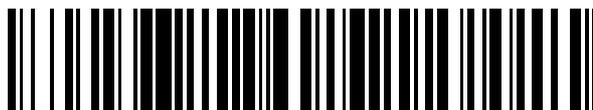


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 246**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97949417 .6**

96 Fecha de presentación: **10.11.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0956001**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.1999**

54 Título: **Preparación de formulaciones estables de complejos de lípido-ácido nucleico para el suministro eficaz in vivo**

30 Prioridad:

12.11.1996 US 30578 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**PAPAHADJOPOULOS, DEMETRIOS;
HONG, DEELUNG y
ZHENG, WEIWEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 246 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

Preparación de formulaciones estables de complejos de lípido-ácido nucleico para el suministro eficaz *in vivo*.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los complejos de lípido catiónico:ADN ("CLDC"). En particular, la presente invención se refiere a complejos de lípido:ácido nucleico que contienen (1) un polímero hidrófilo; (2) un ácido nucleico que se ha condensado con policationes orgánicas; y (3) un polímero hidrófilo y un ácido nucleico que han sido condensados con policationes orgánicas. Los complejos de lípido:ácido nucleico de esta invención muestran una alta actividad de transfección *in vivo* tras la inyección intravenosa y un aumento inesperado en la caducidad, según se determina mediante la actividad de transfección *in vivo*.

Antecedentes de la invención

10 Los liposomas que consisten en moléculas catiónicas anfifílicas son vectores no víricos útiles para el transporte de genes *in vitro* e *in vivo* (publicado en Crystal, *Science*, 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:647-654 (1994); y Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)). En teoría, los liposomas cargados positivamente forman complejos con ácidos nucleicos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas para formar complejos de lípido:ácido nucleico. Los complejos de lípido:ácido nucleico tienen varias ventajas como vectores de transferencia de genes. A diferencia de los vectores víricos, los complejos de lípido:ácido nucleico pueden utilizarse para transferir módulos de expresión con un tamaño casi ilimitado. Puesto que los complejos no contienen proteínas, pueden evocar menos respuestas inmunogénicas e inflamatorias. Además, no pueden replicarse ni recombinarse para formar un agente infeccioso y tienen baja frecuencia de integración.

15 Existe una serie de publicaciones que demuestran de modo convincente que los lípidos catiónicos anfifílicos pueden mediar en el transporte de genes *in vivo* e *in vitro*, mostrando la expresión detectable de un gen indicador en células cultivadas *in vitro* (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987); Loeffler *et al.*, *Methods in Enzymology*, 217:599-618 (1993); Felgner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:2550-2561 (1994)). Debido a que los complejos de lípido:ácido nucleico a veces no son tan eficaces como los vectores víricos para lograr una transferencia de genes satisfactoria, se han realizado muchos esfuerzos por encontrar lípidos catiónicos con mayor eficacia de transfección (Behr, *Bioconjugate Chem.*, 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)). Los complejos de lípido:ácido nucleico son considerados con entusiasmo una herramienta potencialmente útil para la terapia génica.

20 Varios grupos han informado del uso de complejos de lípido catiónico anfifílico:ácido nucleico para la transfección *in vivo*, en animales y en seres humanos (publicado en Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995); Zhu *et al.*, *Science*, 261:209-211 (1993); y Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9742-9746 (1995)). Sin embargo, los problemas técnicos para la preparación de complejos que tengan caducidades estables no se han solucionado. Por ejemplo, a diferencia de las preparaciones de vectores víricos, los complejos de lípido:ácido nucleico son inestables con respecto al tamaño de partícula (Behr, *Bioconjugate Chem.*, 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)). Por tanto, es difícil obtener complejos de lípido:ácido nucleico homogéneos con una distribución de tamaño adecuada para la inyección sistémica. La mayoría de las preparaciones de complejos de lípido:ácido nucleico son metaestables. Por consiguiente, estos complejos generalmente deben utilizarse dentro de un corto periodo de tiempo que varía de 30 minutos a unas pocas horas. En ensayos clínicos recientes que emplean lípidos catiónicos como portadores para el transporte de ADN, los dos componentes se mezclan junto a la cama y se emplean inmediatamente (Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)). La inestabilidad estructural, junto con la pérdida de actividad de transfección del complejo de lípido:ácido nucleico a lo largo del tiempo, son desafíos para el futuro desarrollo de la terapia génica mediada por lípidos.

25 El documento FR-A-1.722.506 describe composiciones que contienen uno o más ácidos nucleicos y polímeros catiónicos, y su uso en terapia génica, en particular para la transferencia de ácidos nucleicos *in vivo*. El documento EP-A-0.394.111 describe compuestos de lipopoliamina, indicándose que se asocian con ADN y facilitan la transfección de células con ADN. El documento WO 96/14864 describe liposomas que comprenden un dominio Fab' de un anticuerpo que dirige los liposomas a células que portan un marcador en la superficie celular.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona un nuevo método para preparar complejos de lípido catiónico:ácido nucleico que tienen mayor caducidad. En una realización, estos complejos se preparan mediante un método que comprende las etapas de:

poner en contacto un ácido nucleico con un policatión orgánico para producir un ácido nucleico condensado;

35 combinar dicho ácido nucleico condensado con un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico para producir dicho complejo de lípido:ácido nucleico;

mezclar dicho complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo neutro; y
 conservar dicho complejo de lípido:ácido nucleico antes de su uso;

5 en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico que comprende dicho ácido nucleico condensado tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho policatión orgánico.

El ácido nucleico condensado puede combinarse con un lípido catiónico anfifílico más un lípido auxiliar neutro, tal como colesterol, en una proporción molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, para producir el complejo de lípido:ácido nucleico.

10 La invención también proporciona un método para aumentar la caducidad de un complejo de lípido:ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:

combinar un ácido nucleico con un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico para producir dicho complejo de lípido:ácido nucleico; y

mezclar dicho complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo con carga neutra;

15 en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho polímero hidrófilo.

Estos complejos de lípido:ácido nucleico tienen una mayor caducidad, por ejemplo, cuando se conservan a 22 °C o menos, comparados con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico en el que el componente de ácido nucleico no se ha puesto en contacto con el policatión orgánico y/o en el que el complejo de lípido:ácido nucleico no se ha puesto en contacto con un polímero hidrófilo.

20 En una realización particularmente preferida, el policatión es una poliamina, más preferiblemente una poliamina tal como espermidina o espermina.

En una realización, el polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con Tween, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), gangliósido G_{M1} y polímeros sintéticos.

25 En una realización, el complejo de lípido:ácido nucleico está liofilizado.

30 En cualquiera de los métodos y de las composiciones de esta invención, el ácido nucleico puede ser casi cualquier ácido nucleico, por ejemplo, un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN), y un ácido nucleico peptídico (PNA), y más preferiblemente es un ADN. En una realización particularmente preferida, el ADN es un módulo de expresión capaz de expresar un polipéptido en una célula transfectada con el complejo de lípido:ácido nucleico.

35 En una realización, los complejos de lípido:ácido nucleico se forman formando en primer lugar un liposoma, y después combinando el liposoma formado con un ácido nucleico condensado o parcialmente condensado para formar un complejo de lípido:ácido nucleico. El complejo de lípido:ácido nucleico después se pone en contacto con un polímero hidrófilo. Como alternativa, los liposomas pueden combinarse con un ácido nucleico no condensado para formar un complejo de lípido:ácido nucleico al cual se le añade posteriormente un polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG-PE). Un complejo de lípido:ácido nucleico preparado mediante la combinación de un ácido nucleico y un liposoma que se ha puesto en contacto con un polímero hidrófilo, después puede combinarse con otro polímero hidrófilo. En una realización preferida, el lípido y el ácido nucleico se combinan en una proporción que varía de 1 a 40 20, más preferiblemente de 4 a 16, y lo más preferiblemente de 8 a 12 nmol de lípido:µg de ácido nucleico. El lípido y el polímero hidrófilo pueden combinarse en una proporción molar que varía del 0,1% al 10%, más preferiblemente del 0,3% al 5%, y lo más preferiblemente del 0,5% al 2,0% (proporción molar de polímero hidrófilo a lípido catiónico del complejo).

