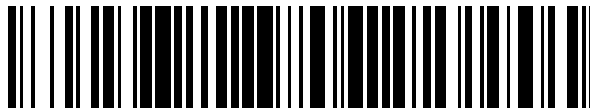


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 855**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/133 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09165106 .7**
96 Fecha de presentación: **09.07.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2277508**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2011**

54 Título: **Emulación de estructuras de lipoproteínas**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.09.2012

73 Titular/es:
Marina Biotech, Inc.
3830 Monte Villa Parkway
Bothell WA 98021-7266, US

72 Inventor/es:
Panzner, Steffen y
Siepi, Evgenios

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 386 855 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Emulación de estructuras de lipoproteínas.

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a liposomas que superan un bloqueo de la captación mediada por lipoproteína. Más específicamente, la invención se refiere a mejoras en o relacionadas con liposomas en los que una parte de sus grupos principales lípidos polares comprenden restos guanido o sus derivados.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Los liposomas tienen un amplio uso como vehículos para ingredientes activos. Los liposomas neutros o cargados negativamente son demandados a menudo para la administración de pequeñas moléculas de fármacos, mientras que los cargados positivamente (catiónicos) o el tipo de liposomas anfóteros recientemente introducido se usan principalmente para la administración de ácidos nucleicos a plásmidos u oligonucleótidos. Entre los ejemplos importantes de liposomas catiónicos usados para la administración de cargas de ácidos nucleicos se incluyen, pero no se limitan a Akinc y col., nat biotech (2008) 26 : 561 - 569; Chien y col., Cancer Gene Ther (2005) 12 : 321 - 328; de Fougerolles, Nat Rev Drug Discov (2007) 6 : 443 - 453; Kim y col., Mol Ther (2006) 14 : 343 - 350; Morrissey, nat biotech (2005) 23 : 1002 - 1007; Peer, Science (2008) 319 : 627 - 630 o Santel, Gene Ther (2006) 13 : 1222 - 1234.

15

20

[0003] El Documento WO 02/066012 da a conocer el concepto general de los liposomas anfóteros que tienen una fase estable a pH tanto bajos como neutros. El documento WO 02/066012 y también el documento WO 07/107304 describen un procedimiento para introducir en dichas partículas ácidos nucleico partiendo de un pH bajo. Se ha demostrado la aplicación de estos liposomas para la administración de ácidos nucleicos en Andreakos, Arthritis Rheum (2009) 60 : 994 - 1005. Además, el documento WO 08/043575 desvela estrategias para la optimización de la estabilidad, la fusogenicidad y la transfección celular de liposomas anfóteros.

25

[0004] Los liposomas anfóteros de acuerdo con las referencias anteriormente mencionadas son potentes transfectantes de células. Se ha observado sin embargo, que la función de algunos de estos liposomas podría bloquearse mediante la adición de algunos sueros, limitando por tanto potencialmente la actividad de estos liposomas para la dirección de algunas células *in vivo*. Esto se ilustra adicionalmente en el ejemplo 3.

30

[0005] Una investigación más detallada desveló que las proteínas eran mediadoras de este efecto inhibidor. Tal como se muestra en el ejemplo 4, un suero humano que es deficiente en lipoproteínas no es capaz de inhibir la captación de liposomas, tal como se indicó mediante la administración funcional de ARNip a las células estimuladas.

35

Objeto de la invención

[0006] Por tanto, ha sido un objeto de la invención proporcionar liposomas que puedan transfectar células en presencia de diversos sueros.

40

[0007] Otro objeto de la invención es proporcionar las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos liposomas en forma de un vehículo para la administración de agentes o ingredientes activos, incluyendo fármacos tales como fármacos de ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos y plásmidos en células o tejidos.

45

Resumen de la invención

[0008] La presente invención proporciona ensamblajes de lípidos, liposomas y su uso para la transfección de células de acuerdo con las reivindicaciones 1, 5 y 11. Se describen realizaciones ventajosas adicionales de la invención en las reivindicaciones dependientes.

50

[0009] Se ha encontrado que se puede conseguir una transfección resistente al suero con liposomas que tienen una superficie externa que comprende una mezcla de restos aniónicos y catiónicos; en la que al menos una porción de los restos catiónicos son grupos guanido.

55

Descripción detallada de la invención

[0010] Las lipoproteínas que competen con la transfección de liposomas comprenden una variedad de

estructuras, de acuerdo con su densidad, estas se denominan partículas quilomicrones, VLDL, LDL, IDL o HDL. En la ruta endógena, los quilomicrones se sintetizan en el revestimiento epitelial del intestino delgado y se ensamblan utilizando ApoB-48, una variante más corta del producto del gen ApoB. El intercambio adicional de lipoproteínas con partículas HDL conduce a la transferencia de ApoC-II y ApoE hasta la partícula quilomicrocónica, mediando la primera 5 la activación de la lipoproteína lipasa, una enzima necesaria para la liberación de los lípidos de la partícula. Los quilomicrones hidrolizados forman los denominados restos, que se capturan principalmente en el hígado mediante el reconocimiento de su porción ApoE. La síntesis, maduración, uso y recirculación de las partículas VLDL sigue la misma ruta, pero se inicia en el hígado y utiliza la proteína ApoB-100 como su unidad formadora de estructura. De nuevo, ApoE media la eventual captación y recirculación de los restos de VLDL, las partículas denominadas como 10 IDL (véase también <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein>).

[0011] ApoE comparte homología estructural con las apolipoproteínas A y C en que todas comprenden repeticiones en tándem anfifáticas de 11 aminoácidos. Los datos cristalográficos confirman la existencia de estructuras helicoidales anfifáticas extendidas para el fragmento ApoA-I y ApoE y desvelan también una 15 organización de carga mixta en la cara polar de estas hélices. Estos datos están públicamente disponibles en el banco de Datos de la Proteína RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) y la entrada 1AV1.pdb proporciona la estructura de la proteína de ApoA-I. Los aminoácidos 129 a 166 de 1lpe.pdb representan el fragmento de unión del receptor LDL de ApoE. En contraste a su similitud global, las tres apolipoproteínas muestran desviaciones específicas cuando se analiza su composición de aminoácidos. En ApoE, la arginina es el aminoácido catiónico que 20 prevalece en las repeticiones en tándem. En contraste, ApoA tiene cantidades iguales de lisina y arginina mientras que ApoC tiene un exceso de restos de lisina.

Tabla 1: Análisis de la composición de aminoácidos en repeticiones en tándem de apolipoproteínas relacionadas. Se obtuvieron datos de las secuencias de Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>).

