mol, de aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 17 % mol, de aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 15 % mol, de aproximadamente 8 % mol a aproximadamente 15 % mol, de aproximadamente 8 % mol, 9 % mol, 10 % mol, 11 % mol, 12 % mol, 13 % mol, 14 % mol, o 15 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una formulación de partículas de lípido que comprende una mezcla de

fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a razón de aproximadamente 7 % mol (o cualquiera de sus fracciones), *por ejemplo*, en una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol a aproximadamente 34 % mol (o cualquiera de sus fracciones) del lípido total presente en la partícula. Como otro ejemplo no limitante, una formulación de partículas de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a aproximadamente 7 % mol (o cualquiera de sus fracciones), *por ejemplo*, en una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol a aproximadamente 32 % mol (o cualquiera de sus fracciones) del lípido total presente en la partícula.

[00217] Como otro ejemplo, una formulación de lípido útil en la práctica de la invención tiene una relación entre lípido y fármaco (*por ejemplo*, ARNsi) de aproximadamente 10:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 9,5:1 a 11:1, o de 9,9:1 a 11:1, o de 10:1 a 10,9:1). En determinadas otras formas de realización, una formulación de lípido útil en la práctica de la invención tiene una relación entre lípido y fármaco (*por ejemplo*, ARNsi) de aproximadamente 9:1 (*por ejemplo*, una relación lípido:fármaco de 8,5:1 a 10:1, o de 8,9:1 a 10:1, o de 9:1 a 9,9:1, lo que incluye 9,1:1, 9,2:1, 9,3:1, 9,4:1, 9,5:1, 9,6:1, 9,7:1, y 9,8:1).

[00218] En otras formas de realización, el componente colesterol presente en la mezcla puede comprender de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 27 % mol a aproximadamente 37 % mol, de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 30 % mol, o de aproximadamente 35 % mol a aproximadamente 40 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula. En determinadas formas de realización preferidas, el componente colesterol presente en la mezcla comprende de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 35 % mol, de aproximadamente 27 % mol a aproximadamente 35 % mol, de aproximadamente 29 % mol a aproximadamente 35 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 35 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 34 % mol, de aproximadamente 31 % mol a aproximadamente 33 % mol, de aproximadamente 30 % mol, 31 % mol,

32 % mol, 33 % mol, 34 % mol, o 35 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00219] En formas de realización las partículas de lípido están libres de colesterol, y el colesterol o su derivado puede comprender hasta aproximadamente 25 % mol, 30 % mol, 35 % mol, 40 % mol, 45 % mol, 50 % mol, 55 % mol, o 60 % mol del lípido total presente en la partícula.

[00220] En algunas formas de realización, el colesterol o su derivado en la formulación de partículas de lípido libre de fosfolípido puede comprender de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 25 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 31 % mol a aproximadamente 39 % mol, de aproximadamente 32 % mol a aproximadamente 38 % mol, de aproximadamente 33 % mol a aproximadamente 37 % mol, de aproximadamente 35 % mol a aproximadamente 45 % mol, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 35 % mol, de aproximadamente 35 % mol a aproximadamente 40 % mol, de aproximadamente 30 % mol, 31 % mol, 32 % mol, 33 % mol, 34 % mol, 35 % mol, 36 % mol, 37 % mol, 38 % mol, 39 % mol, o 40 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una formulación de partículas de lípido puede comprender colesterol a aproximadamente 37 % mol (o cualquiera de sus fracciones) del lípido total presente en la partícula. Como otro ejemplo no limitante, una formulación de partículas de lípido puede comprender colesterol a aproximadamente 35 % mol (o cualquiera de sus fracciones) del lípido total presente en la partícula.

[00221] En otras formas de realización, la molécula de ARNsi comprende de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 90 % mol, de aproximadamente 10 % mol a aproximadamente 85 % mol, de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 80 % mol, aproximadamente 10 % mol (*por ejemplo*, fosfolípido solamente), de aproximadamente 60 % mol (*por ejemplo*, de fosfolípido y colesterol o derivado de éste) (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00222] Porcentajes e intervalos adicionales de lípidos no catiónicos adecuados para ser utilizados en las partículas de

lípidos de la presente invención se describen en la Publicación de PCT No. WO 09/127060, la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0071208, la Publicación de PCT No. WO2011/000106, y la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0076335, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00223] Debe entenderse que el porcentaje de una molécula de ARNsi presente en las partículas de lípidos de la invención es una cantidad teórica, y la cantidad real de una molécula de ARNsi presente en la formulación puede variar en, por ejemplo, $\pm 5\%$ mol, $\pm 4\%$ mol, $\pm 3\%$ mol, $\pm 2\%$ mol, $\pm 1\%$ mol, $\pm 0,75\%$ mol, $\pm 0,5\%$ mol, $\pm 0,25\%$ mol, o $\pm 0,1\%$ mol.

2. Conjugados de lípidos

[00224] Además de los lípidos catiónicos y de los lípidos no catiónicos, las partículas de lípidos de la invención pueden además comprender un conjugado de lípidos. El conjugado de lípidos es por cuanto impide la agregación de las partículas. Los conjugados de lípidos adecuados incluyen, sin limitación, conjugados de PEG-lípido, conjugados de POZ-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de catiónico-polímero-lípido (CPLs), y mezclas de ellos. En determinadas formas de realización, las partículas comprende sea un conjugado de PEG-lípido sea un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

[00225] En una forma de realización preferida, el conjugado de lípidos es un PEG-lípido. Los ejemplos de PEG-lípido incluyen, sin limitación, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (PEG-DAA) descritos en, por ejemplo, la Publicación de PCT No. WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) descrito en, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos Nos. 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado a ceramidas descrito, en, por ejemplo, la Patente US N° No. 5,885,613, PEG conjugado a colesterol o un derivado de éste, y mezclas de ellos. Las divulgaciones de esos documentos patente se incorporan en la presente en su totalidad para cualquier finalidad.

[00226] Los PEG-lípido adicionales adecuados para ser utilizados en la invención incluyen, sin limitación, mPEG2000-1,2-di-O-alkil-sn3-carbomoylglicérido (PEG-C-DOMG). La síntesis del PEG-C-DOMG se describe en la Publicación de PCT No. WO 09/086558, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. Y conjugados de PEG-lípido

adecuados incluyen, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilen glicol) (2KPEG-DMG). La síntesis del 2KPEG-DMG se describe en la Patente US N° 7,404,969, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00227] El PEG es un polímero lineal soluble en agua, de unidades repetitivas de etilen PEG con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican de acuerdo con sus pesos moleculares; por ejemplo el PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 daltons. PEGs son comercializados por Sigma Chemical Co. y otras compañías e incluyen, sin limitación, los siguientes: monometoxipolietilen glicol (MePEG-OH), monometoxipolietilen glicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilen glicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilen glicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilen glicol-tresilato (MePEG-TRES), monometoxipolietilen glicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM), como también compuestos tales que contienen un grupo hidroxilo terminal en lugar de un grupo metoxi terminal (*por ejemplo*, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH₂, *etc.*). Otros PEGs tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,774,180 y 7,053,150 (*por ejemplo*, mPEG (20 KDa) amina) también son útiles para preparar los conjugados de PEG-lípido de la presente invención. Las divulgaciones de estos documentos patente se incorporan en su totalidad en la presente como referencia para cualquier finalidad. Además, el ácido monomethoxipolietilenglicol-acético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparare los conjugados de PEG-lípido lo que incluye, *por ejemplo*, conjugados de PEG-DAA.

[00228] La parte PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en la presente puede comprender un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En algunos casos, parte PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (*por ejemplo*, de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1,500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, *etc.*). En formas de realización

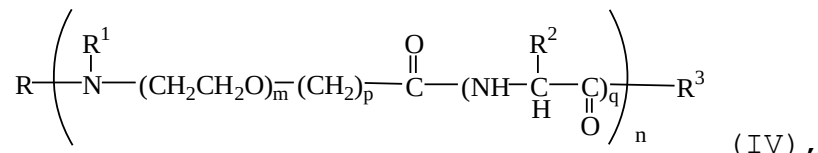
preferidas, la parte PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons o de aproximadamente 750 daltons.

[00229] En algunos casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido por un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG puede estar conjugado directamente a lípido o puede ser estar ligado mediante una parte linker. Puede utilizarse cualquier parte linker adecuada para acoplar el PEG a un lípido lo que incluye, *por ejemplo*, partes linker que no contienen éster y partes linker que contienen éster. En una forma de realización preferida, la parte linker es una parte éster que no contiene éster. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "parte linker que no contiene éster" se refiere a una parte linker que no contiene un enlace éster carboxílico (-OC(O)-). Las partes éster que no contiene éster incluyen, sin limitación, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonil (-C(O)-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfuro (-S-S-), éter (-O-), succinilo (-O)CCH₂CH₂C(O)-), succinamidilo (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), éter, disulfuro, como también sus combinaciones (tales como un linker que contiene tanto una parte linker carbamato y una parte linker amido). En una forma de realización preferida, se utiliza un linker carbamato para acoplar el PEG al lípido.

[00230] En otras formas de realización, se utiliza una parte éster que contiene éster para acoplar el PEG al lípido. Las partes linker éster adecuadas que contienen éster incluyen, *por ejemplo*, carbonato (-OC(O)O-), succinoílo, fosfato esteres (-O-(O)POH-O-), sulfonato esteres, y sus combinaciones.

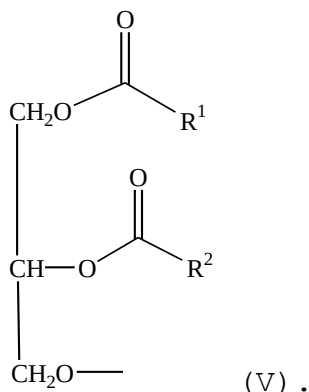
[00231] Las fosfatidiletanolaminas que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de diversos grados de saturación pueden ser conjugados a PEG de manera de formar el conjugado de lípidos. Tales fosfatidiletanolaminas se obtienen en el comercio, o se los puede aislar o sintetizar mediante técnicas conocidas del experto en el arte. Se prefieren las fosfatidil-etanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con cadenas de carbono de una longitud en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. Las fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono o disaturados y mezclas de ácidos grasos mono y disaturados también pueden utilizarse. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, sin limitación, dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), y distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

[00232] El término "ATTA" o "poliamida" incluye, sin limitación, compuestos descritos en las Patentes US Nos. 6,320,017 y 6,586,559, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad. Estos compuestos incluyen un compuesto que tienen la siguiente fórmula:

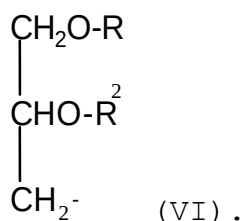


[00233] en donde R es un miembro seleccionado del grupo consistente en hidrogeno, alquilo y acilo; R^1 es un miembro seleccionado del grupo consistente en hidrogeno y alquilo; o opcionalmente, R y R^1 y el átomo de nitrógeno al que están unidos forman una parte azido; R^2 es un miembro del grupo de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, y una cadena lateral de un aminoácido; R^3 es un miembro, seleccionado del grupo consistente en hidrogeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR^4R^5 , en donde R^4 y R^5 son independientemente entre sí hidrógeno o alquilo; n es de 4 a 80; m es de 2 a 6; p es de 1 a 4; y q es 0 ó 1. Será evidente para las personas expertas en el arte que en los compuestos de la presente invención es posible utilizar otras poliamidas.