45 Se apreciará que puede unirse un resto de transporte dirigido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) al lípido y/o al liposoma antes o después de la formación del complejo de lípido:ácido nucleico. En una realización preferida, el resto de transporte dirigido se acopla al polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG), y el resto de transporte dirigido/polímero hidrófilo después se añade al complejo de lípido:ácido nucleico. Esto proporciona un medio conveniente para modificar la especificidad del transporte dirigido de un complejo de lípido:ácido nucleico, por lo demás genérico.

50 En una realización particularmente preferida, el método para aumentar la caducidad del complejo de lípido:ácido nucleico incluye las etapas de combinar un módulo de expresión con espermidina o espermina con un lípido catiónico anfifílico más un lípido auxiliar, tal como colesterol, y un fragmento Fab' de un anticuerpo unido a un espaciador, por ejemplo polietilenglicol, de forma que el complejo tiene una mayor caducidad cuando se conserva a aproximadamente 4 °C.

En una realización particularmente preferida, el método para aumentar la caducidad del complejo de lípido:ácido nucleico incluye las etapas de combinar un módulo de expresión con espermidina o espermina con un lípido catiónico anfifílico, y un fragmento Fab' de un anticuerpo unido a un derivado de polietilenglicol. Otra realización particularmente preferida incluye las etapas de combinar un módulo de expresión con un lípido catiónico anfifílico, y un fragmento Fab' de un anticuerpo unido a un derivado de polietilenglicol, de modo que el complejo tiene una mayor caducidad cuando se conserva a aproximadamente 4 °C.

Esta invención también proporciona el uso de un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende:

un ácido nucleico que se ha puesto en contacto con un polication orgánico seleccionado de poliamonio, poliaminoácido básico, proteína básica, espermina y espermidina para producir un ácido nucleico condensado;

un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico; y

un polímero hidrófilo neutro;

para la fabricación de un medicamento para transfectar una célula con dicho ácido nucleico después de su conservación.

En una realización, el uso es para la administración sistémica de un complejo de lípido:ácido nucleico a un mamífero. En una realización preferida, el uso es para la administración intravenosa del complejo de lípido:ácido nucleico a un mamífero. En una realización particularmente preferida, el uso es para poner en contacto una célula específica que expresa un ligando que reconoce el fragmento Fab'.

En otra realización, esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo de lípido:ácido nucleico condensado descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas comprenden una dosis terapéuticamente eficaz del complejo de lípido:ácido nucleico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención también proporciona un kit para preparar un complejo de lípido:ácido nucleico, comprendiendo dicho kit:

(i) un recipiente que contiene un liposoma que comprende un lípido catiónico anfifílico;

(ii) un recipiente que contiene un ácido nucleico; y

(iii) un recipiente que contiene un polímero hidrófilo neutro;

en el que el liposoma y el ácido nucleico se van a mezclar para formar el complejo de lípido:ácido nucleico, y en el que el complejo de lípido:ácido nucleico se va a poner en contacto con el polímero hidrófilo.

En una realización preferida, el polímero hidrófilo se derivatiza con un resto de transporte dirigido, preferiblemente un fragmento Fab'. En otra realización preferida, el ácido nucleico está condensado.

Esta invención también proporciona un complejo de lípido:ácido nucleico condensado preparado utilizando el método para aumentar la caducidad que emplea un ácido nucleico condensado con un polication orgánico, según se resumió anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B ilustran el papel del lípido neutro en el transporte de genes. Se ensayaron tres formulaciones de liposomas para el transporte de genes a cultivos celulares (SKBR-3, célula de cáncer de mama humano) y a ratones (CD1, hembras, 20-25 g). Las muestras fueron: (1) DDAB/Col (1:1); (2) DDAB/Col/DOPE (1:0,5:0,5); (3) DDAB/DOPE (1:1); y (4) DDAB solo. La figura 1A ilustra la transfección celular. Se cultivaron células SKBR-3 a 50.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante la noche. Cada pocillo recibió 1 µg de plásmido P-CMVIVSLuc+ que formó un complejo con los liposomas a 5 nmol de DDAB. Las células se recolectaron después de una incubación de 24 hr con los complejos a 37 °C. Los valores presentados son la media de 2 pocillos. Los valores varían dentro del 10-30% de la media. La figura 1B ilustra la transfección *in vivo* de ratones. Los ratones recibieron, mediante una inyección en la vena de la cola, 40 µg de plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó un complejo con los liposomas a una proporción de 8 nmol de DDAB por µg de ADN. Los valores presentados son la media de 2 ratones. Los valores varían dentro del 20-25% de la media.

La figura 2 ilustra la expresión de genes indicadores en extractos de tejidos de ratón. Los ratones recibieron (mediante una inyección en la vena de la cola) 60 µg del plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó un complejo con liposomas DDAB/Col (1:1) a una proporción de 8 nmol de DDAB por µg de ADN (sin espermidina). Los valores presentados son la media de 3 ratones.

La figura 3 ilustra la duración de la expresión del gen indicador en pulmón de ratón. Cada animal recibió 40 µg de plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó un complejo con liposomas DDAB/Col (1:1) a una proporción de 8 nmol de

DDAB por μg de ADN.

La figura 4 ilustra el transporte de genes en pulmón de ratón por diversos complejos estabilizados. Cada ratón recibió 60 μg de plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó un complejo con liposomas DDAB/Col (1:1) a una proporción de 8 nmol de DDAB/ μg de ADN. Los valores presentados son la media de 3 ratones. Barras ligeramente punteadas: complejos recién hechos; barras densamente punteadas: muestras de un mes. Las muestras son las siguientes: (1) no se añadió agente estabilizante; (2) se añadió PEG-PE a 1% del lípido total a los complejos formados; y (3) se añadió espermidina (0,5 nmol por μg de ADN) al plásmido antes de la formación del complejo.

Las figuras 5A y 5B ilustran la transfección *in vitro* de líneas celulares con complejos de inmunolípido:ADN. Las muestras son las siguientes: (1) DDAB/DOPE (1:1), que produce liposomas catiónicos complejados sólo con ADN; (2) DDAB/DOPE (1:1) con PEG-PE al 1% derivatizado con maleimida en la última posición del PEG, que produce liposomas con el componente de estabilización estérica añadido después de la formación del complejo con el ADN; y (3) DDAB/DOPE (1:1) con PEG-PE al 1% derivatizado con el fragmento Fab' de un anticuerpo anti-Her-2 humanizado unido a la última posición del PEG a través del grupo tiol libre del resto maleimida.

Definiciones

En la presente se emplean las siguientes abreviaturas: Col, colesterol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; SM, esfingomielina; M-DPE, dipalmitoiletanolamina derivatizada con maleimida; PBS, disolución salina tamponada con fosfato; LUV, vesículas unilaminares grandes; MLV, vesículas multilaminares; PE, fosfatidiletanolamina; PEG, polietilenglicol; PEG-PE, polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina; DC-col, 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetan)carbanoil]colesterol; DDAB, bromuro de dimetildioctadecilamonio; DMEPC, dimiristoilglicero-3-etilfosfocolina; DODAP, dioleoil-3-dimetilamoniopropano; DOEPC, dioleoilglicero-3-etilfosfocolina; DOGS, N,N-dioctadecilamidoglicilespermina; DOPE, dioleoilfosfatidiletanolamina; DOTAP, dioleoil-3-trimetilamoniopropano; DOTMA, bromuro de N-[2,3-(dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio; DSPE, diestearoilfosfatidiletanolamina; PEG-PE, N-[ω -metoxipoli(oxietilen)- α -oxicarbonil]-DSPE; POEPC, palmitoileoilglicero-3-etilfosfocolina; DODAC, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio; DMRIE, bromuro de N-(1-(2,3-dimiristiloxipropil)-N,N-dimetil-(2-hidroxi)etil)amonio; DOSPA, trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(espermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio; DOGS, dioctadecilamidoglicilespermina.