Secuencia	ApoA1	ApoE	ApoC-II
Entrada de SwissProt	P02647	P02649	P02655
Criterios de valoración	68-267	80-255	23-101
Longitud	199	175	78
IP	5,55	9,16	4,66
nº de lisina	18	8	6
nº de arginina	14	25	1
nº de histidina	5	1	0
nº de ácido aspártico	10	8	4
nº de ácido glutámico	28	22	7
	ApoA1	ApoE	ApoC-II
Lisina (%)	9 %	5 %	8 %
Arginina (%)	7 %	14 %	1 %
Histidina (%)	3 %	1 %	0 %
Ácido aspártico (%)	5 %	5 %	5 %
Ácido glutámico (%)	14 %	13 %	9 %

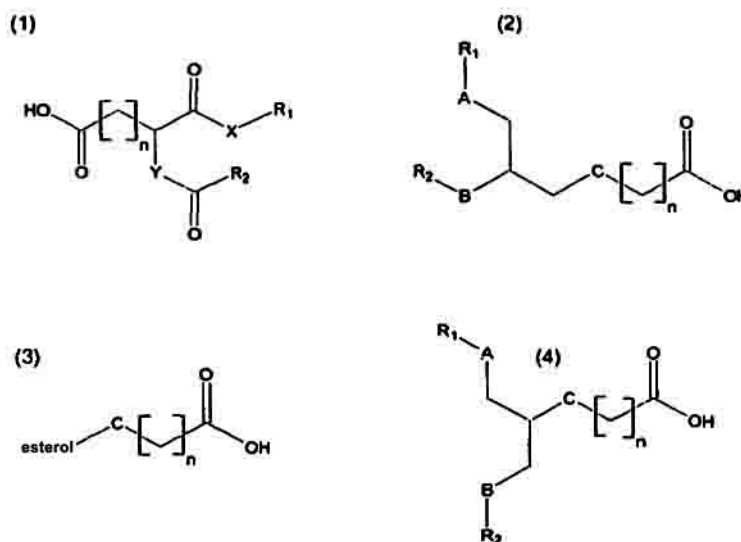
25 **[0012]** En resumen, la superficie polar de las lipoproteínas naturales está cubierta con apolipoproteínas, de las cuales ApoE es un motivo de unión común para la captación celular de estas partículas. Las porciones de ApoE expuestas al agua representan un mosaico de cargas aniónicas y catiónicas, en que las cargas aniónicas se crean a partir de los extremos carboxilo libres de restos de ácido aspártico y glutámico. Las cargas catiónicas comprenden 30 una mezcla de grupos amino y guanido estando presentes muy pocos imidazoles.

[0013] A fin de emular el modelo de reconocimiento del casete de unión de ApoE sobre la superficie de los liposomas, se pueden seguir diferentes alternativas. Es bien posible sintetizar el fragmento del péptido ApoE e injertar dichos péptidos en la superficie de liposomas. Esto ha sido demostrado por Mims y col., J Biol. Chem. 269, 35 20539 (1994); Rensen y col., Mol Pharmacol. 52, 445 (1997); Rensen y col., J. Lipid Res. 38, 1070 (1997); Sauer y col., Biochemistry 44, 2021 (2005) o Versluis y col., J Pharmacol. Exp. Ther 289, 1 (1999).

[0014] Una presentación directa de los restos cargados digeridos utilizando mezclas de diferentes lípidos cargados, que comprenden potencialmente de manera adicional lípidos neutros, darían como resultado una 40 estructura mucho más sencilla y eliminarían la necesidad de una costosa producción y derivatización de péptidos. Un considerable estímulo para dicha solución es la difusión planar de los grupos cargados dentro de la bicapa de lípidos; no ha estado claro, por tanto, si la afinidad de dicho ensamblaje menos organizado competiría eficazmente con las afinidades proporcionadas por las lipoproteínas auténticas.

Química de lípidos

[0015] Los lípidos aniónicos que comprenden restos carboxilos en sus grupos principales grandes polares son bien conocidos por los técnicos expertos. Los presentes ejemplos se pueden seleccionar de las estructuras (1) – 5 (4) siguientes,

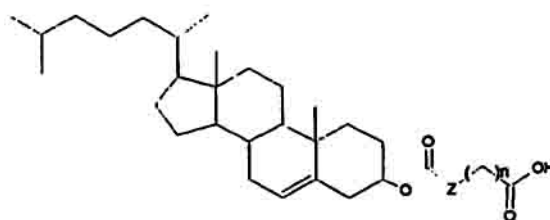


en las que n es cualquier número entre 0 y 29, X e Y son independientemente entre sí -O- o -NH- y R1 y R2 son independientemente entre sí un resto alquilo, alquenoilo o alquiniilo que tienen entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 o 2 enlaces insaturados, A, B o C son independientemente entre sí -O-, -NH-, -C(O)-O-, -O-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- o -NH-C(O)-O- y "esterol" puede ser un colesterol unido mediante su átomo C3.

[0016] La siguiente lista proporciona ejemplos específicos adicionales de lípidos que transportan un grupo carboxilo.

CHEMS	Hemisuccinato de colesterol
Chol-COOH o Chol-C1	Ácido colesteril-3-carboxílico
Chol-C2	Hemioxalato de colesterol
Chol-C3	Hemimalonato de colesterol
Chol-C3N	N-(Colesteril-oxicarbonil) glicina
Chol-C5	Hemiglutarato de colesterol
Chol-C6	Hemiadipato de colesterol
Chol-C7	Hemipimelato de colesterol
Chol-C8	Hemisuberato de colesterol
Chol-C12	Ácido colesterilhemidodecano dicarboxílico
Chol-C13N	Ácido 12-colesteriloxicarbonilaminododecanoico

[0017] Los ácidos colesterilhemidicarboxílico y los ácidos clesteriloxicarbonilaminocarboxílico de la siguiente fórmula general



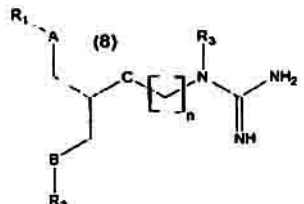
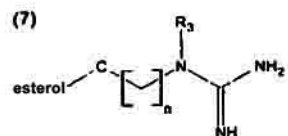
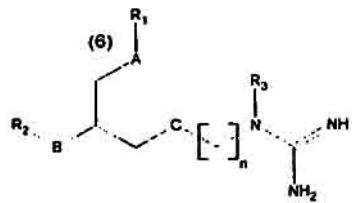
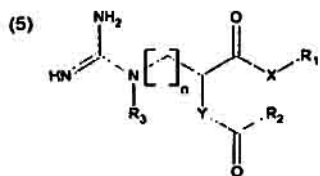
en la que Z es C o -NH- y n es algún número entre 0 y 29.