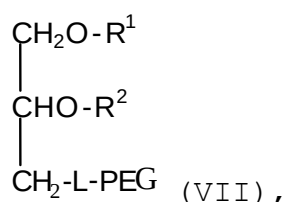
[00234] El término "diacilglicerol" o "DAG" incluye un compuesto que tienen 2 cadenas de ácidos grasos, R^1 y R^2 , que ambos tienen independientemente entre sí entre 2 y 30 átomos de carbono ligados en la posición 1 y 2 del glicerol mediante enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener variados grados de insaturación. Los grupos acilo comprende, sin limitación, lauroílo (C_{12}), miristoílo (C_{14}), palmitoílo (C_{16}), estearoílo (C_{18}), e icosoílo (C_{20}). En formas de realización preferidas, R^1 y R^2 son iguales, es decir, R^1 y R^2 son ambos miristoílo (es decir, dimiristoílo), R^1 y R^2 son ambos estearoílo (es decir, distearoílo), etc. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:



[00235] El término "dialquiloxypropilo" o "DAA" incluye un compuesto que tienen 2 cadenas alquilo, R^1 y R^2 , que ambos e independientemente entre sí tienen entre 2 y 30 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los dialquiloxypropilos tienen la siguiente fórmula general:



[00236] En una forma de realización preferida, el PEG-lípido es un conjugado de PEG-DAA que tiene la siguiente fórmula:



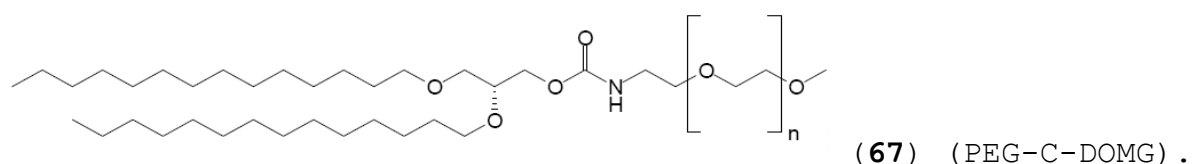
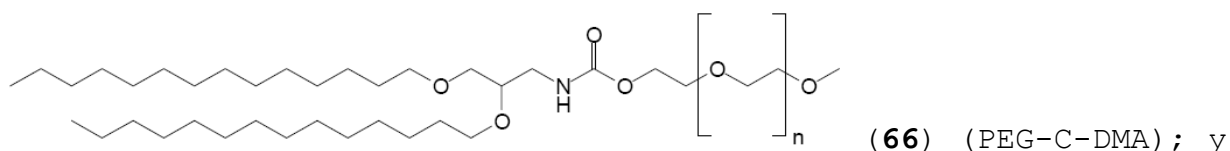
[00237] en donde R^1 y R^2 son independientemente entre sí seleccionados y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es una parte linker que no contiene éster o una parte linker que contiene éter anteriormente descrita. Los grupos alquilo de cadena larga pueden estar saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, sin limitación, decilo (C_{10}), laurilo (C_{12}), miristilo (C_{14}), palmitilo (C_{16}), estearilo (C_{18}), e icosilo (C_{20}). En formas de realización preferidas, R^1 y R^2 son iguales, es decir, R^1 y R^2 son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R^1 y R^2 are ambos estearilo (es decir, distearilo), etc.

[00238] En la Fórmula VII anteriormente descrita, el PEG tiene un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En algunos casos, parte PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En formas de realización preferidas, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons o de aproximadamente 750 daltons. El PEG puede estar opcionalmente

sustituido con grupos alquilo, alcoxi, acilo, o arilo. En determinadas formas de realización, el grupo hidroxilo terminal está sustituido con un grupo metoxi o metilo.

[00239] En una forma de realización preferida, "L" es una parte linker que no contiene éster. Los linkers que no contienen éster adecuados incluyen, sin limitación, una parte linker amido, una parte linker amino, una parte linker carbonilo, una parte linker carbamato, una parte linker urea, una parte linker éter, una parte linker disulfuro, una parte linker succinamidilo, y sus combinaciones. En una forma de realización preferida, la parte linker que no contiene éster es una parte linker carbamato (es decir, un conjugado de PEG-C-DAA). En otra forma de realización preferida, la parte linker que no contiene éster es una parte linker amido (es decir, un conjugado de PEG-A-DAA). Y en otra forma de realización preferida, la parte linker que no contiene éster es una parte linker succinamidilo (es decir, un conjugado de PEG-S-DAA).

[00240] En formas de realización particulares, el conjugado de PEG-lípido está seleccionado entre:



[00241] Los conjugados de PEG-DAA son seleccionados mediante técnicas y reactivos conocidos de las personas expertas en el arte. Debe reconocerse que los conjugados de PEG-DAA contendrán varios enlaces amida, amamina, éter, tio, carbamato, y urea. Las personas expertas en el arte reconocerán que los métodos y reactivos para formar estos enlaces son bien conocidos y fácilmente disponibles. Véase, por ejemplo, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); y Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989). También debe apreciarse que cualesquier grupos funcionales presentes pueden requerir una protección y desprotección en diferentes instancias en la síntesis de los conjugados de PEG-DAA. Las personas expertas en el arte reconocerán que tales técnicas son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

[00242] Es preferible que el conjugado de PEG-DAA sea un conjugado de PEG-dideciloxypropilo (C_{10}), un conjugado de PEG-dilauryloxypropilo (C_{12}), un conjugado de PEG-dimiristiloxypropilo (C_{14}), un conjugado de PEG-dipalmitiloxypropilo (C_{16}), o un conjugado de PEG-disteariloxypropil (C_{18}). En estas formas de realización, es preferible que el PEG tenga un peso molecular promedio de aproximadamente 750 o de aproximadamente 2.000 daltons. En una forma de realización particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG2000-C-DMA, en donde el "2000" designa el peso molecular promedio del PEG, el "C" designa una parte linker carbamato, y el "DMA" designa dimiristiloxypropilo. En otra forma de realización particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG750-C-DMA, en donde el "750" designa el peso molecular promedio del PEG, el "C" designa una parte linker carbamato, y el "DMA" designa dimiristiloxypropilo. En formas de realización particulares, el grupo hidroxilo terminal del PEG está sustituido con un grupo metilo. Las personas expertas en el arte comprenderá fácilmente que es posible utilizar otros dialquiloxypropilos en los conjugados de PEG-DAA de la presente invención.

[00243] Además de lo que precede, las personas expertas en la técnica comprenderán fácilmente que es posible utilizar otros polímeros hidrófobos en lugar del PEG. Los ejemplos de polímeros adecuados que pueden utilizarse en lugar del PEG incluyen, sin limitación, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxypropil metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y celulosas derivadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

[00244] Además de los componentes precedentes, las partículas de lípido de la presente invención pueden además comprender lípidos catiónicos poli(etilen glicol) (PEG) o CPLs (Véase, por ejemplo, Chen et al., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); la Patente US N° 6,852,334; la Publicación de PCT No. WO 00/62813, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad).

[00245] Los CPL adecuados incluyen compuestos de la Fórmula VIII:

A-W-Y (VIII),

[00246] en donde A, W, y Y son como se describe en lo que sigue.

[00247] Con referencia a la Fórmula VIII, "A" es una parte líquido tal como un líquido anfipático, un líquido neutro, o un líquido

hidrófobo que actúa como un ancla para lípidos. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, sin limitación, diacilglicerolilos, dialquilglicerolilos, N-N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos, y 1,2-dialquil-3-aminopropanos.

[00248] "W" es un polímero o un oligómero tal como un polímero u oligómero hidrófilo. Es preferible que el polímero hidrófilo sea un polímero incompatible que es no inmunogénico porque posea una baja inmunogenicidad inherente. Como alternativa, el polímero hidrófilo puede ser débilmente antigénico si se lo utiliza con adyuvantes adecuados. Los polímeros no inmunogénicos adecuados incluyen, sin limitación, PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polímeros ácido poliláctico/ácido poliglicólico, y sus combinaciones. En una forma de realización preferida, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7.000 daltons.

[00249] "Y" es una parte policationica. La expresión "parte policationica" se refiere a un compuesto, derivado o grupo funcional que tiene una carga positiva, preferiblemente por lo menos 2 cargas positivas bajo un pH seleccionado, preferiblemente un pH fisiológico. Las partes policationicas incluyen aminoácidos básicos y sus derivados tales como arginamina, asparagamina, glutamamina, lisamina, e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros cationicos; azúcares de poliamina; y amino polisacáridos. Las partes policationicas pueden ser lineales, tales como tetralisamina lineal, o de estructura ramificada o dendrímica. Las partes policationicas tienen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 15 cargas positivas, preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 cargas positivas, y más preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 cargas positivas bajo valores de pH seleccionados. La selección del cual parte policationica deberá utilizarse puede determinarse en función del tipo de aplicación deseada para la partícula.

[00250] Las cargas sobre las partes policationicas puede estar sea distribuidas alrededor de la totalidad de la parte de partícula, o como alternativa, puede tratarse de una concentración discreta la densidad de carga en un área particular de la parte partícula, por ejemplo, una espina de cargas. Si la densidad de la carga está distribuida sobre la partícula, la densidad de la carga puede estar distribuida uniformemente o no uniformemente. Todas las variaciones en cuanto a la distribución de la carga de la

parte policatiónica se hallan dentro de los alcances de la presente invención.

[00251] El lípido "A" y el polímero no inmunogénico "W" puede ser fijado mediante diversos métodos, y preferiblemente mediante fijación covalente. Los métodos conocidos de la persona experta puedan ser utilizadas para la fijación covalente de "A" y "W." Los enlaces adecuados incluyen, sin limitación, enlaces amida, amamina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster, e hidrazona. Será evidente para la persona experta que "A" y "W" deben tener grupos funcionales complementarios para llevar a cabo el enlace. La reacción de estos dos grupos, uno sobre el lípido y el otro sobre el polímero, proveerá el enlace deseado. Por ejemplo, si el lípido es un diacilglicerol y el hidroxilo terminal está activado, por ejemplo con NHS y DCC, de manera de formar un éster activo, y seguidamente se lo hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo camino, tal como con una poliamida (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,320,017 y 6,586,559, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad), se formará una unión amídica entre los dos grupos.

[00252] En algunos casos, la parte policatiónica puede llevar un ligando fijado, tal como un ligando de apuntamiento o una parte quelante para complejar el calcio. Es preferible, que una vez que el ligando se haya fijado, que la parte catiónica mantenga una carga positiva. En algunos casos, el ligando que está fijado tiene una carga positiva. Los ligandos adecuados incluyen, sin limitación, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluyen lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos portadores, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos analíticamente detectables, compuestos terapéuticamente activos, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, inmune estimuladores, radioetiquetas, fluorogenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otras partes de apuntamiento, o toxinas.