La expresión "lípido catiónico anfifílico" pretende incluir cualquier lípido anfifílico, incluyendo lípidos sintéticos y análogos de lípidos, que tienen restos hidrófobos y de grupos de cabeza polar, una carga positiva neta, y que en sí mismos pueden formar espontáneamente micelas o vesículas de bicapa en agua, como por ejemplo los fosfolípidos. La expresión también incluye cualquier lípido anfifílico que se incorpora de forma estable en las bicapas lipídicas en combinación con fosfolípidos con su resto hidrófobo en contacto con la región hidrófoba interior de la membrana de bicapa, y su resto de grupo de cabeza polar orientado hacia la superficie polar exterior de la membrana.

La expresión "unión específica" se refiere a la unión que se produce entre especies apareadas tales como enzima/sustrato, receptor/agonista, anticuerpo/antígeno, y lectina/carbohidrato, que puede ser mediada por interacciones covalentes o no covalentes, o por una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. Cuando la interacción de las dos especies produce un complejo unido de forma no covalente, la unión que se produce generalmente es electrostática, de enlaces de hidrógeno, o es el resultado de interacciones lipófilas. Por consiguiente, la "unión específica" se produce entre especies apareadas en las que existe una interacción entre las dos que produce un complejo unido que tiene las características de una interacción de anticuerpo/antígeno o de enzima/sustrato. En particular, la unión específica se caracteriza por la unión de un miembro de una pareja a una especie concreta y no a cualquier otra especie dentro de la familia de compuesto a la que pertenece el correspondiente miembro de la pareja de unión. Así, por ejemplo, un anticuerpo preferiblemente se une a un único epitopo y no a otro epitopo dentro de la familia de proteínas.

El término "ligando" o la expresión "resto de transporte dirigido", tal como se emplean en la presente, se refieren en general a todas las moléculas capaces de unirse de modo específico a una molécula diana concreta y que forman un complejo unido, tal como se describió anteriormente. Así, el ligando y su correspondiente molécula diana forman una pareja de unión específica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, linfocinas, citoquinas, proteínas receptoras, tales como CD4 y CD8, proteínas receptoras solubilizadas, tales como CD4 soluble, hormonas, factores del crecimiento, y similares, que se unen de modo específico a células diana deseadas, y ácidos nucleicos que se unen a los correspondientes ácidos nucleicos a través de la complementariedad de las bases. Los restos de transporte dirigido particularmente preferidos incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, el fragmento Fab').

La expresión "complejo de lípido:ácido nucleico" se refiere al producto preparado mezclando liposomas o lípidos catiónicos anfifílicos con un ácido nucleico. El término "CLDC", que significa "complejo de lípido catiónico:ADN" (en inglés, "cationic lipid:DNA complex"), tal como se emplea en la presente, no se limita a ADN y es una abreviatura conveniente para el complejo de lípido:ácido nucleico. El complejo de lípido:ácido nucleico también puede incluir un lípido auxiliar. El lípido auxiliar a menudo es un lípido neutro, tal como DOPE o colesterol, siendo el más preferido el colesterol. El complejo de lípido:ácido nucleico también puede contener otros compuestos, tales como un policatión, que están en contacto con el ácido nucleico del complejo, produciendo un ácido nucleico condensado, y polímeros

hidrófilos, tales como PEG y PEG derivatizado.

El término “inmunoliposoma” y la expresión “complejo de inmunolípido:ácido nucleico” se refieren a un liposoma o a un complejo de lípido:ácido nucleico que porta un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que actúa como resto de transporte dirigido que permite al complejo de lípido:ácido nucleico unirse de modo específico a una molécula “diana” concreta que puede existir en disolución o que puede estar unida a la superficie de una célula. Cuando la molécula diana se encuentra generalmente en un exceso relativo (por ejemplo, ≥ 10 veces) y está en asociación con un tipo de célula concreta o, como alternativa, se encuentra en muchos tipos de células que expresan todas una condición fisiológica concreta, se dice que la molécula diana es un “marcador característico” de ese tipo de células o de esa condición fisiológica. Así, por ejemplo, un cáncer puede caracterizarse por la sobreexpresión de un marcador concreto, tal como el proto-oncogén HER2 (*c-erbB-2/neu*) en el caso del cáncer de mama.

Un “polímero hidrófilo”, tal como se emplea en la presente, se refiere a polímeros neutros flexibles muy hidratados de cadena larga unidos a moléculas de lípidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con Tween, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), gangliósido G_{M1}, y polímeros sintéticos. Estos polímeros generalmente tienen un peso molecular en el intervalo de 1000-10.000. Preferiblemente, el peso molecular del PEG es de aproximadamente 2000.

La “transfección” se refiere a poner en contacto una célula viva con un ácido nucleico, por ejemplo, como parte de un complejo de lípido:ácido nucleico.

La “actividad de transfección” se refiere a la eficacia de introducir un ácido nucleico en una célula viva. La eficacia de transfección puede medirse determinando la cantidad de expresión de un gen indicador que se ha transfectado hacia el interior de la célula como parte de un complejo de lípido:ácido nucleico, por ejemplo, mediante ensayos fluorescentes o funcionales.

Las expresiones “ácido nucleico condensado” y “ácido nucleico parcialmente condensado” se utilizan para indicar un ácido nucleico que se ha puesto en contacto con un catión orgánico, por ejemplo, poliaminas, incluyendo espermina y espermidina, moléculas de poliamonio, tales como Polybrene (bromuro de hexadimetrina), poliaminoácidos básicos, y proteínas básicas. Los ácidos nucleicos condensados generalmente ocupan un volumen significativamente menor que los ácidos nucleicos no condensados. Sin embargo, se reconoce que el grado de condensación puede variar con el entorno local (por ejemplo, lípidos en oposición a un entorno acuoso).

La expresión “caducidad”, cuando se utiliza para referirse al complejo de lípido:ácido nucleico descrito en la presente, se refiere al periodo de tiempo que puede conservarse el complejo de lípido:ácido nucleico (bajo condiciones definidas, por ejemplo, a 4 °C) antes de perder su actividad biológica. La actividad biológica ensayada para la determinación de la caducidad en la presente invención es la capacidad del complejo de lípido:ácido nucleico para transfectar células de mamífero *in vivo* después de la administración intravenosa. La “caducidad” de un complejo de lípido:ácido nucleico se determina de modo conveniente ensayando la expresión génica de ácidos nucleicos indicadores en el complejo de lípido:ácido nucleico, según se describe en la presente.

Un “módulo de expresión” se refiere a un promotor unido operablemente a una molécula de ADN, que contiene todos los elementos requeridos para la expresión de esa molécula de ADN en una célula viva. El módulo de expresión puede contener otros elementos, tales como potenciadores, orígenes de la replicación y similares, que forman un vector de expresión.

Un “policatión orgánico” o “policatión” se refiere a una estructura polimérica orgánica en la que más de una unidad del polímero porta una carga negativa, y la carga neta del polímero es positiva. Los ejemplos de dicho catión orgánico son las poliaminas, incluyendo espermina y espermidina, moléculas de poliamonio, tales como Polybrene (bromuro de hexadimetrina), poliaminoácidos básicos, o proteínas básicas.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” es un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico u otro, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el complejo de lípido:ácido nucleico sin provocar efectos biológicos inaceptables ni interactuar de una manera perjudicial con ningún otro de los componentes de la composición farmacéutica en la está contenido.