DGS o DG-Succ	Hemisuccinato de diacilglicerol (anclaje de la membrana sin especificar)
DOGS o DOG-Succ	Hemisuccinato de dioleoilglicerol
DMGS o DMG-Succ	Hemisuccinato de dimiristoilglicerol
DPGS o DPG-Succ	Hemisuccinato de dipalmitoilglicerol
DSGS o DSG-Succ	Hemisuccinato de diestearoilglicerol
POGS o POG-Succ	1-Palmitoil-2-oleoilglicerol-hemisuccinato
DOGM	Hemimalonato de dioleoilglicerol
DOGG	Hemiglutarato de dioleoilglicerol
DOGA	Hemiadipato de dioleoilglicerol
DMGM	Hemimalonato de dimiristoilglicerol
DMGG	Hemiglutarato de dimiristoilglicerol
DMGA	Hemiadipato de dimiristoilglicerol
DOAS	Ácido 4-((2,3-Dioleoil-propil)amino)-4-oxobutanoico
DOAM	Ácido 3-((2,3-Dioleoil-propil)amino)-3-oxopropanoico
DOAG	Ácido 5-((2,3-Dioleoil-propil)amino)-5-oxopentanoico
DOAA	Ácido 6-((2,3-Dioleoil-propil)amino)-6-oxohexanoico
DMAS	Ácido 4-((2,3-Dimiristoil-propil)amino)-4-oxobutanoico
DMAM	Ácido 3-((2,3-Dimiristoil-propil)amino)-3-oxopropanoico
DMAG	Ácido 5-((2,3-Dimiristoil-propil)amino)-5-oxopentanoico
DMAA	Ácido 6-((2,3-Dimiristoil-propil)amino)-6-oxohexanoico
DOP	Ácido 2,3-Dioleoil-propanoico
DOB	Ácido 3,4-Dioleoil-butanoico
DOS	Ácido 5,6-Dioleoil-hexanoico
DOM	Ácido 4,5-Dioleoil-pentanoico
DOG	Ácido 6,7-Dioleoil-heptanoico
DOA	Ácido 7,8-Dioleoil-octanoico
DMP	Ácido 2,3-Dimiristoil-propanoico
DMB	Ácido 3,4-Dimiristoil-butanoico
DMS	Ácido 5,6-Dimiristoil-hexanoico
DMM	Ácido 4,5-Dimiristoil-pentanoico
DMG	Ácido 6,7-Dimiristoil-heptanoico
DMA	Ácido 7,8-Dimiristoil-octanoico
DOG-GluA	Ácido Dioleoilglicerol-glucurónico (1 o 4 enlazado)
DMG-GluA	Ácido Dimiristoilglicerol-glucurónico (1 o 4 enlazado)
DO-CHA	Ácido Dioleoilglicerolhemiciclohexano-1,4-dicarboxílico
DM-CHA	Ácido Dimiristoilglicerolhemiciclohexano-1,4-dicarboxílico
PS	Fosfatidilserina (anclaje de membrana sin especificar)
DOPS	Dioleoilfosfatidilserina
DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
MA	Ácido mirístico
PA	Ácido palmítico
OA	Ácido oleico
LA	Ácido linoleico
SA	Ácido esteárico
NA	Ácido nervónico
BA	Ácido behénico

5 **[0018]** Cualquier derivado de dialquilo de los lípidos aniónicos que comprenden grupos acilo relacionados anteriormente está también comprendido dentro del alcance de la presente invención.

[0019] Se pueden seleccionar los lípidos aniónicos preferidos que tienen un grupo carboxilo entre el grupo de Chol-C1 a Chol-C16 incluyendo todos sus homólogos, en particular CHEMS. Se prefieren también los lípidos aniónicos DMGS, DPGS, DSGS, DOGS, POGS.

[0020] El técnico experto conoce también los lípidos catiónicos para uso con esta invención y comprenden, entre otras, las estructuras (5) – (8),

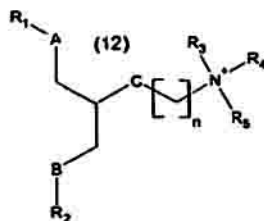
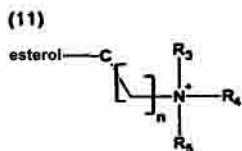
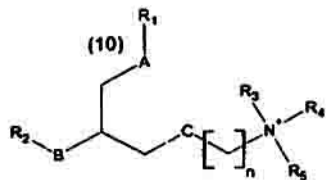
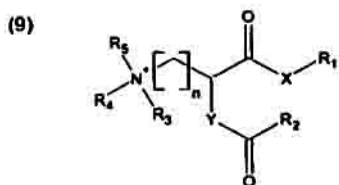


5 en la que n es cualquier número entre 0 y 29, X e Y son independientemente entre sí -O- o -NH- y R1, y R2 son independientemente entre sí un resto alquilo, alquenilo o alquinilo que tiene entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 o 2 enlaces insaturados, R3 es H o un resto alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo o arilo que comprende entre 0 y 8 átomos de carbono y 0, 1, 2 o 3 enlaces insaturados. A, B o c son independientemente entre sí -O-, -NH-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- o -NH-C(O)-O- y "esterol" puede ser un colesterol unido mediante su
10 átomo C3.

[0021] Algunos de estos lípidos se han presentado anteriormente en la bibliografía, por ejemplo en los documentos WO91/16024, WO97/43363, WO98/05678, WO01/55098, WO28137758, en el documento EP 0685234 o en el documento US 5965434.

15

[0022] Resulta evidente a partir del análisis anterior que además de los grupos guanido, los grupos principales catiónicos en la superficie del liposoma pueden comprender otros restos cargados.



20

[0023] Entre los otros lípidos catiónicos mencionados conocidos por los expertos en la técnica, dichos lípidos pueden transportar grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternizados como en las estructuras (9)-(12) siguientes :

25

en las que n es cualquier número entre 0 y 29, X e Y son independientemente entre sí -O- o -NH- y R1, y R2 son independientemente entre sí un resto alquilo, alquenilo o alquinilo que tiene entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 o 2 enlaces insaturados, R3, R4 y R5 son independientemente entre sí un resto H o un

resto alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo o arilo que comprende entre 0 y 8 átomos de carbono y 0, 1, 2 o 3 enlaces insaturados y R5 puede estar ausente, A, B, o C son independientemente entre sí -O-, -NH-, -C(O)-O-, -O-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -OC(O)-NH- o -NH-C(O)-O- y "ésterol" puede ser un colesterol unido mediante su átomo C3.