[00253] En algunas formas de realización, el conjugado de lípido (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de aproximadamente 0,1 % mol a aproximadamente 3 % mol, de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 3 % mol, de aproximadamente 0,6 % mol, 0,7 % mol, 0,8 % mol, 0,9 % mol, 1,0 % mol, 1,1 % mol, 1,2 % mol, 1,3 % mol,

1,4 % mol, 1,5 % mol, 1,6 % mol, 1,7 % mol, 1,8 % mol, 1,9 % mol, 2,0 % mol, 2,1 % mol, 2,2 % mol, 2,3 % mol, 2,4 % mol, 2,5 % mol, 2,6 % mol, 2,7 % mol, 2,8 % mol, 2,9 % mol o 3 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00254] En otras formas de realización, el conjugado de lípido (*por ejemplo*, PEG-lípido) comprende de aproximadamente 0 % mol a aproximadamente 20 % mol, de aproximadamente 0,5 % mol a aproximadamente 20 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 20 % mol, de aproximadamente 1,5 % mol a aproximadamente 18 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 15 % mol, de aproximadamente 4 % mol a aproximadamente 15 % mol, de aproximadamente 2 % mol a aproximadamente 12 % mol, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 12 % mol, de aproximadamente 2 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00255] En otras formas de realización, el conjugado de lípido (*por ejemplo*, PEG-lípido) comprende de aproximadamente 4 % mol a aproximadamente 10 % mol, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 10 % mol, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 9 % mol, de aproximadamente 5 % mol a aproximadamente 8 % mol, de aproximadamente 6 % mol a aproximadamente 9 % mol, de aproximadamente 6 % mol a aproximadamente 8 % mol, de aproximadamente 5 % mol, 6 % mol, 7 % mol, 8 % mol, 9 % mol, o 10 % mol (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo) del lípido total presente en la partícula.

[00256] Debe entenderse que el porcentaje de conjugado de lípido presente en las partículas de lípido de la invención es una cantidad teórica, y que la cantidad total del conjugado de lípido presente en la formulación puede variar en, *por ejemplo*, ± 5 % mol, ± 4 % mol, ± 3 % mol, ± 2 % mol, ± 1 % mol, $\pm 0,75$ % mol, $\pm 0,5$ % mol, $\pm 0,25$ % mol, o $\pm 0,1$ % mol.

[00257] Porcentajes e intervalos adicionales de conjugados de lípido adecuados para ser utilizados en las partículas de lípido de la presente invención se describen en la Publicación de PCT No. WO 09/127060, la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0071208, la Publicación de PCT No. WO2011/000106, y la Solicitud Publicada U.S. No. US 2011/0076335, cuyas revelaciones se incorporan en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00258] Una experto en el arte comprenderá que la concentración del conjugado de lípido puede variarse en función del conjugado de lípido utilizado y de la velocidad con la cual la partícula de lípido debe hacerse fusogénica.

[00259] Mediante el control de la composición y concentración del conjugado de lípido, es posible controlar la velocidad con la cual el conjugado de lípido se intercambia con la partícula de lípido y a su vez la velocidad con la cual la partícula de lípido se hace fusogénica. Por ejemplo, si se utiliza un conjugado de PEG-DAA como el conjugado de lípido, la velocidad con lo cual la partícula de lípido se vuelve fusogénica puede ser variada, por ejemplo, variando la concentración del conjugado de lípido, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de las cadenas y grado de saturación de los grupos alquilo sobre el conjugado de PEG-DAA. Además, es posible utilizar otras variables que incluyen, por ejemplo, el pH, temperatura, intensidad iónica, etc. para variar y/o controlar la velocidad con la que la partícula de lípido se hace fusogénica. Otros métodos que pueden ser utilizados para controlar la velocidad con la que la partícula de lípido se hace fusogénica, se han puesto en evidencia para las personas expertas en el arte en base a la lectura de esta divulgación. Asimismo, también es posible controlar el tamaño de las partículas de lípido concentrando la composición de concentración del conjugado de lípido.

B. Sistemas portadores adicionales

[00260] Los ejemplos no limitantes de sistemas portadores basados en lípido, adicionales, adecuados para ser utilizados en la presente invención incluyen los lipoplejos (Véase, por ejemplo, Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030203865; y Zhang et al., *J. Control Release*, 100:165-180 (2004)), los lipoplejos sensibles al pH (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20020192275), los lipoplejos reversiblemente enmascarados (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos Nos. 20030180950), las composiciones catiónicas basadas en lípidos (Véase, por ejemplo, la Patente US 6,756,054; y la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20050234232), liposomas catiónicos (Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 20030229040, 20020160038, y 20020012998; la Patente US N° 5,908,635; y la Publicación de PCT No. WO 01/72283), los liposomas aniónicos (Véase, por ejemplo, la Publicación de

Patentes de Estados Unidos No. 20030026831), los liposomas sensibles al pH (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20020192274; y el documento AU 2003210303), liposomas recubiertos de anticuerpos (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030108597; y la Publicación de PCT No. WO 00/50008), liposomas específicos para tipos de células (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030198664), liposomas que contienen ácido nucleico y péptidos (Véase, por ejemplo, la Patente US N° No. 6,207,456), liposomas que contienen lípidos derivados con polímeros hidrófilos liberables (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030031704), ácido nucleico atrapado en lípido (Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de PCT Nos. WO 03/057190 y WO 03/059322), ácido nucleico encapsulado en lípido (Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos No. 20030129221; y la Patente US No. 5,756,122), composición de liposomas (Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 20030035829 y 20030072794; y mezclas estabilizadas de liposomas y emulsiones (Véase, por ejemplo, el documento EP1304160), composiciones de emulsión (Véase, por ejemplo, la Patente US N° No. 6,747,014), y microemulsiones de ácido nucleico (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20050037086).

[00261] Los ejemplos de sistemas portadores basados en polímero adecuados para ser utilizados en la presente invención incluyen, sin limitación, complejos de polímero catiónico-ácido nucleico (es decir, poliplejos). Para formar un poliplejo, un ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNsi, tales como una molécula de ARNsi descrita en la Tabla A) es típicamente complejo con un polímero catiónico que tienen una estructura polimérica lineal, ramificada, en estrella o dendrítica que condensa el ácido nucleico en partículas cargadas positivamente capaces de interactuar con proteoglicanos aniónicos en la superficie de las células y de penetrar en las células por endocitosis. En algunas formas de realización, el poliplejo comprende ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNsi, tales como una molécula de ARNsi descrita en la Tabla A) complejo con un copolímero catiónico tal como polietilenimina (PEI) (Véase, por ejemplo, la Patente US N° No. 6,013,240; comercializado por Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA) como *In vivo*

jetPEI™, una forma lineal de PEI), polipropilenimina (PPI), polivinilpirolidone (PVP), poli-L-lisina (PLL), dietilaminoetil (DEAE)-dextrano, polímeros poli(β -amino éster) (PAE) (Véase, por ejemplo, Lynn et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001)), quitosano, poliamidoamina (PAMAM) dendrímeros (Véase, por ejemplo, Kukowska-Latallo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996)), porfirina (Véase, por ejemplo, la Patente US No. 6,620,805), poliviniléter (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20040156909), amidinio policíclicos (Véase, por ejemplo, la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030220289), otros polímeros que comprenden amina primaria, imina, guanidamina, y/o grupos imidazol (Véase, por ejemplo, la Patente US N° No. 6,013,240; la Publicación de PCT No. WO/9602655; la Publicación de PCT No. WO95/21931; Zhang et al., *J. Control Release*, 100:165-180 (2004); y Tiera et al., *Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006)), y una de sus mezclas. En otras formas de realización, los complejos de polímero catiónico - ácido nucleico descritos en la Publicación de Patentes de Estados Unidos Nos. 20060211643, 20050222064, 20030125281, y 20030185890, y la Publicación de PCT No. WO 03/066069; complejos biodegradables de poli(β -amino éster)-ácido nucleico descritos en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20040071654; micropartículas que contienen matrices poliméricas descritos en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20040142475; otras composiciones de micropartículas descritas en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20030157030; complejos condensados de ácido nucleico descrito en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20050123600; y composiciones de nanocápsulas y microcápsulas descritas en el documento AU 2002358514 y en la Publicación de PCT No. WO 02/096551.

[00262] En algunos casos, el ARNsi puede ser complejado con ciclodextrina o con uno de sus polímeros. Los ejemplos no limitantes de sistemas portadores basados en ciclodextrina incluyen los complejos de ciclodextrina-polímero modificado-ácido nucleico descritos en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20040087024; los complejos lineales de copolímero ciclodextrina - ácidos nucleicos descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6.509.323, 6.884.789, y 7.091.192; y el complejo de polímero ciclodextrina-ácido nucleico se describen en la Patente US N° 7.018.609. En otros casos determinados, el ARNsi

puede ser complejo con un péptido o polipéptido. Un ejemplo de un sistema portador basado en proteína incluir sin limitación, el complejo de oligopéptido catiónicos-ácido nucleico descrito en la Publicación de PCT No. WO95/21931.

Preparación de partículas de lípido

[00263] Las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención, en los que un ácido nucleico (*por ejemplo*, un ARNsi descrito en la Tabla A) está atrapado dentro de la porción lipídica de la partícula y es protegida contra su degradación, puede ser formada mediante cualquier método conocido en la técnica, lo que incluye, sin limitación un método de mezclado continuo, un método de dilución directa, y un proceso de dilución en línea.

[00264] En formas de realización particulares, los lípidos catiónicos pueden comprender lípidos de la Fórmula I-III o sus sales, solos en combinación con otros lípidos catiónicos. En otras formas de realización, los lípidos no catiónicos son esfingomielina de huevo (ESM), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometil-fosfatidiletanolamamina, dimetil-fosfatidiletanolamamina, 14:0 PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamamina (DMPE)), 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamamina (DPPE)), 18:0 PE (1,2-distearoil-fosfatidiletanolamamina (DSPE)), 18:1 PE (1,2-dioleoil-fosfatidiletanolamamina (DOPE)), 18:1 trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamamina (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamamina (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamamina (POPE)), polímeros basados en polietilenglicol (*por ejemplo*, PEG 2000, PEG 5000, diacilgliceroles modificados con PEG, o dialquiloiloxipropilos modificados con PÑEDG), colesterol, sus derivados, o sus combinaciones.

[00265] En determinadas formas de realización, la presente invención provee partículas de ácido nucleico-lípido producidas mediante un método de mezclado continuo, *por ejemplo*, un proceso que incluye proveer una solución acuosa que comprende un ARNsi en un primer depósito, proveer una solución orgánica de lípidos en un segundo depósito (en donde los lípidos presentes en la solución orgánica de lípido están solubilizados en un solvente orgánico, *por ejemplo*, un alcohol inferior tal como etanol), y

mezclar la solución acuosa con la solución orgánica de lípidos de manera tal que la solución orgánica de lípido se mezcla con la solución acuosa de manera de producir una manera sustancialmente instantánea una vesícula de lípido (*por ejemplo*, un liposoma) encapsulándose el ARNsi dentro de la vesícula de lípido. Este proceso y el aparato para llevar a cabo este proceso se describen con detalle en la Publicación de Patentes de Estados Unidos No. 20040142025, cuya divulgación se incorpora en la presente en su totalidad como referencia para toda finalidad.