La expresión “ácido nucleico” se refiere a un polímero o un oligómero compuesto de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o cualquiera de sus análogos sintéticos o variantes estructurales relacionados) unidas a través de enlaces fosfodiéster (o cualquiera de sus análogos sintéticos o variantes estructurales relacionados). Por tanto, la expresión se refiere a un polímero de nucleótidos en el que los nucleótidos y los enlaces entre ellos son naturales (ADN o ARN), así como diversos análogos, por ejemplo y sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), fosforamidatos, fosforotioatos, fosfonatos de metilo, ácidos 2-O-metilribonucleicos, y similares.

La expresión “porcentaje molar”, cuando se refiere al porcentaje de polímero hidrófilo en un liposoma, se expresa con relación al lípido catiónico en el liposoma, a menos que se indique lo contrario. Así, por ejemplo, en un liposoma que comprende una proporción de DDAB a colesterol (Col) de 100:100, un porcentaje molar de 4 (4% molar) del

polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG) representa una proporción de DDAB:Col:PEG de aproximadamente 100:100:4.

El término "idéntico" se refiere a una composición que se forma utilizando los mismos compuestos que otra composición, en las que las composiciones no se diferencian de una manera estadísticamente significativa.

5 La expresión "administración sistémica" se refiere a un método para administrar un compuesto o una composición a un mamífero de modo que el compuesto o la composición se transportan a muchos sitios en el cuerpo a través del sistema circulatorio.

Descripción detallada

10 Esta invención proporciona métodos para aumentar la caducidad de complejos de lípido catiónico:ácido nucleico, y la eficacia de transfección *in vivo* y/o *in vitro* de estos complejos. Estos complejos han atraído un interés considerable como medio para transportar ácidos nucleicos que expresan diversos polipéptidos terapéuticos como medio para transportar a los propios ácidos nucleicos terapéuticos (por ejemplo, antisentido). Por desgracia, ha resultado difícil mantener y conservar complejos de lípido:ácido nucleico homogéneos adecuados para la administración *in vivo*. Los complejos tienden a agregarse con rapidez o descomponerse en un tiempo relativamente corto. Esta inestabilidad ha requerido el uso de estos complejos dentro de un corto periodo de tiempo después de su preparación, a menudo tan poco como 30 minutos hasta unas pocas horas. Así, por ejemplo, en ensayos clínicos recientes que emplean lípidos catiónicos como portadores para el transporte de ADN, el ADN y los componentes lipídicos se mezclan junto a la cama y se emplean inmediatamente (Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)).

20 Esta inestabilidad del complejo de lípido:ácido nucleico proporciona un obstáculo significativo para la amplia aceptación de los complejos de lípido catiónico:ácido nucleico como productos terapéuticos. La necesidad de preparar los complejos un poco antes del uso requiere que la instalación farmacéutica esté relativamente cerca al área de uso. Como alternativa, la combinación del lípido y ácido nucleico junto a la cama impone una carga de trabajo sustancial, introduce problemas de control de calidad con respecto a asegurarse de la formación adecuada del complejo, y crea una fuente de error potencial.

25 La presente invención resuelve estos problemas proporcionando métodos para aumentar significativamente la caducidad (conservación) de los complejos de lípido:ácido nucleico. Los métodos en general implican: (1) condensar el ácido nucleico antes de su incorporación en el complejo de lípido:ácido nucleico; (2) combinar un complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG); y (3) condensar el ácido nucleico antes de la formación del complejo y combinar el complejo con un polímero hidrófilo.

30 Aunque la condensación de los ácidos nucleicos puede conducir a la estabilidad del ácido nucleico durante el aislamiento (por ejemplo, en un tampón acuoso), un descubrimiento sorprendente de esta invención ha consistido en que el uso de un agente de condensación (por ejemplo, un policatión orgánico) proporciona un complejo de lípido:ácido nucleico que sigue siendo capaz de transfectar una célula *in vivo* incluso después de un periodo de conservación prolongada (por ejemplo, conservación en frío a una temperatura de aproximadamente 22 °C o menor, más preferiblemente que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 22°C, y lo más preferiblemente a aproximadamente 4 °C).

35 También resultó un descubrimiento sorprendente el que los complejos de lípido:ácido nucleico, combinados con un polímero hidrófilo unido a un lípido anfipático (por ejemplo, PEG-PE), también muestran una mayor caducidad. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que cuando el complejo de lípido catiónico:ADN ("CLDC") se pone en contacto con el polímero hidrófilo, el polímero hidrófilo se coloca y se incorpora en los bolsillos hidrófobos del complejo a través de sus cadenas laterales hidrófobas, mientras que deja la parte hidrófila en la superficie exterior, estabilizando con ello el complejo entero.

40 A la vista de estos descubrimientos, esta invención proporciona métodos para aumentar la caducidad de complejos de lípido catiónico:ácido nucleico. Los métodos en general implican condensar el ácido nucleico utilizando un policatión y/o poner en contacto, por ejemplo revistiendo, el complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo. Esta invención también incluye los complejos de lípido:ácido nucleico preparados de esta forma.

I. Complejos de lípido catiónico:ácido nucleico

45 Tal como se explicó anteriormente, esta invención proporciona métodos para aumentar la caducidad (conservación) de complejos de lípido:ácido nucleico. En una realización preferida, los complejos se forman mediante la combinación de un ácido nucleico con un liposoma. Sin embargo, se reconoce que no es necesario proporcionar los lípidos como un liposoma. También se reconoce que, después de la formación del complejo, el complejo de lípido:ácido nucleico puede no seguir existiendo como una vesícula verdadera y, por tanto, no se considera en general un liposoma. La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico es muy conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, lo publicado en Crystal, *Science*, 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:647-654 (1994); y Gao *et al.*, *Gene Therapy*, 2:710-722 (1995)). Los diversos componentes y la construcción de los complejos de lípido:ácido nucleico estabilizados de la invención se describen en detalle a continuación.

A. Lípidos catiónicos anfifílicos

Tal como se indicó anteriormente, los métodos de esta invención implican formar complejos de un lípido catiónico con un ácido nucleico. La expresión "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de una serie de especies lipídicas que portan una carga positiva neta a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Col y DMRIE. Además, está disponible una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos que pueden utilizarse en la presente invención. Estos incluyen, por ejemplo, LIPOFECTIN® (liposomas catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOTMA y DOPE, de GIBCO/BRL, Grand Island, Nueva York, EEUU); LIPOFECTAMINE® (liposomas catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOSPA y DOPE, de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (lípidos catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOGS en etanol, de Promega Corp., Madison, Wisconsin, EEUU).

El lípido catiónico puede utilizarse por sí solo o en combinación con un lípido "auxiliar". Los lípidos auxiliares preferidos son no iónicos o no están cargados a pH fisiológico. Los lípidos no iónicos particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a colesterol y DOPE, siendo el colesterol el más preferido.

La proporción molar de lípido catiónico a auxiliar puede variar de 2:1 a aproximadamente 1:2, más preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 1:1,5, y lo más preferiblemente es de aproximadamente 1:1.

Otros lípidos catiónicos y no iónicos adecuados para su uso en los complejos de lípido:ácido nucleico de la presente invención son muy conocidos por los expertos en la técnica y se citan en una diversidad de fuentes muy conocidas, por ejemplo, *McCutcheon's Detergents and Emulsifiers* y *McCutcheon's Functional Materials*, Allured Publishing Co., Ridgewood, N.J. Los lípidos preferidos incluyen DDAB:colesterol o DOTAP:colesterol en una proporción molar de 1:1.

B. Ácido nucleico

Los complejos de lípido:ácido nucleico contienen un ácido nucleico, generalmente un módulo de expresión que se construye utilizando técnicas recombinantes. Un ácido nucleico recombinante se prepara en primer lugar aislando el ácido nucleico de interés. El ácido nucleico aislado después se acopla en un módulo o vector apropiado para la expresión del gen. Los métodos para preparar un ácido nucleico recombinante son conocidos por los expertos en la técnica (véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., 1989)).