5

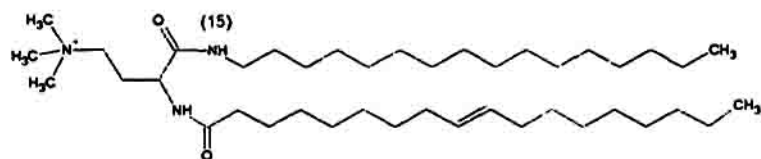
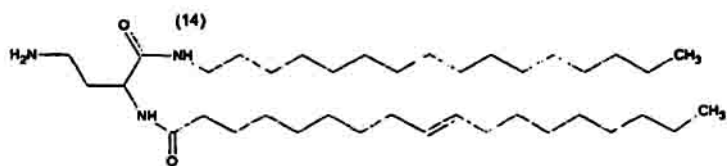
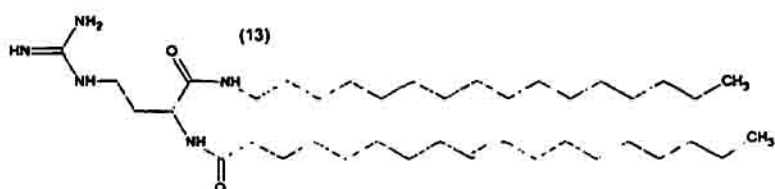
Ensamblajes de lípidos

[0024] Los componentes mencionados anteriormente se pueden ensamblar en diversas estructuras conocidas por el técnico experto. Estas pueden ser liposomas que comprenden una o numerosas bicapas individuales, otros ensamblajes de lípidos supramoleculares, vesículas que tienen un volumen interior dimensionable que proporciona una fase acuosa. Esta puede ser una emulsión de gotículas o estructuras en forma de ensamblajes de lipoplex, comprendiendo el último en muchas realizaciones complejos electrostáticos entre los lípidos y los ácidos nucleicos.

15 **[0025]** Se conoce en la técnica también que los lípidos neutros pueden ser parte de estos diversos ensamblajes de lípidos. Se usan a menudo lípidos neutros tales como colesterol o lípidos de ion libre tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiolina y similares para modular las propiedades de estos ensamblajes. El documento WO 08/043575 proporciona directrices específicas para los tipos y el uso de lípidos neutros y su impacto sobre la fusogenicidad y la estabilidad de los liposomas.

20

[0026] En una realización específica de esta invención, se combinó el guanidolípido catiónico PONA (palmitoiloleoil-nor-arginina, estructura 13) con diversos lípidos aniónicos tales como CHEMS o DMGS. Se variaron las relaciones de los lípidos catiónicos y aniónicos de una manera sistemática y las mezclas binarias resultantes se suministraron opcionalmente de manera adicional con 20 % en moles de colesterol. Las mezclas de lípidos individuales se transformaron en liposomas y se usaron para la encapsulación de un ARNip activo y un control. Cuando se ensayan en células HeLa, se observó la inhibición eficaz y específica de la viabilidad celular para la mayor parte de las formulaciones ensayadas, tal como se ha demostrado en el ejemplo 5. La actividad no se vio afectada o solo marginalmente por la presencia de suero humano o de ratón.



30

[0027] En el ejemplo 6, se combinó el lípido aniónico CHEMS con derivados de PONA, en los que el resto

guanido se sustituyó mediante un grupo amino (PONamina) o un grupo amonio cuaternizado (PONamonio) tal como se muestra en las estructuras (14) y (15). De nuevo, las relaciones entre los componentes lípidos aniónicos y catiónicos se variaron sistemáticamente y un 20 % de colesterol estuvo presente en todas las mezclas de lípidos. Se formuló el material en liposomas y se usó para la encapsulación de ARNip activo y del control. Se ensayaron en células HeLa, se observó la inhibición eficaz y específica de la viabilidad celular para todas las formulaciones que comprendían un exceso molar de lípidos catiónicos. Para las mezclas que comprendían cantidades molares mayores del lípido aniónico CHEMS, se observó la mejor actividad en combinaciones con PONA, a la vez que las combinaciones de PONamina : CHEMS fueron solo eficaces en algunos casos. Las combinaciones de PONamonio : CHEMS no fueron eficaces cuando se utilizó un exceso de lípido aniónico.

10

[0028] Más aún, entre las mezclas que comprenden un exceso del lípido aniónico CHEMS, la actividad de transfección de las combinaciones PONA : CHEMS se vio solo afectada marginalmente por la presencia de suero humano o de ratón, mientras que la actividad de las combinaciones de PONamina : CHEMS se suprimió de manera completa en presencia de suero de ratón. Las formulaciones de PONamonio permanecieron inactivas en presencia de sueros.

15

[0029] Los datos combinados apoyan una captación preferida de combinaciones de lípidos que comprenden guanidolípidos en combinación con lípidos carboxílicos. Esto puede relacionarse con las condiciones mecanicísticas realizadas anteriormente. La actividad constante y elevada de las formulaciones que tienen un exceso de componente lípido catiónico puede deberse a la interacción electrostática entre estas partículas y la superficie celular, que sin embargo no es específica. En línea con esta visión se encuentra el hecho de que la actividad de las formulaciones catiónicas ni depende de la naturaleza del lípido aniónico ni del catiónico.

20

[0030] Para identificar las realizaciones preferidas de esta invención, se combinó el guanidolípido PONA con CHEMS, DMGS o DOGS. De nuevo, se llevó a cabo una variación sistemática de las relaciones del compuesto lípido aniónico y del compuesto lípido catiónico en las respectivas mezclas binarias y se suministraron adicionalmente las formulaciones con 0, 20 o 40 % en moles de colesterol. Cuando se ensayaron como anteriormente, la gran mayoría de las formulaciones fueron activas en la inhibición de la proliferación celular de las células HeLa con una CI50 que era inferior de 6 nM (véase el ejemplo 7). Una comparación entre las concentraciones necesarias para la eficacia del ARNip activo e inactivo, sin embargo, desveló sustanciales diferencias entre las formulaciones. Una medida de dicha comparación es la relación entre los valores de la CI50 para ambos ARNip, expresada aquí como la relación SCR/PLK. Solo las formulaciones seleccionadas alcanzaron valores significativamente mayores de 5. Incluso las formulaciones más preferidas tienen la SCR/PLK \geq 10. Sorprendentemente, todas estas formulaciones preparadas pueden caracterizarse por su relación entre el componente lípido aniónico y el catiónico, que aquí es menor de 1.