[00266] La acción de la introducción continua de soluciones de lípido y tampón en un entorno de mezclado, tal como una cámara mezcladora, ocasiona una dilución continua en la solución de lípido con la solución de tampón, produciéndose de esta manera una vesícula de lípido de una manera sustancialmente instantánea a tener lugar el mezclado. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "dilución continua de una solución de lípido con una solución tampón" (y sus variantes) en términos generales significa que la solución de lípido se diluye con una velocidad suficiente en un proceso de hidratación con una fuerza suficiente para llevar a cabo la generación de vesículas. Mediante el mezclado de la solución acuosa que comprende un ácido nucleico con la solución orgánica de lípido, la solución orgánica de lípido experimenta una dilución escalonada continúa en la presencia de la solución tampón (es decir, de la solución acuosa) de manera de producir una partícula de ácido nucleico-lípido.

[00267] Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas utilizando el método del mezclado continuo tienen típicamente un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, de aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130

nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción de ellos o en su intervalo). Las partículas así formada no se agregan y se las conforma opcionalmente de manera de obtener partículas de un tamaño uniforme.

[00268] En otra forma de realización, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido producidas vía un proceso de dilución directo que incluye formar una solución de vesícula de lípido (por ej., liposoma) e introducir inmediatamente y directamente la solución de vesícula de lípido en un recipiente de recolección que contiene una cantidad controlada de buffer de dilución. En aspectos preferidos, el recipiente de recolección incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recolección para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de buffer de dilución presente en el recipiente de recolección es substancialmente igual al volumen de la solución de vesícula de lípido introducida allí. Como un ejemplo no limitativo, una solución de vesícula de lípido en 45% de etanol, cuando es introducida en el recipiente de recolección que contiene un volumen igual de buffer de dilución, dará ventajosamente partículas más pequeñas.

[00269] En otra forma de realización, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido producidas vía un proceso de dilución en línea en el cual un tercer reservorio que contiene el buffer de dilución es acoplado fluidamente a una segunda región de mezclado. En esta forma de realización, la solución de vesícula de lípido (por ej., liposoma) formada en una primera región de mezclado es mezclada inmediatamente y directamente con buffer de dilución en la segunda región de mezclado. En aspectos preferidos, la segunda región de mezclado incluye un conector en T configurado de tal modo que los flujos de la solución de vesícula de lípido y el buffer de dilución se encuentran como flujos opuestos en 180°; sin embargo, se pueden usar conectores que proporcionan ángulos más pequeños, por ej., desde aproximadamente 27° a aproximadamente 180° (por ej., aproximadamente 90°). Un mecanismo de bombeo suministra un flujo controlable de buffer a la segunda región de mezclado. En un aspecto, el caudal de buffer de dilución proporcionado a la segunda región de mezclado es controlado para que sea substancialmente igual al caudal de solución de vesícula de lípido introducido allí desde la primera región de mezclado. Esta

forma de realización permite ventajosamente un mayor control del mezclado del flujo de buffer de dilución con la solución de vesícula de lípido en la segunda región de mezclado, y por lo tanto también la concentración de la solución de vesícula de lípido en el buffer durante el segundo proceso de mezclados. Tal control del caudal del buffer de dilución permite ventajosamente la formación de partículas de tamaño pequeño a concentraciones reducidas.

[00270] Estos procesos y los aparatos para llevar a cabo esta dilución directa y estos procesos de dilución en línea se describen en detalle en la publicación de patente U.S. No. 20070042031, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00271] Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas usando los procesos de dilución directa y dilución en línea tienen típicamente un tamaño de desde aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, desde aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, desde aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, desde aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, desde aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, desde aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, desde aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, desde aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, desde aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, desde aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, desde aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, or aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción de estos o rango comprendido). Las partículas así formadas no se agregan y están dimensionadas opcionalmente para alcanzar un tamaño de partícula uniforme.

[00272] Si se necesita, las partículas de lípido de la invención pueden ser dimensionadas por cualquiera de los métodos disponibles para dimensionar liposomas. El dimensionamiento puede ser realizado para lograr un rango de tamaño deseado y una distribución de tamaño de partículas relativamente estrecho.

[00273] Diversas técnicas se encuentran disponibles para dimensionar las partículas a un tamaño deseado. Un método de

dimensionamiento usado para liposomas y que se puede aplicar igualmente a las presentes partículas, se describe en la patente U.S. No. 4.737.323, cuya divulgación se incorpora a la presente por referencia en su totalidad para todo propósito. La sonicación de una suspensión de partículas ya sea por sonicación por baño o sonda produce una reducción de tamaño progresiva hacia abajo hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en energía de corte para fragmentar partículas más grandes en otras más pequeñas. En un procedimiento de homogeneización típico, se observa que las partículas son recirculadas a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta tamaños de partículas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partículas puede ser monitoreado por discriminación de tamaño de partícula por rayo láser convencional, o QELS.

[00274] La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana de cerámica asimétrica también es un método efectivo para reducir los tamaños de partículas a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión es ciclada a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de partículas deseada. Las partículas pueden ser extruidas a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños, hasta alcanzar una reducción de tamaño gradual.

[00275] En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos presentes en las partículas (por ej., las moléculas de siARN) son precondensadas como se describe, por ej., en la solicitud de patente U.S. No. 09/744.103, cuya divulgación se incorpora a la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00276] En otras formas de realización, los métodos pueden comprender además agregar policationes no lipídicos que son útiles para efectuar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no lipídicos adecuados incluyen, bromuro de hexadimetrina (vendido bajo el nombre comercial POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina, y polietilenimina. La adición de estas sales se realiza preferentemente después que se han formado las

partículas.

[00277] En algunas formas de realización, las relaciones entre el ácido nucleico (por ej., siARN) y el lípido (relaciones masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada oscilará desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2, desde aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1, desde aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1, o desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08. La relación de los materiales de partida (entrada) también está comprendida en este rango. En otras formas de realización, la preparación de la partícula usa aproximadamente 400 µg de ácido nucleico por 10 mg de lípido total o una relación de masa entre el ácido nucleico y el lípido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08 y, más preferentemente, aproximadamente 0,04, que corresponde a 1,25 mg de lípido total por 50 µg de ácido nucleico. En otras formas de realización preferidas, la partícula tiene una relación de masa ácido nucleico:lípido de aproximadamente 0,08.

[00278] En otras formas de realización, las relaciones entre lípido y ácido nucleico (por ej., siARN) (relaciones masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada oscilará desde aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 100 (100:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 100 (100:1), desde aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 50 (50:1), desde aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 50 (50:1), desde aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 50 (50:1), desde aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 50 (50:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 50 (50:1), desde aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 25 (25:1), desde aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 25 (25:1), desde aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 25 (25:1), desde aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 25 (25:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 25 (25:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 20 (20:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), desde aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), o aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), o 25 (25:1), o cualquier fracción de estos o rango comprendido. La relación de los materiales de

partida (entrada) también está comprendida en este rango.

[00279] Como se comentó previamente, el lípido conjugado puede incluir además un CPL. Una variedad de métodos generales para preparar partículas de lípido-CPLs (partículas de lípido que contienen CPL) se comentan en la presente. Dos técnicas generales incluyen la técnica "post-inserción", es decir, la inserción de un CPL en, por ejemplo, una partícula de lípido preformada, y la técnica "estándar", en donde el CPL está incluido en la mezcla de lípidos durante, por ejemplo, las etapas de formación de la partícula de lípido. La técnica post-inserción da por resultado partículas de lípido que tienen CPLs principalmente en la fase externa de la membrana bicapa de la partícula de lípido, mientras que las técnicas estándar proporcionan partículas de lípido que tienen CPLs en ambas caras, interna y externa. El método es especialmente útil para vesículas hechas de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAAAs y PEG-DAGs). Métodos de preparación de partículas de lípido-CPLs se enseñan, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; la publicación de patente U.S. No. 20020072121; y la publicación PCT No. WO 00/62813, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

Kits

[00280] La presente invención también proporciona partículas de lípido en forma de kit. En algunas formas de realización, el kit comprende un contenedor que es compartimentado para alojar los diversos elementos de las partículas de lípido (por ej., los agentes activos, tales como las moléculas de siARN y los componentes de lípidos individuales de las partículas). Preferentemente, el kit comprende un contenedor (por ej., un frasco-ampolla o ampolla) que aloja las partículas de lípido de la invención, en donde las partículas son producidas por uno de los procesos presentados en la presente. En algunas formas de realización, el kit puede comprender también un desestabilizador de membrana endosómico (por ej., iones de calcio). El kit típicamente contiene las composiciones de partículas de la invención, o bien como una suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación (si está liofilizado) y administración.

[00281] Las formulaciones de la presente invención pueden ser adaptadas para ser direccionadas preferentemente a células particulares, tejidos, u órganos de interés. El direccionamiento preferencial de una partícula de ácido nucleico-lípido puede ser llevado a cabo controlando la composición de la partícula de lípido propiamente dicha. En formas de realización particulares, los kits de la invención comprenden estas partículas de lípido, en donde las partículas están presentes en un contenedor como una suspensión o en forma deshidratada.

[00282] En algunos casos, puede ser conveniente tener una parte de direccionamiento unida a la superficie de la partícula de lípido para aumentar más aún el direccionamiento de la partícula. Métodos para unir partes de direccionamiento (por ej., anticuerpos, proteínas, etc.) a lípidos (tal como aquellos usados en las presentes partículas) son conocidos por los expertos en el arte.

Administración de partículas de lípido

[00283] Una vez formadas, las partículas de lípido de la invención son particularmente útiles para la introducción de una molécula de siARN (por ej., una molécula de siARN como se describe en la Tabla A) en células. Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos para introducir una molécula de siARN en una célula. En formas de realización particulares, la molécula de siARN es introducida en una célula infectada. Los métodos pueden ser llevados a cabo *in vitro* o *in vivo* formando primero las partículas como se describe más arriba y luego poniendo en contacto las partículas con las células durante un período de tiempo suficiente para que ocurra el suministro del siARN a las células.

[00284] Las partículas de lípido de la invención (por ej., una partícula de ácido nucleico-lípido) puede ser adsorbida en casi cualquier tipo de célula con la cual sea mezclada o puesta en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden o bien ser incorporadas por endocitosis por una parte de las células, intercambiar lípidos con membranas celulares, o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la parte de siARN de la partícula puede tener lugar a través de cualquiera de estas vías. En particular, cuando se produce la fusión, la membrana de la partícula es integrada en la membrana celular y el contenido de la partícula se combina con el fluido intracelular.