El gen de interés, por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido terapéutico o un gen indicador, puede insertarse en un "vector de expresión", un "vector de clonación" o un "vector", expresiones que habitualmente se refieren a plásmidos u otras moléculas de ácidos nucleicos que son capaces de replicarse en una célula hospedante elegida y expresar el gen de interés. Los vectores de expresión pueden replicarse de modo autónomo, o pueden replicarse insertándose en el genoma de la célula hospedante. A menudo resulta deseable que un vector pueda utilizarse en más de una célula hospedante, por ejemplo, en *E. coli* para la clonación y la construcción, y en una célula de mamífero para la expresión. Otros elementos del vector pueden incluir, por ejemplo, marcadores seleccionables y potenciadores. Los marcadores seleccionables, por ejemplo, de resistencia a la tetraciclina o de resistencia a la higromicina, permiten la detección y/o la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 4.704.362). El vector concreto utilizado para transportar la información genética hacia la célula tampoco es particularmente crítico. Puede utilizarse cualquiera de los vectores convencionales empleados para la expresión de proteínas recombinantes en células procariontas o eucariotas.

Los vectores de expresión generalmente tienen una unidad de transcripción o módulo de expresión que contiene todos los elementos requeridos para la expresión del ácido nucleico en las células hospedantes. Un módulo de expresión típico contiene un promotor unido operablemente a la secuencia de ADN que codifica una proteína. El promotor preferiblemente se coloca aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heterólogo que del sitio de inicio de la transcripción en su escenario natural. Sin embargo, tal como se conoce en la técnica, puede introducirse cierta variación en esta distancia sin perder la función promotora.

En el módulo de expresión, la secuencia de ácido nucleico de interés puede unirse a una secuencia que codifica una secuencia de péptido señal escindible para estimular la secreción de la proteína codificada por la célula transformada. El módulo de expresión también debe contener una región de terminación de la transcripción cadena abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación puede obtenerse a partir del mismo gen que la secuencia del promotor o puede obtenerse de un gen diferente.

Para una traducción más eficaz en células de mamífero del ARNm codificado por el gen estructural, habitualmente se añaden secuencias de poliadenilación al módulo de expresión. Las señales de terminación y poliadenilación que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40, o una copia genómica parcial de un gen que ya reside en el vector de expresión.

Además del módulo de expresión, muchos vectores de expresión incluyen óptimamente elementos potenciadores que pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces a partir de los promotores heterólogos u homólogos unidos. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen una amplia gama de hospedantes y son activos en una diversidad de tejidos. Por ejemplo, el potenciador de gen temprano de SV40 es adecuado para muchos tipos

celulares. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas del virus de polio, citomegalovirus humano o murino, la repetición terminal larga de diversos retrovirus, tales como el virus de la leucemia murino, el virus del sarcoma de Rous o murino, y VIH (véase *Enhancers and Eukaryotic Expression* (1983)).

- 5 Además de los ácidos nucleicos recombinantes analizados anteriormente, también pueden utilizarse ácidos nucleicos u oligonucleótidos sintéticos en la invención. Como punto general con respecto a los ácidos nucleicos utilizados en la invención, los expertos en la técnica reconocerán que los ácidos nucleicos utilizados en la invención incluyen moléculas de ADN y ARN, así como sus análogos no naturales, sintéticos, y heteropolímeros de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos de cualquiera de estos. La composición concreta de un ácido nucleico o de un análogo de ácido nucleico dependerá del objetivo con el que se va a utilizar el material y del entorno en el que se colocará el material. Se han diseñado nucleótidos no naturales, modificados o sintéticos para servir a una diversidad de objetivos y para que permanezcan estables en una diversidad de entornos, tales como entornos en que están presentes nucleasas, tal como se conoce en la técnica. Los nucleótidos no naturales modificados o sintéticos, comparados con los desoxirribonucleótidos o los ribonucleótidos naturales, pueden diferenciarse con respecto al carbohidrato (azúcar), al enlace fosfato, o a porciones de bases del nucleótido, o incluso pueden contener una base no nucleotídica (o no contener una base) en algunos casos (véase, por ejemplo, Arnold *et al.*, publicación de patente PCT nº WO 89/02439). Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados o no naturales de la invención pueden incluir ácidos nucleicos biotinilados, ácidos nucleicos O-metilados, ácidos nucleicos con esqueleto de metilfosfonato, ácidos nucleicos con esqueleto de fosforotioato, o ácidos nucleicos de poliamida.
- 10 Los oligonucleótidos, tales como el ARN antisentido descrito a continuación, preferiblemente se sintetizan en un Applied BioSystems u otro sintetizador de oligonucleótidos disponible en el mercado según las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Los oligonucleótidos pueden prepararse utilizando cualquier método adecuado, tal como los métodos de fosfotriéster y fosfodiéster, o sus realizaciones automatizadas. En una de dichas realizaciones automatizadas se emplean dietilfosforamiditas como materiales de partida y pueden sintetizarse como se describe en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 22:1859 (1981), y la patente de EEUU nº 4.458.066.
- 15
- 20
- 25

C. Ácido nucleico condensado

- Se sabe que las moléculas policatiónicas pequeñas condensan los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas de carga-carga (Plum *et al.*, *Biopolymers*, 30:631-643 (1990)). Por tanto, el pretratamiento de un ácido nucleico con poliaminas puede reducir el número de sitios de carga para formar un complejo con liposomas catiónicos. Sin embargo, la condensación de un ácido nucleico antes de la formación del complejo con el lípido produce el sorprendente resultado de aumentar la caducidad de los complejos de lípido:ácido nucleico, según se mide mediante la eficacia de la transfección. Los complejos de lípido:ácido nucleico formados con este pretratamiento fueron estables a una proporción menor de lípido a ADN sin agregación. Se emplean policationes orgánicas, tales como poliaminas, moléculas de poliamonio y poliaminoácidos básicos y sus derivados, para condensar el ácido nucleico antes de la formación del complejo con el lípido. Una realización preferida emplea poliaminas, tales como espermidina y espermina, para condensar el ácido nucleico (véase, por ejemplo, el ejemplo 1).
- 30
- 35

D. Polímero hidrófilo

- En fechas recientes, se ha establecido que la incorporación de PEG-PE en liposomas produce una estabilización estérica que da como resultado un tiempo en circulación en la sangre más largo (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1066:29-36 (1991); Papahadjopoulos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11460-11464 (1991)). En la presente invención, la inserción de PEG-PE (por ejemplo, 1% de los lípidos totales) en los complejos de lípido:ácido nucleico recién formados evita que los complejos se agreguen durante la conservación. Sin embargo, resultó un descubrimiento sorprendente que la incorporación de PEG-PEG no inhibía la actividad de transfección *in vivo*, y también que la actividad de transfección *in vitro*, que había sido inhibida, se recuperaba mediante la incorporación de un fragmento Fab' conjugados en el extremo final del PEG-PE. La presencia de polímeros hidrófilos en el complejo de lípido:ácido nucleico proporciona una mayor caducidad, según se mide mediante la eficacia de la transfección después de la conservación. Así, resulta deseable añadir un polímero hidrófilo, tal como lípidos modificados con polietilenglicol (PEG) o gangliósido GM1, a los liposomas. El PEG también puede derivatizarse con otras moléculas anfipáticas, tales como ácidos grasos, esfingolípidos, glicolípidos y colesterol. La adición de estos componentes evita la agregación de los liposomas durante el acoplamiento del resto de transporte dirigido al liposoma. Estos componentes también proporcionan un medio para aumentar el tiempo en la circulación de los complejos de lípido:ácido nucleico.
- 40
- 45
- 50