25

30

35

[0031] Esta invención identifica la química del grupo principal grande lípido específico como crítica para la captación en algunas células en la presencia de sueros inhibidores de otra forma. Con preferencia, las combinaciones de lípidos aniónicos que comprenden grupos carboxilo y lípidos catiónicos que comprenden restos guanido que dan como resultado las propiedades deseadas.

40

[0032] Entre los liposomas con dichas características, aquellos que tienen un exceso molar del lípido aniónico sobre el catiónico tienen características concretas de alta seguridad en las que la viabilidad de las células ensayadas no se vio afectada por los liposomas formados a partir de estos materiales, sino que secuestraban un ARNip no relacionado.

45

Cargas de los liposomas de esta invención

[0033] Tal como se ha presentado anteriormente, los ensamblajes de liposomas o lípidos de esta invención encapsulan al menos un agente activo, esto se puede extender a otras numerosas realizaciones. Dicho agente activo puede comprender un fármaco. En algunas realizaciones, dicho agente activo puede comprender un ácido nucleico.

50

[0034] Sin estar limitado a dicho uso, los ensamblajes de liposomas o lípidos descritos en la presente invención son muy adecuados para el uso como vehículos de fármacos basados en ácidos nucleicos tales como por ejemplo oligonucleótidos, polinucleótidos y plásmidos de ADN. Estos fármacos se clasifican en ácidos nucleicos que codifican una o más secuencias específicas para las proteínas, polipéptidos o ARN y en oligonucleótidos que pueden regular específicamente los niveles de expresión de la proteína o afectar la estructura de la proteína a través, entre otras, de interferencia con corte y empalme y truncamiento artificial.

55

- [0035]** En algunas realizaciones de la presente invención, por tanto, el agente terapéutico basado en ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico que sea capaz de transcribirse en una célula de vertebrado en uno o más ARN, los mencionados ARN pueden ser ARNm, ARNsh, ARNip o ribozimas, en las que dicho ARNm codifica una o más proteínas o polipéptidos. Dichos ácidos nucleicos terapéuticos pueden ser plásmidos de ADN circular, construcciones de ADN lineal, vectores de tipo MIDGE (por sus siglas en inglés: expresión génica definida inmunogénicamente de forma minimalista) tal como se da a conocer en los documentos WO 98/21322 o DE 19753182, o ARNm listo para la traducción (por ejemplo, documento EP 1392341).
- 10 **[0036]** En otras realizaciones de la invención se pueden usar oligonucleótidos que puedan dirigir ácidos nucleicos o proteínas existentes. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar un gen específico, de tal manera que dicho oligonucleótido se adapte a atenuar o modular la transcripción, modificar el procesamiento de la transcripción o interferir de otra forma con la expresión de la proteína. El término "ácido nucleico diana" abarca el ADN que codifica un gen específico, así como los ARN derivados de dicho ADN, que son ARNprem o ARNm. Una hibridación
15 específica entre el ácido nucleico diana y uno o más oligonucleótidos dirigidos contra dichas secuencias puede dar como resultado una inhibición o modulación de la expresión de la proteína. Para conseguir dicho direccionamiento específico, el oligonucleótido deberá comprender adecuadamente un tramo continuo de nucleótidos que sea sustancialmente complementario del ácido nucleico diana.
- 20 **[0037]** Los oligonucleótidos que cumplen los criterios anteriormente mencionados pueden desarrollarse con numerosas químicas y topologías diferentes. Los oligonucleótidos pueden comprender nucleósidos que se producen o modifican naturalmente que comprenden, pero no se limitan a ADN, ARN, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos no bloqueados (UNA) 2'O-metil ARN (2'Ome), 2'O-metoxietil ARN (2'MOE) en sus formas fosfato o fosfotioato o Morfolinos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o
25 bicatenarios.
- [0038]** Los oligonucleótidos son estructuras polianiónicas que tienen 8-60 cargas. En la mayor parte de los casos, estas estructuras son polímeros que comprenden nucleótidos. La presente invención no se limita a un mecanismo concreto de acción de los oligonucleótidos y no es necesaria una comprensión del mecanismo para
30 practicar la presente invención. Los mecanismos de acción de los oligonucleótidos pueden variar y pueden comprender, entre otros, efectos sobre el corte y empalme, transcripción, transporte nuclear-citoplásmico y traducción.
- [0039]** En una realización preferida de la invención, se pueden usar oligonucleótidos monocatenarios, incluyendo, pero sin limitarse a oligonucleótidos basados en ADN, ácidos nucleicos bloqueados, oligonucleótidos 2' modificados y otros, comúnmente conocidos como oligonucleótidos de sentido contrario. El esqueleto o la base o las modificaciones de azúcares pueden incluir, pero no se limitan a, fosfotioato ADN (PTO), 2'O-metil ARN (2'Ome), 2'Fluoro ARN (2'F), 2' O-metoxietil-ARN (2'MOE), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), N3'-P5' fosfoamidatos (NP), ácidos 2'fluoroarabino nucleicos (FANA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos no bloqueados
40 (UNA), Morfolino fosfoamidato (Morfolino), ácido ciclohexeno nucleico (CeNa), ADN triciclo (ADNtc) y otros. Además, se conocen en la técnica las químicas mixtas que se construyen a partir de más de una única especie de nucleótido como copolímeros, copolímeros en bloque o gáprmeros o en otras disposiciones.
- [0040]** Además de los oligonucleótidos anteriormente mencionados, la expresión de la proteína puede inhibirse también usando moléculas de ARN bicatenario que contienen los motivos de la secuencia complementaria. Dichas moléculas de ARN se conocen en la técnica como moléculas de ARNip (por ejemplo, documentos WO 99/32619 o WO 02/055693). Otros ARNip comprenden ARNip monocatenarios o ARNip bicatenarios que tienen una o más cadenas continuas. De nuevo, se han adaptado diversas químicas a este tipo de oligonucleótidos. También, se conocen en la técnica sistemas híbridos de ADN / ARN. Otras variedades de ARNip comprenden construcciones
50 tricatenarias, en las que dos cadenas más pequeñas se hibridan a una cadena más larga común, la meroduplex así denominada o los ARNsisi que tienen muescas o huecos en su arquitectura.
- [0041]** En otra realización de la presente invención, se pueden usar oligonucleótidos señuelo. Estas moléculas de ADN bicatenario y sus modificaciones químicas no se dirigen a ácidos nucleicos, sino a los factores de transcripción. Esto significa que los oligonucleótidos señuelo se unen a las proteínas de unión a ADN específicas de
55 secuencia e interfieren con la transcripción (por ejemplo, Cho-Chung, y col. en Curr. Opin. Mol. Ther., 1999).
- [0042]** En una realización adicional de la invención, se pueden usar oligonucleótidos que pueden influenciar la transcripción mediante la hibridación en condiciones fisiológicas con la región promotora de un gen. De nuevo, se

pueden adaptar diversas químicas a este tipo de oligonucleótidos.