[00285] Las partículas de lípido de la invención (por ej.,

partículas de ácido nucleico-lípido) pueden ser administradas o bien solas o en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ej., solución salina fisiológica o buffer fosfato) seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica estándar. En general, se empleará solución salina con buffer normal (por ej., 135-150 mM de NaCl) como el vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados incluyen, por ej., agua, agua con buffer, 0,4% de solución salina, 0,3% de glicina, y similares, incluyendo glicoproteínas para mayor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Vehículos adecuados adicionales se describen, por ej., en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Como se usa en la presente, "vehículo" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, buffers, soluciones vehículo, suspensiones, coloides, y similares. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o indeseada similar cuando son administradas a un humano.

[00286] El vehículo farmacéuticamente aceptable es agregado generalmente después de la formación de la partícula de lípido. Así, después que se forma la partícula de lípido, la partícula puede ser diluida en vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina con buffer normal.

[00287] La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,05%, usualmente a, o al menos aproximadamente 2 a 5%, hasta tanto como aproximadamente 10 a 90% en peso, y será seleccionada principalmente por los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede ser aumentada para bajar la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada con aterosclerosis o hipertensión severa. Alternativamente, las partículas compuestas por lípidos irritantes pueden ser diluidas a bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el sitio de administración.

[00288] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención

pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las soluciones acuosas pueden ser envasadas para el uso o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada es combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de buffer, agentes que ajustan la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Adicionalmente, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de lípido que protegen a los lípidos contra los daños de los radicales libres y lípido-peroxidativos durante el almacenamiento. Extinguidores de radicales libres lipófilo, tales como alfa-tocoferol, y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina, son adecuados.

[00289] En algunas formas de realización, las partículas de lípido de la invención son particularmente útiles en métodos para el suministro terapéutico de una o más moléculas de siARN (por ej, una molécula de siARN como se describe en la Tabla A). En particular, un objeto de esta invención es proporcionar métodos *in vivo* para el tratamiento de la infección por HBV y/o HDV en humanos por regulación hacia abajo o silenciamiento de la transcripción y/o traducción de uno o más genes de HBV.

A. Administración *in vivo*

[00290] El suministro sistémico para la terapia *in vivo*, por ejemplo, suministro de una molécula de siARN descrita en la presente, tal como un siARN descrito en la Tabla A, a una célula objetivo distal vía sistemas corporales, tales como la circulación, ha sido logrado usando partículas de ácido nucleico-lípido, tales como aquellas descritas en las publicaciones PCT Nos. WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152, y WO 04/002453, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito. La presente invención proporciona también partículas de lípido completamente encapsuladas que protegen al siARN de la degradación por nucleasa en el suero, son no inmunogénicas, son de tamaño pequeño, y son adecuadas para repetir la dosificación. Adicionalmente, las una o más moléculas de siARNs pueden ser administradas solas en las partículas de lípido de la invención, o en combinación (por

ejemplo, co-administradas) con partículas de lípidos que comprenden péptidos, polipéptidos, o moléculas pequeñas tales como los fármacos convencionales.

[00291] Para la administración *in vivo*, la administración puede ser de cualquier manera conocida en el arte, por ejemplo, por inyección, administración oral, inhalación (por ejemplo, intranasal o intratraqueal), aplicación transdérmica o administración rectal. La administración puede realizarse mediante dosis únicas o divididas. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas parenteralmente, es decir, en forma intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas son administradas en forma intravenosa o intraperitoneal por una inyección de un bolo (ver, por ejemplo, patente U.S. No. 5.286.634). El suministro intracelular de ácido nucleico también ha sido comentado en Straubinger *et al.*, *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino *et al.*, *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); y Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993). Aún otros métodos de administración de terapéuticas basadas en lípidos se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 3.993.754; 4.145.410; 4.235.871; 4.224.179; 4.522.803; y 4.588.578. Las partículas de lípido pueden ser administradas por inyección directa en el sitio de la enfermedad o por inyección en un sitio distal del sitio de la enfermedad (ver, por ejemplo, Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, Nueva York. pp.70-71(1994)). Las divulgaciones de las referencias arriba descriptas se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00292] En formas de realización en donde las partículas de lípido de la presente invención son administradas intravenosamente, al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20% o 25% de la dosis inyectada total de las partículas está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En otras formas de realización, más de aproximadamente 20%, 30%, 40% y como máximo aproximadamente 60%, 70% o 80% de la dosis total inyectada de las partículas de lípido está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36, o 48 horas después de la inyección. En algunos casos, más de aproximadamente 10% de una pluralidad de las partículas está presente en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En

algunos otros casos, la presencia de las partículas de lípido es detectable al menos aproximadamente 1 hora después de la administración de la partícula. En algunas formas de realización, la presencia de una molécula de siARN es detectable en células a aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras formas de realización, la regulación hacia abajo de la expresión de una secuencia objetivo, tal como una secuencia viral o huésped, por una molécula de siARN es detectable a aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras formas de realización, la regulación hacia abajo de la expresión de una secuencia objetivo, tal como una secuencia viral o huésped, por una molécula de siARN ocurre preferentemente en células infectadas y/o células capaces de ser infectadas. En otras formas de realización, la presencia o el efecto de una molécula de siARN en células en un sitio proximal o distal al sitio de administración es detectable a aproximadamente 12, 24, 48, 72, o 96 horas, o a aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, o 28 días después de la administración. En formas de realización adicionales, las partículas de lípido de la invención son administradas parenteralmente o intraperitonealmente.

[00293] Las composiciones de la presente invención, ya sea solas o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse como formulaciones en aerosol (es decir, pueden ser "nebulizadas") a ser administradas vía inhalación (por ejemplo, intranasalmente o intratraquealmente) (ver, Brigham *et al.*, *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)). Las formulaciones en aerosol pueden ser colocadas en propulsores aceptables presurizados, tales como, diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

[00294] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden ser suministradas por sprays intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de suministro en aerosol. Métodos para el suministro de composiciones de ácido nucleico directamente en los pulmones vía sprays en aerosol nasales han sido descritos, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5.756.353 y 5.804.212. Igualmente, el suministro de fármacos usando resinas en micropartículas nasales y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente U.S. 5.725.871) también son bien conocidos en el arte farmacéutico. Similarmente, el suministro del fármaco en forma transmucosa, en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente U.S. No.

5.780.045. Las divulgaciones de las patentes arriba descritas se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00295] Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones de inyecciones estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, buffers, bacteriostatos, y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones son administradas preferentemente, por ejemplo, por infusión intravenosa, oralmente, tópicamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente.

[00296] En general, cuando se administran intravenosamente, las formulaciones de partículas de lípidos son formuladas con un vehículo farmacéutico adecuado. Muchos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser empleados en las composiciones y métodos de la presente invención. Formulaciones adecuadas para usar en la presente invención se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Se pueden usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua con buffer, 0,4% solución salina, 0,3% glicina, y similares, y pueden incluir glicoproteínas para mayor estabilidad, tal como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En general, la solución salina con buffer normal (135-150 mM NaCl) será empleada como el vehículo farmacéuticamente aceptable, pero otros vehículos adecuados serían suficientes. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización liposómica convencional, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de buffer, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden ser esterilizadas usando las técnicas mencionadas más arriba o, alternativamente, pueden ser

producidas bajo condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para ser usadas o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa estéril antes de la administración.

[00297] En algunas aplicaciones, las partículas de lípido divulgadas en la presente pueden ser suministradas vía administración oral al individuo. Las partículas pueden ser incorporadas con excipientes y usadas en la forma de comprimidos para ingerir, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, píldoras, pastillas, elixires, enjuagues bucales, suspensiones, sprays orales, jarabes, wafers, y similares (ver, por ejemplo, patentes U.S Nos. 5.641.515, 5.580.579 y 5.792.451, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito). Estas formas de dosificación oral también pueden contener lo siguiente: ligadores, gelatina; excipientes, lubricantes y/o agentes saborizantes. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos más arriba, un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimiento o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosis. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de unidad de dosificación debería ser farmacéuticamente pura y substancialmente no tóxica en las cantidades empleadas.

[00298] Típicamente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente 0,1% de las partículas de lípido o más, aunque el porcentaje de las partículas, por supuesto, puede variarse y puede ser convenientemente de entre aproximadamente 1% o 2% y aproximadamente 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede ser preparada de tal modo que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como también otras consideraciones farmacológicas serán contempladas por un experto en el arte de la preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y por consiguiente, una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento pueden ser convenientes.

[00299] Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tal como una

cantidad efectiva de una molécula de siARN envuelta (por ejemplo, una molécula de siARN descrita en la Tabla A) suspendida en diluyentes tales como agua, solución salina, o PEG 400; (b) cápsulas, sachets, o comprimidos, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de una molécula de siARN, como líquido, sólido, gránulos, o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, ligantes, diluyentes, agentes de buffer, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, agentes desintegrantes, y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender una molécula de siARN en un saborizante, por ejemplo, sacarosa, así como también como pastillas que comprenden el ácido nucleico terapéutico en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de acacia, geles, y similares que contienen, además de la molécula de siARN, vehículos conocidos en el arte.

[00300] En otro ejemplo de su uso, las partículas de lípido pueden ser incorporadas en un amplio rango de formas de dosificación tópicas. Por ejemplo, una suspensión que contiene partículas de ácido nucleico-lípido puede ser formulada y administrada como geles, aceites, emulsiones, cremas tópicas, pastas, ungüentos, lociones, espumas, mousses, y similares.

[00301] Cuando se preparan los preparados farmacéuticos de las partículas de lípido de la invención, es preferible usar cantidades de las partículas que han sido purificadas para reducir o eliminar partículas vacías o partículas con agentes terapéuticos tales como siARN asociado con la superficie externa.

[00302] Los métodos de la presente invención pueden ser puestos en práctica en una variedad de huéspedes. Los huéspedes preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos y chimpancés así como también otros primates no humanos), caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, y cerdos.

[00303] La cantidad de partículas administradas dependerá de la relación entre la molécula de siARNs y el lípido, el siARN particular usado, la cepa de HBV que se está tratando, la edad,

el peso, y la condición del paciente, y el criterio del médico, pero generalmente será de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} partículas por administración (por ejemplo, inyección).

B. Administración *in vitro*

[00304] Para las aplicaciones *in vitro*, el suministro de la molécula de siARNs puede ser a cualesquiera células que crecen en cultivo. En formas de realización preferidas, las células son células animales, más preferentemente células de mamíferos, y más preferentemente aún células humanas.

[00305] El contacto entre las células y las partículas de lípido, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía ampliamente dependiendo o de la aplicación particular, pero es generalmente de entre aproximadamente 1 μ mol y aproximadamente 10 mmoles. El tratamiento de las células con las partículas de lípido se realiza generalmente a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) durante períodos de tiempo de desde aproximadamente 1 a 48 horas, preferentemente de desde aproximadamente 2 a 4 horas.

[00306] En un grupo de formas de realización preferidas, una suspensión de partículas de lípido se agrega a 60-80% de células confluentes en placas que tienen una densidad celular de desde aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/ml, más preferentemente aproximadamente 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión agregada a las células es preferentemente de desde aproximadamente 0,01 a 0,2 μ g/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1 μ g/ml.