- Puede utilizarse una serie de métodos diferentes para la preparación de PEG para su incorporación en los liposomas. En una realización preferida, el PEG se incorpora como PEG derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE) o PEG derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE). Los métodos para preparar PEG-PE son muy conocidos y generalmente implican la utilización de un PEG con metoxi activado (con sólo un extremo reactivo) y PE. Así, PEG-succinato de succinimidilo puede hacerse reaccionar en un disolvente orgánico básico (Klibanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 268:235-237 (1990)). Un método particularmente preferido para la preparación de PEG-PE se basa en la reacción del PEG con carbonildiimidazol, seguido de la adición de PE (véase Woodle *et al.*, *Proc.*
- 55
- 60

Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 17:77-78 (1990); Papahadjopoulos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11460-11464 (1991)); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1066:29-36 (1991); Woodle *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1105:193-200 (1992); y Woodle *et al.*, *Period. Biol.*, 93:349-352 (1991)). De modo similar, se describe un PEG activado con cloruro cianúrico en un disolvente orgánico básico en Blume *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1029:91-97 (1990), y la patente de EEUU nº 5.213.804. Una estrategia completamente diferente se basa en el acoplamiento de PEG con liposomas preformados utilizando PEG activado con cloruro de tresilo, que después se añade a liposomas que contienen PE a un pH mayor (Senior *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1062:77-82 (1991)). El PEG derivatizado también está disponible en el mercado. Así, por ejemplo, PEG-PE puede adquirirse en Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama). Los expertos en la técnica reconocerán que están disponibles muchas otras uniones, por ejemplo, detergentes unidos a PEG, tales como Tween, y la inserción de lípidos derivatizados con PEG en los complejos de lípido:ácido nucleico formados.

E. Fragmento de anticuerpo Fab'

En una realización preferida, los complejos de lípido:ácido nucleico de la presente invención se conjugan con el fragmento Fab' de un anticuerpo, que actúa como resto de transporte dirigido que permite al complejo de lípido:ácido nucleico unirse de modo específico a una célula diana que porta la molécula diana (por ejemplo, marcador característico) a la cual se dirige el fragmento de anticuerpo Fab'. También pueden conjugarse al complejo péptidos más pequeños procedentes de la región hipervariable o de otro péptido que interacciona con un ligando de superficie específico de célula. En términos generales, el fragmento Fab' de un anticuerpo representa un monómero que comprende las regiones variables y la región C_H1 de un brazo de un anticuerpo. Una de estas realizaciones preferidas se describe en el ejemplo 2.

Un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que la unidad estructural de inmunoglobulina básica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Las expresiones "cadena ligera variable (V_L)" y "cadena pesada variable (V_H)" se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con diversas peptidasas. En particular, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)'₂, un dímero de Fab' que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 mediante un enlace disulfuro. El F(ab)'₂ puede reducirse bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo con ello el dímero F(ab)'₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' fundamentalmente es un Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) para más información acerca de la terminología de fragmentos de anticuerpos). Aunque el fragmento Fab' se define en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, los expertos en la técnica apreciarán que estos fragmentos Fab' pueden sintetizarse *de novo* por medios químicos o utilizando la metodología del ADN recombinante.

Los fragmentos Fab' utilizados en la presente invención pueden derivarse de anticuerpos de origen animal (en especial ratón o rata) o humano, o pueden ser quiméricos (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)) o humanizados (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), y solicitud de patente del Reino Unido publicada nº 8707252)

El fragmento Fab' se selecciona para unirse de modo específico a una molécula o un marcador característico de la superficie de las células a las cuales se desean transportar los contenidos del complejo de lípido catiónico:ácido nucleico. Una molécula es característica de una célula, de un tejido o de un estado fisiológico cuando esa molécula se encuentra generalmente en asociación con este tipo celular o, como alternativa, en una multiplicidad de tipos celulares que expresan todos una condición fisiológica concreta (por ejemplo, transformación). Un marcador característico específico se encuentra preferiblemente sobre la superficie de células de un tipo celular o de un tejido concretos, o sobre la superficie de tejidos o células que expresan una condición fisiológica concreta y no sobre otro tejido o tipo celular en el organismo. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que este nivel de especificidad del marcado a menudo no es necesario. Por ejemplo, un marcador de la superficie celular característico mostrará suficiente especificidad de tejido si sólo los tejidos no diana no están accesibles al complejo de lípido:ácido nucleico. Como alternativa, puede lograrse una especificidad eficaz mediante la sobreexpresión del marcador en el tejido diana, comparado con otros tejidos. Esto produce una captación preferente por el tejido diana, conduciendo a una especificidad de tejido eficaz. Así, por ejemplo, muchos cánceres se caracterizan por la sobreexpresión de marcadores de la superficie celular, tales como el receptor codificado por el proto-oncogén HER2

(*c-erbB-2, neu*) en el caso del cáncer de mama.

Los expertos en la técnica reconocerán que existen numerosos marcadores de la superficie celular que proporcionan buenos marcadores característicos dependiendo del tejido concreto establecido como diana. Estos marcadores de la superficie celular incluyen, pero no se limitan a carbohidratos, proteínas, glicoproteínas, complejos de MHC, interleuquinas, y proteínas receptoras, tales como proteínas receptoras HER, CD4 y CD8, así como otras proteínas receptoras de factores del crecimiento y de hormonas.

Los receptores de factores del crecimiento son marcadores de la superficie celular característicos particularmente preferidos. Los receptores de factores del crecimiento son receptores de la superficie celular que se unen de modo específico a factores del crecimiento y así median en una respuesta celular característica del factor del crecimiento concreto. La expresión "factor del crecimiento", tal como se emplea en la presente, se refiere a un ligando de proteína o de polipéptido que activa o estimula la división o la diferenciación celulares, o estimula una respuesta biológica, tal como la motilidad o la secreción de proteínas. Los factores del crecimiento son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante β (TGF- β), factores del crecimiento de fibroblastos (FGF), interleuquina-2 (IL2), factor del crecimiento nervioso (NGF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina, receptor de interleuquina-13 (IL13R), y similares. Los expertos en la técnica reconocerán que la expresión "factor del crecimiento", tal como se emplea en la presente, en general incluye citoquinas y factores estimulantes de colonias.

Los marcadores particularmente preferidos se encuentran en la familia HER de receptores de factores del crecimiento. De modo más específico, HER1, HER2, HER3 y HER4 son más preferidos, siendo HER2 el más preferido. Los receptores HER comprenden proteína tirosina quinasa que, en sí mismas, proporcionan dianas de anticuerpos muy específicas. Así, en una realización, la tirosina quinasa P185 de HER2 proporciona la diana más preferida para el fragmento Fab' utilizado en los complejos de inmunolípido:ácido nucleico de la presente invención.

Se apreciará que no es necesario que el marcador característico sea un marcador natural, sino que puede introducirse en la célula diana concreta. Esto puede lograrse marcando directamente una célula o un tejido con un marcador concreto (por ejemplo, inyectando directamente el marcador en el tejido diana concreto o, como alternativa, administrando un marcador al organismo completo que es incorporado de forma selectiva por el tejido diana). En una realización, el marcador puede ser un producto génico que es codificado por un ácido nucleico en un módulo de expresión. El gen marcador puede estar bajo el control de un promotor que es activo sólo en las células diana concretas. Por tanto, la introducción de un vector que contiene el módulo de expresión dará como resultado la expresión del marcador sólo en las células diana concretas. Los expertos en la técnica reconocerán que existen numerosas estrategias que emplean la metodología del ADN recombinante para introducir marcadores característicos en células diana.

En una realización preferida, el resto de transporte dirigido se une de modo específico a productos o componentes de un receptor de un factor del crecimiento, en particular productos del proto-oncogén HER2 (*c-erbB-2, neu*). Se prefiere particularmente que el resto de transporte dirigido se una a la tirosina quinasa del receptor del factor del crecimiento codificado por HER2, la proteína p185^{HER2}, que habitualmente es sobreexpresado en cánceres de mama (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987)). Otras dianas adecuadas para el resto de transporte dirigido incluyen, pero no se limitan a EGFR (HER1), HER3 y HER4, combinaciones de estos receptores, y otros marcadores asociados con cánceres. Otros anticuerpos de interés incluyen, pero no se limitan a BR96 (Friedman *et al.*, *Cancer Res.*, 53:334-339 (1993)), e23 a erbB2 (Batra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5867-5871 (1992)), PR1 en el cáncer de próstata (Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:547-551 (1993)), y K1 en el cáncer de ovario (Chang *et al.*, *Int. J. Cancer*, 50:373-381 (1992)).