[0043] En una realización aún más alternativa de la invención, se pueden usar ADNzimas. Las ADNzimas son oligonucleótidos monocatenarios y sus modificaciones químicas con actividad enzimática. Las ADNzimas típicas, conocidas como el modelo "10-23" son capaces de escindir el ARN monocatenario en sitios específicos en condiciones fisiológicas. El modelo 10-23 de ADNzimas tiene un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos muy conservados, flanqueado por 2 dominios de reconocimiento de sustratos complementarios con una secuencia diana en el ARN. La escisión de los ARNm diana puede dar como resultado su destrucción y la recirculación de las ADNzimas y de múltiples sustratos de escisión.

10

[0044] En otra realización adicional de la invención, se pueden usar ribozimas. Las ribozimas son oligorribonucleótidos monocatenarios y sus modificaciones químicas con actividad enzimática. Se pueden dividir operativamente en dos componentes, una estructura de tallo-bucle conservada que forma el núcleo catalítico y las secuencias que la flanquean que son inversamente complementarias a las secuencias que rodean el sitio diana en una transcripción del ARN dada. Las secuencias flanqueantes pueden conferir especificidad y pueden constituir generalmente 14-16 nt en total, extendiéndose en ambos lados del sitio diana seleccionado.

[0045] En una realización más adicional de la invención, se pueden utilizar aptámeros para dirigirse a proteínas. Los aptámeros son macromoléculas compuestas por ácidos nucleicos, tales como ARN o ADN, y sus modificaciones químicas que se unen estrechamente a una diana molecular específica y tienen normalmente 15-60 nt de longitud. La cadena de nucleótidos puede formar interacciones intramoleculares que pliegan la molécula en un complejo con forma tridimensional. La forma del aptámero le permite unirse estrechamente contra la superficie de su molécula diana, que incluye, pero no se limita a proteínas ácidas, proteínas básicas, proteínas de membrana, factores de transcripción y enzimas. La unión de las moléculas de aptámeros puede influenciar la función de una molécula diana.

[0046] Todos los oligonucleótidos anteriormente mencionados pueden variar de longitud entra tan poco como 5 o 10, preferiblemente 15 e incluso de manera más preferible 18, y 50, preferiblemente 30 y más preferiblemente 25, nucleótidos por cadena. Más específicamente, los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos de sentido contrario de 8 a 50 nucleótidos de longitud que catalizan la degradación mediada por ARNseH de su secuencia diana o la traducción en bloque, o redirigen el corte y empalme o actúan como antagomirs; puede tratarse de ARNip de 15 a 30 pares de bases de longitud; pueden representar adicionalmente oligonucleótidos señuelo de 15 a 30 pares de bases de longitud; pueden ser oligonucleótidos complementarios que influyen la transcripción del ADN genómico de 15 a 30 nucleótidos de longitud; pueden representar además ADNzimas de 25 a 50 nucleótidos de longitud o ribozimas de 25 a 50 nucleótidos de longitud o aptámeros de 15 a 60 nucleótidos de longitud. Dichos subtipos de oligonucleótidos se definen a menudo funcionalmente y pueden ser idénticos o diferentes o compartir alguna, pero no todas las características de su naturaleza o arquitectura química sin afectar sustancialmente las enseñanzas de esta invención. El ajuste entre el oligonucleótido y la secuencia diana es preferiblemente perfecto con cada base del oligonucleótido que forma una pareja de bases con su base complementaria en el ácido nucleico diana sobre un tramo continuo de los numerosos oligonucleótidos anteriormente mencionados. La pareja de secuencias puede contener una o más discordancias en el interior de dicho tramo continuo de parejas de bases, aunque esto es menos preferido. En general, el tipo y la composición química de dichos ácidos nucleicos tiene poco impacto sobre el comportamiento de los liposomas inventivos como vehículos que están *in vivo* o *in vitro*, y el técnico experto puede encontrar otros tipos de oligonucleótidos o ácidos nucleicos adecuados para la combinación con los liposomas anfóteros inventivos.

[0047] En algunos aspectos y, tal como se ha demostrado en esta invención, los liposomas de acuerdo con la presente invención son útiles para transfectar células *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

50 Ejemplos

[0048] Las enseñanzas de esta invención pueden entenderse mejor teniendo en cuenta los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no suponen ningún límite a las enseñanzas de esta invención.

55 *Ejemplo 1 – Producción de liposomas, caracterización y encapsulación de ARNip*

[0049] Se prepararon liposomas utilizando procedimientos tales como los dados a conocer en el documento WO 07/107304. Más específicamente, se disolvieron lípidos en isopropanol y se produjeron liposomas añadiendo ARNip en NaAc 20 mM, sacarosa 300 mM, pH 4,0 (pH ajustado con HAC) a la mezcla de lípido alcohólico, dando

como resultado una concentración final de alcohol del 30 %. Las suspensiones liposómicas formadas se ajustaron a pH 7,5 agregando dos veces el volumen de Na₂HPO₄ 136 mM, NaCl 100 mM (pH 9), dando como resultado una concentración final de lípidos de 3 mM y una concentración final de isopropanol del 10 %.

5 **[0050]** Los liposomas se caracterizaron con respecto a su tamaño de partículas utilizando dispersión dinámica de luz (MALVERN 3000HSA).

[0051] ARNip activo ARNm de PLK-1 humano y de ratón dirigido al extremo enromado de 21 mer como en Hauptenthal y col., Int J Cancer (2007), 121 : 206-210.

10

[0052] ARNip del control: de 21 mer de la misma fuente.

Ejemplo 2 – Cultivo celular general y ensayo de proliferación

15 **[0053]** Se obtuvieron células HeLa de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) y se mantuvieron en DMEM (Gibco-Invitrogen) y se suplementaron con FCS al 10 %. Se plaquearon las células a una densidad de 2,5*10⁴ células/ml y se cultivaron en 100 µl de medio a 37°C en CO₂ al 5 %. Después de 16 h, los liposomas que contenían el ARNip se diluyeron y se añadieron 10 µl a las células para dar como resultado concentraciones finales entre 0,4 y 100 nM de Plk1 o de ARNip desorganizado; se añadieron también 10 µl de
20 tampón de dilución a las células no tratadas y en pocillos sin células. Las placas de cultivos celulares se incubaron durante 72 horas a 37°C en CO₂ al 5 %.