[00307] En la medida en que se requiera un cultivo de células en tejido, éste es bien conocido en el arte. Por ejemplo, Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ra. Ed., Wiley-Liss, Nueva York (1994), Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. (1977), y las referencias citadas allí proporcionan una guía general para el cultivo de células. Los sistemas de células cultivadas frecuentemente estarán en la forma de monocapas de células, aunque también se usan suspensiones de células.

[00308] Usando un ensayo de Parámetro de Liberación Endosómica (ERP), la eficiencia de suministro de una partícula de ácido

nucleico-lípido de la invención puede ser optimizada. Un ensayo ERP se describe en detalle en la publicación de patente U.S. No. 20030077829, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito. Más particularmente, el propósito de un ensayo ERP es distinguir el efecto de varios lípidos catiónicos y componentes lípidos auxiliares de la partícula de lípido en base a su efecto relativo sobre la ligación/captación o fusión con/desestabilización de la membrana endosómica. Este ensayo permite determinar cuantitativamente cómo afecta cada componente de la partícula de lípido a la eficiencia de suministro, y de este modo optimizar la partícula de lípido. Usualmente, un ensayo ERP mide la expresión de una proteína reportera (por ejemplo, luciferasa, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), etc.), y en algunos casos, una formulación de partícula de lípido optimizada para un plásmido de expresión también será apropiado para encapsular un siARN. En otros casos, un ensayo ERP puede ser adaptado para medir la regulación hacia abajo de la transcripción o traducción de una secuencia objetivo en presencia o ausencia de un siARN. Comparando los ERPs para cada una de las varias partículas de lípido, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, por ejemplo, la partícula de lípido que tiene la mayor captación en la célula.

C. Detección de partículas de lípido

[00309] En algunas formas de realización, las partículas de lípido de la presente invención son detectables en el sujeto a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas. En otras formas de realización, las partículas de lípido de la presente invención son detectables en el sujeto a aproximadamente 8, 12, 24, 48, 60, 72, o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, o 28 días después de la administración de las partículas. La presencia de las partículas puede ser detectada en las células, tejidos, u otras muestras biológicas del sujeto. Las partículas pueden ser detectadas, por ejemplo, por detección directa de las partículas, detección de una secuencia de siARN, detección de la secuencia de interés objetivo (es decir, detectando la expresión o la expresión reducida de la secuencia de interés), detección de un compuesto modulado por una proteína EBOV (por ejemplo, interferón), detección de la carga viral en el sujeto, o una combinación de estos.

1. Detección de partículas

[00310] Las partículas de lípido de la invención pueden ser detectadas usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, una marca puede ser acoplada directamente o indirectamente a un componente de la partícula de lípido usando métodos bien conocidos en el arte. Se puede usar una amplia variedad de marcas, dependiendo la elección de la marca de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el componente de la partícula de lípido, los requerimientos de estabilidad y los instrumentos disponibles y las condiciones de descarte. Las marcas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, marcas espectrales tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green™; rodamina y derivados tales como rojo de Texas, isotiocianato de tetrarodimina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™, y similares; las radiomarcas tales como ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, etc.; enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, etc.; las marcas colorimétricas espectrales, tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico, tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. La marca puede ser detectada usando cualquier medio conocido en el arte.

2. Detección de ácidos nucleicos

[00311] Los ácidos nucleicos (por ejemplo, la molécula de siARNs) son detectados y cuantificados en la presente por cualquiera de un número de medios bien conocidos por el experto en el arte. La detección de ácidos nucleicos puede realizarse por métodos bien conocidos tales como análisis Southern, análisis Northern, electroforesis en gel, PCR, radiomarcado, conteo de escintilación, y cromatografía de afinidad. Métodos bioquímicos analíticos adicionales tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cromatografía de capa delgada (TLC), y cromatografía de hiperdifusión, también se pueden emplear.

[00312] La selección de un formato de hibridación del ácido nucleico no es crítica. Una variedad de formatos de hibridación de ácido nucleico son conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, los formatos comunes incluyen ensayos sandwich y ensayos de competencia o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen en general en, por ejemplo, "Nucleic Acid

Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames y Higgins, IRL Press (1985).

[00313] La sensibilidad de los ensayos de hibridación puede ser mejorada mediante el uso de un sistema de amplificación del ácido nucleico que multiplica el ácido nucleico objetivo que es detectado. Las técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar secuencias para el uso como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para la subclonación subsiguiente son conocidos. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir expertas a través de tales métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), la amplificación de Q β -replicasa, y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA™) se encuentran en Sambrook et al., *En Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); y Ausubel et al., *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (2002); así como también la patente U.S. No. 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim & Levinson (1° de octubre, 1990), *C&EN* 36; *The Journal Of NIH Research*, 3:81 (1991); Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989); Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990); Lomell et al., *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren et al., *Science*, 241:1077 (1988); Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291 (1990); Wu y Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer et al., *Gene*, 89:117 (1990); y Sooknanan y Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995). Métodos mejorados de clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en la pat. U.S. No. 5.426.039. Otros métodos descriptos en el arte son la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y los sistemas Q β -replicasa. Estos sistemas se pueden usar para identificar directamente los mutantes donde los cebadores de PCR o LCR están diseñados para ser extendidos o ligados sólo cuando una secuencia seleccionada está presente. Alternativamente, las secuencias seleccionadas pueden ser amplificadas generalmente usando, por ejemplo, cebadores de PCR no específicos y la región objetivo amplificada es sondeada más tarde con respecto a una secuencia específica indicativa de una mutación. Las divulgaciones de las referencias arriba descriptas

se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todo propósito.

[00314] Los ácidos nucleicos para usar como sondas, por ejemplo, en métodos de amplificación *in vitro*, para usar como sondas de genes, o como componentes inhibidores típicamente son sintetizados químicamente de acuerdo con el método de triéster fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham Vyevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984). La purificación de polinucleótidos, en donde sea necesario, se realiza típicamente o bien por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio de aniones como se describe en Pearson *et al.*, *J. Chrom.*, 255:137 149 (1983). La secuencia de los polinucleótidos sintéticos puede ser verificada usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, Nueva York, *Methods in Enzymology*, 65:499.

[00315] Un medio alternativo para determinar el nivel de transcripción es la hibridación *in situ*. Los ensayos de hibridación *in situ* son bien conocidos y se describen en general en Angerer *et al.*, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987). En un ensayo de hibridación *in situ*, las células son fijadas a un soporte sólido, típicamente un portaobjetos de vidrio. Si se tiene que sondear un ADN, las células son desnaturalizadas con calor o álcali. Las células son puestas en contacto entonces con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la reasociación de sondas específicas que son marcadas. Las sondas son marcadas preferentemente con radioisótopos o reporteros fluorescentes.

Ejemplos

[00316] La presente invención se describirá con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se presentan con propósito ilustrativo, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en el arte reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden ser cambiados o modificados para dar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1.

[00317] Este Ejemplo describe el ensayo biológico usado para probar la actividad silenciadora de genes HBV de las 15 secuencias de siARN presentadas en la Tabla A.

[00318] Una secuencia genómica de HBV (número de acceso EU939600.1) fue editada para que coincidiera perfectamente con todos los siARNs candidatos. Específicamente, las siguientes cuatro regiones de secuencia, incluyendo 30 bp de secuencia flanqueadora en ambos extremos 5' y 3' para cada región de secuencia, conteniendo los sitios objetivo para cuatro siARNs candidatos fueron unidas en silicio: 212 a 803, 1062 a 1922, 2237 a 2460, y 2783 a 2862. Se insertaron seis mutaciones (posición 454 C>T; posición 598 T>C; posición 1206 A>C; posición 1287 A>C; y posición 1461 G>C, con relación a EU939600.1) para asegurar que todos los siARNs candidatos eran perfectamente complementarios a este fragmento objetivo de HBV de consenso sintético. El fragmento objetivo de HBV de consenso sintético fue sintetizado con los sitios de enzimas de restricción XhoI y NotI agregados al extremo 5' y 3', respectivamente, para facilitar la clonación en el vector psiCHECK-2 Dual Luciferasa. El sitio de clonación XhoI/NotI se encuentra entre el codón de detención y la señal de poliadenilación de Renilla luciferasa en el vector psiCHECK-2 Dual Luciferase.

[00319] La actividad silenciadora del gen HBV de los siARNs candidatos fue testeada midiendo la reducción de la actividad de Renilla luciferasa (R-Luc) con relación a la actividad de la luciferasa de luciérnaga (F-Luc) en el sistema de ensayo Dual-Glo (Promega, Madison, WI, USA). Brevemente, las células Cos-7 fueron sembradas a una densidad de 25.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades y transfectadas con 100 ng de plásmido reportero por cavidad usando Lipofectamine 2000. Después de incubación durante 4 horas a 37°C/5% de CO₂, se removió el medio y las células Cos-7 fueron transfectadas con siARNs de HBV por cuadruplicado a diversas concentraciones seguido por incubación durante otras 20 horas a las condiciones descriptas más arriba. La expresión de ambas luciferasas fue determinada por detección de luminiscencia. La expresión de R-Luc/F-Luc de muestras tratadas con HBV-siARN fue normalizada a la media de la expresión de R-Luc/F-Luc en células tratadas con siARN negativo (no direccionado). Como un control positivo, se incluyó un siARN contra R-Luc. La concentración inhibidora 50% (CI₅₀) fue calculada por la función XLfit (IDBS MathIQ).

Ejemplo 2.

[00320] Este Ejemplo describe todas las combinaciones posibles de "dos vías" de dos siARNs diferentes seleccionados del grupo de

siARNs denominados 1m a 15m (ver, Tabla A). El término "combinación" como se usa en los Ejemplos 2 y 3 de la presente solicitud, significa que las moléculas de siARNs combinadas están presentes juntas en la misma composición de materia (por ejemplo, disueltas juntas dentro de la misma solución; o presentes juntas dentro de la misma partícula de lípido; o presentes juntas en la misma formulación farmacéutica de partículas de lípido, aunque cada partícula de lípido dentro de la formulación farmacéutica puede incluir, o no, cada siARN diferente de la combinación de siARN). Las moléculas de siARNs combinadas usualmente no están unidas entre sí en forma covalente.

[00321] Los siARNs individuales son identificados cada uno con un nombre, 1m a 15m, como se muestra en la Tabla A. Cada número de siARN dentro de una combinación está separado con un guión (-); por ejemplo, la notación "1m-2m" representa la combinación del siARN número 1m y del siARN número 2m. El guión no significa que las moléculas de siARNs diferentes dentro de la combinación estén unidas entre sí en forma covalente. Diferentes combinaciones de siARN están separadas por punto y coma. El orden de los números de siARN en una combinación no es significativo. Por ejemplo, la combinación 1m-2m es equivalente a la combinación 2m-1m debido a que estas dos notaciones describen la misma combinación del siARN número 1m con el siARN número 2m.

[00322] Las combinaciones de siARN descritas en este Ejemplo son útiles, por ejemplo, en la práctica de la presente invención para tratar la infección por HBV y/o HDV en humanos, y para mejorar al menos un síntoma asociado con la infección por HBV y/o la infección por HDV.