Los complejos de inmunolípido:ácido nucleico de la presente invención pueden prepararse incorporando el fragmento Fab' en los liposomas o en los lípidos mediante una diversidad de técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. El Fab' se añade al complejo de lípido:ácido nucleico antes o después de la formación del complejo. Por ejemplo, un Fab' conjugado con biotina puede unirse a un liposoma que contiene una estreptavidina. Como alternativa, el Fab' biotinilado puede conjugarse con un liposoma derivatizado con biotina mediante un conector de avidina o estreptavidina. Así, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biotinilado se biotinila y se une a liposomas que contienen fosfatidiletanolamina biotinilada mediante un conector de avidina (véase, por ejemplo, Ahmad *et al.*, *Cancer Res.*, 52:4817-4820 (1992)). Generalmente se emplean de aproximadamente 30 a 125, y más generalmente de aproximadamente 50 a 100 fragmentos Fab' por complejo de lípido:ácido nucleico.

En una realización preferida, el resto de transporte dirigido puede conjugarse directamente al liposoma. Estos medios de conjugación directa son muy conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Gregoriadis, *Liposome Technology* (1984), y Lasic, *Liposomes: from Physics to Applications* (1993)). Se prefiere particularmente la conjugación a través de un enlace tioéter. Esto puede lograrse haciendo reaccionar el anticuerpo con un lípido derivatizado con maleimida, tal como fosfatidiletanolamina derivatizada con maleimida (M-PE) o dipalmitoiletanolamina derivatizada con maleimida (M-DEP). Esta estrategia se describe en detalle en Martin *et al.*, *J.*

Biol. Chem., 257:286-288 (1982).

II. Preparación de los liposomas

Está disponible una diversidad de métodos para preparar liposomas, según se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467 (1980); patentes de EEUU nº 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.943.787; publicación PCT nº WO 91/17424; Szoka y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198 (1978); Deamer y Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, 443:629-634 (1976); Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352 (1979); Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 812:55-65 (1985); Mayer *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168 (1986); Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:242-246 (1988), *Liposomes*, cap. 1 (Ostro, ed., 1983); y Hope *et al.*, *Chem. Phys. Lip.*, 40:89 (1986). Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, sonicación, extrusión, alta presión/homogeneización, microfluidificación, diálisis de detergentes, fusión inducida por calcio de pequeñas vesículas de liposomas, y métodos de infusión de éter, todos muy conocidos en la técnica. Un método produce vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un disolvente orgánico o sistema de disolventes adecuados, y se secan al vacío o un gas inerte para formar una película lipídica fina. Si se desea, la película puede redisolverse en un disolvente adecuado, tal como terc-butanol, y después liofilizarse para formar una mezcla de lípidos más homogénea que está en forma de polvo más fácil de hidratar. Esta película se cubre con una disolución tamponada acuosa y se deja hidratar, generalmente a lo largo de un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaño de las vesículas multilaminares resultantes puede desplazarse hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos bajo condiciones de agitación más vigorosas, o añadiendo detergentes solubilizantes, tales como desoxicolato.

En una realización preferida, se producen liposomas en su mayor parte unilaminares mediante el método de la evaporación en fase inversa de Szoka y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198 (1978).

Las vesículas unilaminares en general se preparan mediante sonicación o extrusión. La sonicación se realiza en general con un sonicador de tipo de baño, tal como un sonicador de micropunta Branson a una temperatura controlada, determinada por el punto de fusión del lípido. La extrusión puede realizarse con extrusores de biomembrana, tal como el extrusor de biomembrana Lipex. Un tamaño de poro definido en los filtros de extrusión pueden generar vesículas liposómicas unilaminares de tamaños específicos. Los liposomas también pueden formarse mediante extrusión a través de un filtro de cerámica asimétrico, tal como un microfiltro Ceraflow, disponible en el mercado en Norton Company, Worcester, MA.

Tras la preparación de los liposomas, los liposomas que no hayan sido calibrados durante la formación pueden calibrarse mediante extrusión para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de tamaño de los liposomas. Un intervalo de tamaño de aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros permite que la suspensión de liposomas sea esterilizada mediante filtración a través de un filtro convencional, generalmente un filtro de 0,22 micrómetros. El método de esterilización mediante filtración puede realizarse sobre una base de alta capacidad de procesamiento si los liposomas han sido reducido de tamaño hasta aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros.

Están disponibles varias técnicas para calibrar liposomas hasta un tamaño deseado. Un método de calibrado se describe en las patentes de EEUU nº 4.529.561 o 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas mediante sonicación de baño o de sonda produce un readucción progresiva del tamaño hasta pequeñas vesículas unilaminares con un tamaño menor que 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro método que se base en la energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilaminares se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados, generalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposómicas puede determinarse mediante dispersión de luz cuasieléctrica (QELS), según se describe en Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:421-450 (1981). El diámetro medio de los liposomas puede reducirse mediante sonicación de los liposomas formados. Pueden alternarse ciclos de sonicación intermitente con evaluación mediante QELS para guiar una síntesis de liposomas eficaz.

La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de tamaño de poro pequeño o de una membrana cerámica asimétrica también es un método eficaz para reducir el tamaño de los liposomas hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. Generalmente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño deseada de los liposomas. Los liposomas pueden extrusionarse a través de membranas con un tamaño de poro sucesivamente más pequeño para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas. Para su uso en la presente invención, los liposomas tendrán un tamaño de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 0,5 micrómetros. Son más preferidos los liposomas que tienen un tamaño de aproximadamente 0,05 a 0,2 micrómetros.

III. Formación de complejos de lípido:ácido nucleico

Esta invención ha descubierto que los complejos de lípido:ácido nucleico estabilizados (por ejemplo, que tienen el

ácido nucleico condensado y/o un polímero hidrófilo) no tienden a formar grandes agregados visibles y tienen una mayor eficacia de transfección y caducidad. Las proporciones de ácido nucleico/liposoma para preparar los complejos de lípido:ácido nucleico que no forman grandes agregados visibles pueden ser determinadas por los expertos en la técnica. Generalmente, la proporción se determina mezclando cantidades fijadas de un ácido nucleico, por ejemplo un plásmido, con diversas cantidades de liposomas (véase el ejemplo 1). En general, los complejos de lípido:ácido nucleico se forman pipeteando el ácido nucleico (por ejemplo, ADN plasmídico) en una suspensión de liposomas de igual volumen y mezclando con rapidez. Habitualmente, los liposomas que contienen 5-15 nmol de un lípido, tal como DDAB o DOPE (según se describió anteriormente) forman un complejo con 1 µg de plásmido sin formar grandes agregados visibles. La inspección para detectar grandes agregados visibles generalmente se realiza sin microscopio. El criterio de valoración de la titulación de las cantidades de lípido y ácido nucleico también se consigue ensayando el aumento en la eficacia de la transfección, *in vitro* o *in vivo*, comparado con un control no estabilizado (según se describe a continuación).

Para evitar que los complejos de lípido:ácido nucleico formen grandes agregados y pierdan la actividad de transfección a lo largo del tiempo, se establecen dos estrategias: (1) incorporar una pequeña cantidad de un polímero hidrófilo, tal como PEG-PE (en una proporción molar de aproximadamente 1%) en los complejos de lípido:ácido nucleico a los pocos minutos después de su preparación; y/o (2) condensar el ácido nucleico con un polication, tal como una poliamina (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 5,0 nmol de espermidina por µg de ADN) antes de mezclar con los liposomas. La cantidad óptima de poliaminas y polímero hidrófilo puede ser determinada por los expertos en la técnica titulando la poliamina o el polímero hidrófilo con el ácido nucleico, de modo que los complejos formados no formen grandes agregados, por ejemplo visibles. El tamaño de estos complejos de lípido:ácido nucleico puede calcularse mediante dispersión de luz dinámica que esté en el intervalo de 410 ± 150 nm. El criterio de valoración de la titulación también se consigue ensayando el aumento en la eficacia de la transfección, *in vitro* o *in vivo*, comparado con un control no estabilizado (según se describe a continuación).