[0054] Se determinó la proliferación/viabilidad celular utilizando el ensayo de Viabilidad Celular CellTiter-Blue (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del suministrador

25

Ejemplo 3 – Inhibición de la transfección mediante sueros

[0055] Se introdujeron liposomas de DOPAP : DMGS : Colesterol (24 : 36 : 40 % en moles) con ARNip activo y del control como anteriormente y se incubaron 25 µl de los liposomas con 75 µl de sueros de diferentes especies
30 (SIGMA-Aldrich) durante 30 min. Tras esto, se añadieron liposomas a las células, se continuó la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente.

[0056] Cuando se incubaron sin suero, la administración del ARNip activo dio como resultado una fuerte inhibición de la proliferación celular. Tal como se demostró en la tabla 2 siguiente, este proceso se inhibió mediante
35 la adición de sueros.

Tabla 2: Inhibición de la transfección celular mediante sueros de diferente origen.

Tipo de ARNip	Concentración de ARNip	Suero	Viabilidad celular (%)
PLK1	50 nM	no	7
PLK1	50 nM	Ser humano	98
PLK1	50 nM	Hámster	80
PLK1	50 nM	Rata	108
PLK1	50 nM	Ratón	102
No	No	No	100

Ejemplo 4 – La inhibición es dependiente de lipoproteína

40

[0057] Se incubaron liposomas como en el ejemplo 3 con suero humano desprovisto de algunos factores de complementos o lipoproteínas (SIGMA-Aldrich) como anteriormente y se analizaron para su capacidad de mediar en el efecto del ARNi sobre células HeLa.

45 **[0058]** Tal como se demostró en la tabla 3, se puede restaurar la eficacia de la transfección mediante un agotamiento de las lipoproteínas. La retirada de los factores de complemento no fue eficaz.

Tabla 3: Restauración de la transfección celular en sueros deficientes en varios factores

Tipo de ARNip	Concentración de ARNip	Suero	Viabilidad celular (%)
PLK1	50 nM	no	7
PLK1	50 nM	Ser humano, completo	98

PLK1	50 nM	Ser humano, sin factor C3 del complemento	91
PLK1	50 nM	Ser humano, sin factor C9 del complemento	98
PLK1	50 nM	Ser humano, deficiente en lipoproteína	18
No	No	No	100

Ejemplo 5 – Transfección resistente al suero

[0059] Se construyó una serie de liposomas a partir de PONA : Lípido aniónico : Colesterol (x : y.20 % en moles) y se introdujeron con ARNip activo y del control como en el ejemplo 1. En esta serie, la relación entre el componente PONA catiónico y los lípidos aniónicos CHEMS o DMGS se varió sistemáticamente entre 0,33 y 2 tal como se ha indicado en la tabla. Los liposomas que tenían una relación del lípido catiónico : aniónico de 1 o más se suministraron adicionalmente con 2 % en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación está indicada por un “ + ” en la tabla.

[0060] Se hicieron crecer células HeLa y se mantuvieron como en el ejemplo 2 y se añadieron sueros de origen humano o de ratones (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. tras esto, se añadieron los liposomas a las células en concentraciones entre 50 pM y 50 nM, se continuó la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de la transfección se expresa aquí como CI50, la concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 %. Unos valores bajos de CI50 representan por tanto una transfección muy eficaz.

[0061] Es evidente a partir de los resultados en la tabla 4 que la adición de sueros afecta solo marginalmente a la transfección del ARNip mediada por los liposomas del ejemplo. Se observa todavía alguna inhibición para los liposomas de PONA : CHEMS que comprenden bajas cantidades del lípido aniónico (relaciones de 0,33 y 0,5, fuerte inhibición concreta con suero de ratón)

Tabla 4: Eficacia de la transfección de liposomas que comprenden restos guanido en presencia de sueros

Relación de lípido catiónico/aniónico	CHEMS							
	0,33	0,50	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
Sin suero	38,54	1,21	0,40	0,56	1,83	1,61	0,70	1,42
Suero humano	199,00	2,10	0,62	1,13	2,16	1,92	1,70	1,83
Suero de ratón	199,00	50,00	1,56	1,94	2,47	1,90	0,76	1,44
Sin suero	DMGS							
			0,23	0,54	0,01	0,01		
Suero humano			1,50	2,39	2,88	2,21		
Suero de ratón			0,67	0,69	1,41	1,81		

Ejemplo 6 – Criticidad del grupo principal grande guanido

[0062] Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones sistemáticamente variantes entre los componentes lípidos catiónicos y aniónicos y se introdujeron con ARNip como en el ejemplo 5. Los componentes lípidos catiónicos eran PONA, PON amina y PONamónio, el lípido aniónico era CHEMS y el contenido de colesterol se fijo en 20 % en moles. Los liposomas que tenían una relación del lípido catiónico : aniónico de 1 o más se suministraron adicionalmente con 2 % en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación se indica por un “ + ” en la tabla.

[0063] Se hicieron crecer células HeLa y se mantuvieron como en el ejemplo 2 y se añadieron sueros de origen humano y de ratones (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. Tras esto, se añadieron los liposomas a las células en concentraciones entre 50 pM y 50 nM, se continuó la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de la transfección se expresa aquí como CI50 como en el ejemplo 5.

[0064] Es evidente a partir de los datos de la tabla 5, que solo PONA, pero ni PONamina ni siquiera PONamónio median en la transfección de células HeLa en presencia de suero. Esto es más sorprendente en el caso de suero de ratón, que inhibe la transfección más agresivamente. Un exceso de componentes lípidos catiónicos

compensa en cierta la pérdida de actividad mediada por suero, pero esto puede deberse a la adsorción electrostática no específica de estos liposomas en las células.