[00323] Las combinaciones de siARN de dos vías de los siARNs 1m a 15m son: 1m-2m; 1m-3m; 1m-4m; 1m-5m; 1m-6m; 1m-7m; 1m-8m; 1m-9m; 1m-10m; 1m-11m; 1m-12m; 1m-13m; 1m-14m; 1m-15m; 2m-3m; 2m-4m; 2m-5m; 2m-6m; 2m-7m; 2m-8m; 2m-9m; 2m-10m; 2m-11m; 2m-12m; 2m-13m; 2m-14m; 2m-15m; 3m-4m; 3m-5m; 3m-6m; 3m-7m; 3m-8m; 3m-9m; 3m-10m; 3m-11m; 3m-12m; 3m-13m; 3m-14m; 3m-15m; 4m-5m; 4m-6m; 4m-7m; 4m-8m; 4m-9m; 4m-10m; 4m-11m; 4m-12m; 4m-13m; 4m-14m; 4m-15m; 5m-6m; 5m-7m; 5m-8m; 5m-9m; 5m-10m; 5m-11m; 5m-12m; 5m-13m; 5m-14m; 5m-15m; 6m-7m; 6m-8m; 6m-9m; 6m-10m; 6m-11m; 6m-12m; 6m-13m; 6m-14m; 6m-15m; 7m-8m; 7m-9m; 7m-10m; 7m-11m; 7m-12m; 7m-13m; 7m-14m; 7m-15m; 8m-9m; 8m-10m; 8m-11m; 8m-12m; 8m-13m; 8m-14m; 8m-15m; 9m-10m; 9m-11m; 9m-12m; 9m-13m; 9m-14m; 9m-15m; 10m-11m; 10m-12m; 10m-13m; 10m-14m; 10m-15m; 11m-12m; 11m-13m; 11m-14m; 11m-15m; 12m-13m; 12m-14m; 12m-15m; 13m-14m; 13m-15m; y 14m-15m.

Ejemplo 3.

[00324] Este Ejemplo describe todas las combinaciones posibles de “tres vías” de tres siARNs diferentes seleccionados del grupo de moléculas de siARNs denominadas 1m a 15m (ver, Tabla A). Los siARNs individuales están identificados cada uno con un nombre, 1m a 15m, como se muestra en la Tabla A. Cada número de siARN está separado con un guión (-); por ejemplo, la notación “1m-2m-3m” representa la combinación del siARN número 1m, el siARN número 2m y el siARN número 3m. El guión no significa que las diferentes moléculas de siARNs dentro de la combinación estén unidas en forma covalente entre sí. Diferentes combinaciones de siARN están separadas por punto y coma. El orden de los números de siARN en la combinación no es significativo. Por ejemplo, la combinación 1m-2m-3m es equivalente a la combinación 3m-2m-1m debido a que estas dos notaciones describen la misma combinación de siARN número 1m con siARN número 2m y siARN número 3m.

[00325] Las combinaciones de siARN descritas en este Ejemplo son útiles, por ejemplo, en la práctica de la presente invención para tratar la infección por HBV y/o por HDV en humanos, y para mejorar al menos un síntoma asociado con la infección por HBV y/o HDV.

[00326] Las combinaciones de siARN de tres vías de los siARNs 1m a 15m son: 1m-2m-3m; 1m-2m-4m; 1m-2m-5m; 1m-2m-6m; 1m-2m-7m; 1m-2m-8m; 1m-2m-9m; 1m-2m-10m; 1m-2m-11m; 1m-2m-12m; 1m-2m-13m; 1m-2m-14m; 1m-2m-15m; 1m-3m-4m; 1m-3m-5m; 1m-3m-6m; 1m-3m-7m; 1m-3m-8m; 1m-3m-9m; 1m-3m-10m; 1m-3m-11m; 1m-3m-12m; 1m-3m-13m; 1m-3m-14m; 1m-3m-15m; 1m-4m-5m; 1m-4m-6m; 1m-4m-7m; 1m-4m-8m; 1m-4m-9m; 1m-4m-10m; 1m-4m-11m; 1m-4m-12m; 1m-4m-13m; 1m-4m-14m; 1m-4m-15m; 1m-5m-6m; 1m-5m-7m; 1m-5m-8m; 1m-5m-9m; 1m-5m-10m; 1m-5m-11m; 1m-5m-12m; 1m-5m-13m; 1m-5m-14m; 1m-5m-15m; 1m-6m-7m; 1m-6m-8m; 1m-6m-9m; 1m-6m-10m; 1m-6m-11m; 1m-6m-12m; 1m-6m-13m; 1m-6m-14m; 1m-6m-15m; 1m-7m-8m; 1m-7m-9m; 1m-7m-10m; 1m-7m-11m; 1m-7m-12m; 1m-7m-13m; 1m-7m-14m; 1m-7m-15m; 1m-8m-9m; 1m-8m-10m; 1m-8m-11m; 1m-8m-12m; 1m-8m-13m; 1m-8m-14m; 1m-8m-15m; 1m-9m-10m; 1m-9m-11m; 1m-9m-12m; 1m-9m-13m; 1m-9m-14m; 1m-9m-15m; 1m-10m-11m; 1m-10m-12m; 1m-10m-13m; 1m-10m-14m; 1m-10m-15m; 1m-11m-12m; 1m-11m-13m; 1m-11m-14m; 1m-11m-15m; 1m-12m-13m; 1m-12m-14m; 1m-12m-15m; 1m-13m-14m; 1m-13m-15m; 1m-14m-15m; 2m-3m-4m; 2m-3m-5m; 2m-3m-6m; 2m-3m-7m; 2m-3m-8m; 2m-3m-9m; 2m-3m-10m; 2m-3m-11m; 2m-3m-12m; 2m-3m-13m; 2m-3m-14m; 2m-3m-15m; 2m-4m-5m; 2m-4m-6m; 2m-4m-7m; 2m-4m-8m; 2m-4m-9m; 2m-4m-10m; 2m-4m-11m; 2m-4m-12m; 2m-4m-13m; 2m-4m-14m; 2m-4m-15m; 2m-5m-6m; 2m-5m-7m; 2m-5m-8m; 2m-5m-9m; 2m-5m-10m; 2m-5m-

11m; 2m-5m-12m; 2m-5m-13m; 2m-5m-14m; 2m-5m-15m; 2m-6m-7m; 2m-6m-8m; 2m-6m-9m; 2m-6m-10m; 2m-6m-11m; 2m-6m-12m; 2m-6m-13m; 2m-6m-14m; 2m-6m-15m; 2m-7m-8m; 2m-7m-9m; 2m-7m-10m; 2m-7m-11m; 2m-7m-12m; 2m-7m-13m; 2m-7m-14m; 2m-7m-15m; 2m-8m-9m; 2m-8m-10m; 2m-8m-11m; 2m-8m-12m; 2m-8m-13m; 2m-8m-14m; 2m-8m-15m; 2m-9m-10m; 2m-9m-11m; 2m-9m-12m; 2m-9m-13m; 2m-9m-14m; 2m-9m-15m; 2m-10m-11m; 2m-10m-12m; 2m-10m-13m; 2m-10m-14m; 2m-10m-15m; 2m-11m-12m; 2m-11m-13m; 2m-11m-14m; 2m-11m-15m; 2m-12m-13m; 2m-12m-14m; 2m-12m-15m; 2m-13m-14m; 2m-13m-15m; 2m-14m-15m; 3m-4m-5m; 3m-4m-6m; 3m-4m-7m; 3m-4m-8m; 3m-4m-9m; 3m-4m-10m; 3m-4m-11m; 3m-4m-12m; 3m-4m-13m; 3m-4m-14m; 3m-4m-15m; 3m-5m-6m; 3m-5m-7m; 3m-5m-8m; 3m-5m-9m; 3m-5m-10m; 3m-5m-11m; 3m-5m-12m; 3m-5m-13m; 3m-5m-14m; 3m-5m-15m; 3m-6m-7m; 3m-6m-8m; 3m-6m-9m; 3m-6m-10m; 3m-6m-11m; 3m-6m-12m; 3m-6m-13m; 3m-6m-14m; 3m-6m-15m; 3m-7m-8m; 3m-7m-9m; 3m-7m-10m; 3m-7m-11m; 3m-7m-12m; 3m-7m-13m; 3m-7m-14m; 3m-7m-15m; 3m-8m-9m; 3m-8m-10m; 3m-8m-11m; 3m-8m-12m; 3m-8m-13m; 3m-8m-14m; 3m-8m-15m; 3m-9m-10m; 3m-9m-11m; 3m-9m-12m; 3m-9m-13m; 3m-9m-14m; 3m-9m-15m; 3m-10m-11m; 3m-10m-12m; 3m-10m-13m; 3m-10m-14m; 3m-10m-15m; 3m-11m-12m; 3m-11m-13m; 3m-11m-14m; 3m-11m-15m; 3m-12m-13m; 3m-12m-14m; 3m-12m-15m; 3m-13m-14m; 3m-13m-15m; 3m-14m-15m; 4m-5m-6m; 4m-5m-7m; 4m-5m-8m; 4m-5m-9m; 4m-5m-10m; 4m-5m-11m; 4m-5m-12m; 4m-5m-13m; 4m-5m-14m; 4m-5m-15m; 4m-6m-7m; 4m-6m-8m; 4m-6m-9m; 4m-6m-10m; 4m-6m-11m; 4m-6m-12m; 4m-6m-13m; 4m-6m-14m; 4m-6m-15m; 4m-7m-8m; 4m-7m-9m; 4m-7m-10m; 4m-7m-11m; 4m-7m-12m; 4m-7m-13m; 4m-7m-14m; 4m-7m-15m; 4m-8m-9m; 4m-8m-10m; 4m-8m-11m; 4m-8m-12m; 4m-8m-13m; 4m-8m-14m; 4m-8m-15m; 4m-9m-10m; 4m-9m-11m; 4m-9m-12m; 4m-9m-13m; 4m-9m-14m; 4m-9m-15m; 4m-10m-11m; 4m-10m-12m; 4m-10m-13m; 4m-10m-14m; 4m-10m-15m; 4m-11m-12m; 4m-11m-13m; 4m-11m-14m; 4m-11m-15m; 4m-12m-13m; 4m-12m-14m; 4m-12m-15m; 4m-13m-14m; 4m-13m-15m; 4m-14m-15m; 5m-6m-7m; 5m-6m-8m; 5m-6m-9m; 5m-6m-10m; 5m-6m-11m; 5m-6m-12m; 5m-6m-13m; 5m-6m-14m; 5m-6m-15m; 5m-7m-8m; 5m-7m-9m; 5m-7m-10m; 5m-7m-11m; 5m-7m-12m; 5m-7m-13m; 5m-7m-14m; 5m-7m-15m; 5m-8m-9m; 5m-8m-10m; 5m-8m-11m; 5m-8m-12m; 5m-8m-13m; 5m-8m-14m; 5m-8m-15m; 5m-9m-10m; 5m-9m-11m; 5m-9m-12m; 5m-9m-13m; 5m-9m-14m; 5m-9m-15m; 5m-10m-11m; 5m-10m-12m; 5m-10m-13m; 5m-10m-14m; 5m-10m-15m; 5m-11m-12m; 5m-11m-13m; 5m-11m-14m; 5m-11m-15m; 5m-12m-13m; 5m-12m-14m; 5m-12m-15m; 5m-13m-14m; 5m-13m-15m; 5m-14m-15m; 6m-7m-8m; 6m-7m-9m; 6m-7m-10m; 6m-7m-11m; 6m-7m-12m; 6m-7m-13m; 6m-7m-14m; 6m-7m-15m; 6m-8m-9m; 6m-8m-10m; 6m-8m-11m; 6m-8m-12m; 6m-8m-13m; 6m-8m-14m; 6m-8m-15m; 6m-9m-10m; 6m-9m-11m; 6m-9m-12m; 6m-9m-13m; 6m-9m-14m; 6m-9m-15m; 6m-10m-11m; 6m-10m-12m; 6m-10m-13m; 6m-10m-14m; 6m-10m-15m; 6m-11m-12m; 6m-11m-13m; 6m-11m-14m; 6m-11m-15m; 6m-12m-13m; 6m-12m-14m; 6m-12m-15m; 6m-13m-