Tabla 5: Criticidad del grupo del grupo principal grande guanido para la transfección de células resistente a suero

	PONA							
Relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
Sin suero	42,9	1,8	0,6	1,0	4,1	5,4	2,4	6,8
Suero humano	80,0	2,5	2,2	2,0	1,8	2,8	6,1	5,2
Suero de ratón	80,0	31,1	55,0	5,7	2,1	5,3	8,1	7,5
	PONamina							
Relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
Sin suero	3,1	65,0	7,5	100,0	3,0	5,2	3,0	2,5
Suero humano	100,0	55,0	11,9	100,0	2,2	2,8	6,1	5,1
Suero de ratón	70,0	100,0	100,0	100,0	75,0	70,0	39,3	8,7
	PONamonio							
Relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
Sin suero	80,0	100,0	90,0	90,0	65,0	9,5	9,5	5,2
Suero humano	95,0	90,0	90,0	80,0	90,0	11,8	12,4	15,7
Suero de ratón	85,0	100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	75,0	55,0

5

Ejemplo 7 – Optimización de la composición del liposoma

[0065] Se produjeron series de liposomas para las que se había variado sistemáticamente las relaciones entre los componentes lípidos catiónicos y aniónicos y se introdujeron con ARNip como en el ejemplo 5. El componente lípido catiónico era PONA, los lípidos aniónicos fueron CHEMS, DMGS o DOGS y se varió el contenido de colesterol entre 0 y 40 % en moles. Los liposomas que tenían una relación de lípido catiónico : aniónico de 1 o más, pero también alguno de los otros liposomas se suministraron adicionalmente con 2 % en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación se indica por un “ + ” en la tabla.

15

[0066] Se hicieron crecer células HeLa y se mantuvieron como en el ejemplo 2 y se añadieron liposomas a las células en concentraciones entre 6 nM y 200 nM, se continuó la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de la transfección se expresa aquí como CI50 como en los ejemplos anteriores. Además, se determinó la CI50 para los liposomas que transportaban el ARNip inactivo (SCR) y se determinó la relación entre CI50 (SCR) y CI50 (PLK1). Un valor alto para este parámetro indica una inhibición muy específica de la viabilidad celular por el ARNip de PLK1, contribuyeron efectos no específicos bajos en el vehículo y bajos niveles de citotoxicidad en general.

20

Tabla 6: Resultados de la optimización de CHEMS. Los valores de CI50 más bajos y más altos detectables son de 6 y 200 nM, respectivamente

25

PLK	0,33	0,33 +	0,5	0,5 +	0,67	0,67 +	0,82	0,82 +	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	44	77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
20 % de Chol	54	79	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
40 % de Chol	67	94	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
SCR	0,33	0,33 +	0,5	0,5 +	0,67	0,67 +	0,82	0,82 +	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	90	86	113	152	23	200	16	21	15	16	14	11
20 % de Chol	73	90	109	128	200	200	26	23	21	11	16	10
40 % de Chol	94	117	198	200	200	200	6	6	30	14	27	12
SCR/PLK	0,33	0,33 +	0,5	0,5 +	0,67	0,67 +	0,82	0,82 +	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	2,05	1,12	18,86	25,33	3,81	83,33	2,60	3,52	2,50	2,68	2,30	1,84

ES 2 386 855 T3

SCR/PLK	0,33	0,33 +	0,5	0,5 +	0,67	0,67 +	0,82	0,82 +	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
20 % de Chol	1,37	1,14	18,10	21,39	83,33	83,33	4,26	3,77	3,45	1,84	2,65	1,69
40 % de Chol	1,40	1,24	32,96	83,33	83,33	83,33	1,00	1,00	5,00	2,39	4,48	1,97

Tabla 7: Resultados de la optimización de CHEMS. Los valores de CI50 más bajos y más altos detectables son de 6 y 200 nm, respectivamente.

PLK	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	98	200	200	188	6	6	6	6
20 % de Chol	6	6	6	6	6	6	6	6
40 % de Chol	6	6	6	6	6	6	6	6
SCR	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	200	200	200	158	14	6	10	14
20 % de Chol	200	54	8	8	13	9	9	10
40 % de Chol	155	23	11	6	6	14	9	12
SCR/PLK	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	5,11	Sin efecto	Sin efecto	2,60	2,50	2,68	2,30	1,84
20 % de Chol	1,37	18,10	83,33	4,26	3,45	1,84	2,65	1,69
40 % de Chol	1,40	32,96	83,33	1,00	5,00	2,39	4,48	1,97

5 Tabla 8: Resultados de la optimización de CHEMS. Los valores de CI50 más bajos y más altos detectables son de 6 y 200 nm, respectivamente.

PLK	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	200	200	200	200	6	6	6	6
20 % de Chol	22	200	200	200	6	6	6	6
40 % de Chol	6	170	200	200	6	6	6	6
SCR	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	200	200	200	200	14	10	16	10
20 % de Chol	200	200	200	200	21	10	12	8
40 % de Chol	15	197	200	200	12	7	9	9
SCR/PLK	0,33	0,5	0,67	0,82	1 +	1,22 +	1,5 +	2 +
0 % de Chol	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	2,40	1,59	2,65	1,63
20 % de Chol	22,42	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	3,45	1,65	2,07	1,29
40 % de Chol	2,48	1,16	Sin efecto	Sin efecto	1,93	1,09	1,48	1,55

REIVINDICACIONES

1. Un ensamblaje de lípidos que comprende un lípido catiónico que comprende un resto guanido y un lípido aniónico que comprende un grupo carboxilo, **caracterizado** además **porque** la relación entre el resto guanido del lípido catiónico y el grupo carboxilo del lípido aniónico es menor o igual a 1,5.
5
2. Un ensamblaje de lípidos tal como en la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** el ensamblaje comprende cantidades molares aproximadamente iguales del resto guanido y del grupo carboxilo.
- 10 3. Un ensamblaje de lípidos tal como en la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** dicho ensamblaje comprende un exceso molar del grupo carboxilo sobre el resto guanido.
4. Un ensamblaje de lípidos tal como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** además **porque** dicho ensamblaje es un liposoma.
15
5. Un liposoma tal como en la reivindicación 4, que comprende además un lípido neutro o de ion híbrido seleccionado entre colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna o sus mezclas.
6. Un liposoma tal como en la reivindicación 4 o la reivindicación 5, que comprende además restos PEG injertados en su fase lípida.
20
7. Un liposoma tal como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un ingrediente farmacéutico activo.
- 25 8. Un liposoma tal como en la reivindicación 7, en el que dicho ingrediente farmacéutico es un oligonucleótido.
9. Un liposoma tal como en la reivindicación 8, en el que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido señuelo, y un oligonucleótido de sentido contrario, un ARNip, un agente que influencia la transcripción, una ribozima, una ADNzima o un aptámero.
30
10. Un liposoma tal como en la reivindicación 8, en el que dichos oligonucleótidos comprenden nucleósidos modificados tales como ADN, ARN, LNA, PNA, 2'OMe ARN, 2' MOE ARN, 2'F ARN en sus formas de fosfodiéster o fosfotioato.
35
11. Un liposoma tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en la transfección de células *in vivo*.
12. Uso del liposoma tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la transfección de células *in vitro* o *ex vivo*.
40