14m; 6m-13m-15m; 6m-14m-15m; 7m-8m-9m; 7m-8m-10m; 7m-8m-11m; 7m-8m-12m; 7m-8m-13m; 7m-8m-14m; 7m-8m-15m; 7m-9m-10m; 7m-9m-11m; 7m-9m-12m; 7m-9m-13m; 7m-9m-14m; 7m-9m-15m; 7m-10m-11m; 7m-10m-12m; 7m-10m-13m; 7m-10m-14m; 7m-10m-15m; 7m-11m-12m; 7m-11m-13m; 7m-11m-14m; 7m-11m-15m; 7m-12m-13m; 7m-12m-14m; 7m-12m-15m; 7m-13m-14m; 7m-13m-15m; 7m-14m-15m; 8m-9m-10m; 8m-9m-11m; 8m-9m-12m; 8m-9m-13m; 8m-9m-14m; 8m-9m-15m; 8m-10m-11m; 8m-10m-12m; 8m-10m-13m; 8m-10m-14m; 8m-10m-15m; 8m-11m-12m; 8m-11m-13m; 8m-11m-14m; 8m-11m-15m; 8m-12m-13m; 8m-12m-14m; 8m-12m-15m; 8m-13m-14m; 8m-13m-15m; 8m-14m-15m; 9m-10m-11m; 9m-10m-12m; 9m-10m-13m; 9m-10m-14m; 9m-10m-15m; 9m-11m-12m; 9m-11m-13m; 9m-11m-14m; 9m-11m-15m; 9m-12m-13m; 9m-12m-14m; 9m-12m-15m; 9m-13m-14m; 9m-13m-15m; 9m-14m-15m; 10m-11m-12m; 10m-11m-13m; 10m-11m-14m; 10m-11m-15m; 10m-12m-13m; 10m-12m-14m; 10m-12m-15m; 10m-13m-14m; 10m-13m-15m; 10m-14m-15m; 11m-12m-13m; 11m-12m-14m; 11m-12m-15m; 11m-13m-14m; 11m-13m-15m; 11m-14m-15m; 12m-13m-14m; 12m-13m-15m; 12m-14m-15m; y 13m-14m-15m.

Ejemplo 4.

[00327] Este ejemplo describe un método que estableció un perfil inmunoestimulador para la molécula de siARNs de HBV individual.

[00328] Se recogió sangre humana entera de voluntarios adultos sanos en tubos vacutainers individuales que contenían heparina. Los tubos de recolección de sangre fueron invertidos 8 veces para evitar la coagulación y se mezclaron 1:1 con solución salina estéril antes de colocar en placas 180 microlitros (µL) de esta mezcla en placas de cultivo de tejido de poliestireno transparentes de 96 cavidades. Concurrentemente, se preparó una solución 10X de cada molécula de siARN LNP-formulada usando PBS como el diluyente. Se agregaron 20 microlitros de cada siARN 10X LNP-formulada a las cavidades que contenían 180 µL de sangre:solución salina para dar una concentración de siARN final de 600 nM. Cada molécula de siARN fue testada en cavidades por triplicado para cada dador. La sangre humana aislada fue incubada con las moléculas de siARNs individuales durante 24 horas a 37°C a 5% de CO₂. Post-incubación, el plasma fue cosechado centrifugando las placas de incubación durante 20 minutos a 1200 rpm. Al menos 125 µL de plasma de cada cavidad fue cosechado y transferido a una placa de 96 cavidades estéril y sellado con un sello de placas de acetato transparente.

[00329] El perfil inmunoestimulador para cada molécula de siARN fue generado cuantificando los niveles de inducción relativos de interferón alfa 2 (IFNα2) humano, el antagonista del receptor

interleuquina 1 (IL-1RA), la interleuquina 6 (IL-6), y la proteína quimioattractiva de monocitos-1 (MCP-1) comparado con el de la sangre entera humana incubada con PBS sólo vía ensayo de Luminex (Luminex Corp, Austin TX, USA). Los datos fueron capturados en un sistema Luminex 200 e interpolados usando xPonent 3.1.871.0 software usando un ajuste ponderado de 5 parámetros logístico a la curva estándar. Los triplicados de sangre entera humana fueron reunidos y ensayados en suplicado técnico. Los datos en la Tabla 1 son las medias de los niveles de cambio de la sangre tratada con PBS de doce dadores. Se usó un siARN químicamente no modificado (S secuencia de hebra 5'-3': GAAGGCCAGACGCGAAUUATT; SEQ ID NO:31) como un control positivo para este experimento que generó el siguiente aumento de nivel por encima de la sangre tratada con PBS para las citoquinas indicadas: 25.1 (IFNα2); 14.3 (IL-1RA); 1,226.5 (IL-6); y 51.6 (MCP-1).

Tabla 1				
	Cambio de nivel de sangre tratada con PBS			
Nombre:	IFNa2	IL-1RA	IL-6	MCP-1
1m	0,9	5,7	571,3	16,6
2m	1,0	12,9	1.986,8	43,3
3m	0,8	9,6	1.384,1	31,3
4m	1,1	13,3	2.109,1	45,7
5m	1,0	10,6	1.944,9	37,5
6m	0,9	13,2	1.403,1	43,7
7m	1,0	10,5	1.598,3	34,9
8m	1,0	12,2	1.429,3	45,4
9m	0,9	5,6	479,6	16,3
10m	0,7	9,3	945,7	27,2
11m	0,8	9,7	1.189,9	29,8
12m	0,8	9,4	1.111,4	28,0
13m	0,7	8,8	855,5	20,6
14m	1,0	13,5	1.967,7	49,0
15m	0,9	13,3	1.335,4	46,1

Ejemplo 5.

[00330] Como un medio para evaluar si la hebra sentido (S) de un siARN de HBV tenía la capacidad de causar un knockdown de genes

ARNi, se construyó un plásmido reportero a base de luciferasa que sirvió como un sensor para el silenciamiento de la hebra S. Las implicaciones potenciales del silenciamiento de la hebra S incluyen efectos "fuera de objetivo" no previstos o indeseados en genes endógenos que poseen complementariedad con la hebra S de los siARNs de HBV descritos en la presente. Un siARN ideal no demostraría una capacidad de silenciamiento de genes de la hebra S.

[00331] Para construir un plásmido reportero sensor de la hebra S, el fragmento objetivo de HBV descrito en el Ejemplo 1 fue clonado en la orientación inversa del complemento, entre el codón de detención de Renilla luciferasa y la señal de poliadenilación, del vector plásmido psi-CHECK2. El plásmido resultante, denominado "psi-HBV BACKWARD," transcribe un mRNA de HBV de Renilla luciferase que sólo permite el silenciamiento de ARNi por la hebra S y no la hebra antisentido. Es notable, porque el efecto de silenciamiento del gen ARNi es más robusto cuando existe una complementariedad perfecta entre el mRNA objetivo y la hebra de siARN en cuestión, este diseño reportero proporciona la mejor oportunidad para observar cualquier capacidad de silenciamiento de la hebra S. Complementariedad parcial sólo se esperaría para dar un silenciamiento más débil o ningún silenciamiento del gen. Ningún mRNA humano endógeno anotado es completamente complementario con la hebra S de los siARNs indicados en la lista en la Tabla A.

[00332] La actividad de silenciamiento de genes de los siARNs de HBV fue testada midiendo la reducción de la actividad de Renilla luciferasa (RLuc) con relación a la actividad de la luciferasa de luciérnaga (FLuc) en el sistema de Ensayo Reportero de Luciferasa Dual (DLR) (Promega, Madison, WI, USA). Se usaron células Cos-7 en un procedimiento de transfección inversa en placas de 96 cavidades. Cada cavidad contenía 25.000 células y 40 ng de plásmido más la concentración indicada de siARN complejoado con Lipofectamine 2000. Después de la incubación durante 24 horas a 37°C/5% de CO₂, se removió el medio y las células fueron procesadas para medición de la luminiscencia. Del kit del ensayo Reportero de Dual Luciferase®, se agregaron 50 ul de buffer de lisis pasivo (1x concentrado) a cada cavidad, protegido de la luz, y se agitó durante 30 min a 100 rpm. El lisado fue evaluado con respecto a la expresión de ambas luciferasas por detección luminiscente. Las relaciones RLuc/FLuc fueron calculadas y

normalizadas con respecto a células que fueron transfectadas con plásmido solamente ("control negativo").

[00333] Los datos informados son la media de cavidades transfectadas por triplicado (Tabla 2). Un valor % RLuc/FLuc vs. control negativo de 100 indicaría que no hay silenciamiento de genes.

Tabla 2

<u>Nombre</u>	psi-HBV BACKWARD		
	% RLuc/FLuc vs. control negativo		
	50	5	1
	ng/ml	ng/ml	ng/ml
3m	99,5	92,1	104,0
12m	98,6	97,6	106,6

[00334] Un siARN de control positivo direccionado directamente al gen de la Renilla luciferasa a las mismas dosis que las muestras experimentales dio valores promedio de % Rluc/Fluc vs. control negativo de 16,1, 37,3, y 91,1, respectivamente.

[00335] El silenciamiento de genes en el objetivo (es decir, empleando el plásmido reportero "psi-HBV") de los siARNs indicados usando el tipo de célula, el método de transfección y los niveles de dosis divulgados en este Ejemplo dieron los siguientes valores de % RLuc/FLuc vs. control negativo, demostrando que el silenciamiento en el objetivo de estos siARNs es realmente funcional en este tipo de célula y condiciones de transfección:

[00336] 3m: 9,7, 18,2, 54,7 a niveles de dosis de 50, 5, y 1 ng/ml, respectivamente; y

[00337] 12m: 11:2, 24,9, 59,5 a niveles de dosis de 50, 5, y 1 ng/ml, respectivamente.

[00338] Tomados en conjunto, estos resultados indican que las hebras S de los siARNs de HBV descritos en la presente no demuestran una capacidad de silenciamiento de genes de ARNi

apreciable. Por lo tanto, el potencial para que la hebra S provoque un silenciamiento indeseado de genes endógenos es bajo o insignificante.