IV. Transfección y terapia génica con complejos de lípido:ácido nucleico

La presente invención proporciona complejos de lípido:ácido nucleico que tienen mayor caducidad, para la transfección de células de mamífero *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, y métodos para la producción y la transfección de estos complejos. En particular, esta invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que se ha condensado poniéndolo en contacto con un polication orgánico, muestra una mayor caducidad. Además, esta invención se basa en el descubrimiento inesperado de que un complejo de lípido:ácido nucleico, que se mezcla con un polímero hidrófilo después de la formación del complejo de lípido:ácido nucleico, muestra una alta actividad de transfección y mayor caducidad, según se mide mediante la actividad de transfección después de la conservación. Estos complejos de lípido:ácido nucleico que tienen mayor caducidad son útiles, por ejemplo, para la transfección *in vitro* e *in vivo* de células, y para el transporte de ácidos nucleicos hacia el interior de células para una terapia génica *in vivo* en mamíferos y después de su administración intravenosa.

La utilización de complejos de lípido:ácido nucleico para transportar ácidos nucleicos hacia el interior de diferentes tipos de células de mamífero da como resultado un método seguro de transferencia y una alta eficacia de la transferencia de genes. La transfección de células *in vivo* con complejos de lípido:ácido nucleico es conocida por los expertos en la técnica y puede realizarse utilizando técnicas convencionales, tal como se analiza en el ejemplo 1 (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., 1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995)).

Los expertos en la técnica pueden utilizar en la presente invención cualquier ácido nucleico heterólogo que sea adecuado para la introducción en una célula hospedante. Los genes útiles para la terapia génica pueden introducirse en mamífero utilizando los métodos y los vectores de esta invención. Los genes que codifican proteínas sanguíneas, enzimas, hormonas, ribozimas, ARN antisentido, inhibidores víricos, y proteínas del canal iónico son ejemplos de ácidos nucleicos heterólogos útiles en la terapia génica. Puede utilizarse un gen heterólogo funcional para reemplazar a un gen mutado en un mamífero utilizando terapia génica. Por ejemplo, el gen que codifica la β-globina puede utilizarse para tratar la β-talasemia; y el gen que codifica CFTR puede utilizarse para tratar la fibrosis quística. Pueden utilizarse genes que codifican marcadores seleccionables, tales como los que confieren resistencia a antibióticos, para detectar y aislar células transfectadas con el complejo de lípido:ácido nucleico. Genes indicadores, tales como luciferasa, β-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), hormona del crecimiento humana (hGH), y la proteína fluorescente verde (GFP) son ejemplos preferidos de genes que pueden utilizarse en ensayos para determinar la eficacia de la transfección. En una realización de la invención, la luciferasa puede utilizarse como gen indicador para determinar la eficacia de la transfección.

La eficacia de transfección de un gen indicador puede determinarse con un ensayo que sea apropiado para el gen indicador que se está utilizando. Estos ensayos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo del indicador hGH tiene una base inmunológica y emplea kits de radioinmunoensayo disponibles en el mercado. En una realización preferida de la invención, se utiliza el ensayo de luciferasa para detectar la transfección y la expresión del gen indicador de luciferasa. El ensayo de luciferasa se prefiere porque es muy sensible y no emplea radiactividad. Puede utilizarse un luminómetro para medir la actividad de la enzima luciferasa, según se describe en el ejemplo 1.

La terapia génica proporciona métodos para combatir enfermedades infecciosas crónicas, tales como la infección por VIH, así como enfermedades no infecciosas, tales como el cáncer y defectos de nacimiento (véase, en general, Anderson, *Science*, 256:808-813 (1992); Yu *et al.*, *Gene Ther.*, 1:13-26 (1994)). La terapia génica puede utilizarse para transducir células con un procedimiento *ex vivo* o *in vivo*. Los métodos *ex vivo* para la terapia génica implican transducir la célula fuera del mamífero con un complejo de lípido:ácido nucleico de esta invención, y volver a introducir la célula en el organismo. Las células pueden ser células pluripotenciales hematopoyéticas aisladas a partir de médula ósea u otras células que puedan ser transfectadas por los complejos de lípido:ácido nucleico.

En los seres humanos, las células pluripotenciales hematopoyéticas pueden obtenerse a partir de una diversidad de fuentes que incluyen sangre de cordón umbilical, médula ósea, y sangre periférica movilizada. Puede lograrse la purificación de las células CD34⁺ mediante procedimientos de afinidad de anticuerpos (véase Ho *et al.*, *Stem Cells*, 13 (supl. 3):100-105 (1995); véase también Brenner, *J. Hematotherapy*, 2:7-17 (1993)). Las células también pueden aislarse y cultivarse a partir de pacientes. Como alternativa, las células utilizadas para los procedimientos *ex vivo* puede estar conservadas en un banco de células (por ejemplo, un banco de sangre). La ventaja de utilizar células pluripotenciales es que pueden diferenciarse en otros tipos celulares *in vitro*, o pueden introducirse en un mamífero (tal como el donante de las células) en donde se injertarán en la médula ósea. Los métodos para diferenciar células de la médula ósea *in vitro* en tipos celulares inmunológicos importantes desde el punto de vista clínico utilizando citoquinas, tales como GM-CSF, IFN- γ y TNF- α , son conocidos (véase, por ejemplo, Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176:1693-1702 (1992)).

El transporte de un ácido nucleico también puede lograrse utilizando una terapia génica *in vivo*. Los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención pueden administrarse directamente a un paciente, preferiblemente un ser humano. La administración *in vivo* y *ex vivo* se realiza mediante cualquiera de las vías que normalmente se emplean para introducir una molécula o una célula para que, en último término, se ponga en contacto con células de tejidos o sangre. Los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención se administran de cualquier manera adecuada, preferiblemente con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los métodos adecuados para administrar estas partículas no víricas en el contexto de la presente invención a un paciente son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran utilizando una administración en aerosol (por ejemplo, empleando un nebulizador u otro dispositivo de aerosolización), y por vía parenteral, es decir, intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran mediante una administración en aerosol o por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en embolada. Las formulaciones concretas que son adecuadas para este uso pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (17^a ed., 1985). Generalmente, las formulaciones comprenderán una disolución de los complejos de lípido:ácido nucleico suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso.

V. Composiciones farmacéuticas

Se preparan composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención según técnicas convencionales, y también comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, se empleará disolución salina normal como vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, disolución isotónica (por ejemplo, dextrosa), disolución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, que incluyen glicoproteínas para potenciar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y tamponantes, agentes para ajustar la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Además, la suspensión de complejos de lípido:ácido nucleico puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos frente a los daños por radicales libres y peroxidativos durante la conservación. Son adecuados extintores de radicales libres lipófilos, tales como alfa-tocoferol y quelantes específicos de hierro hidrosolubles, tales como ferrioxamina.

La concentración de los complejos de lípido:ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar mucho, es decir, desde menos de aproximadamente 0,05%, normalmente al o al menos aproximadamente 2-5%, hasta un máximo del 10% al 30% en peso, y se seleccionarán principalmente por sus volúmenes de líquido, viscosidades, etc., según la vía de administración concreta seleccionada. Por ejemplo, la concentración puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociada al tratamiento. Esto puede resultar particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada con la aterosclerosis o hipertensión grave. Como alternativa, los complejos de inmólípido:ácido nucleico compuestos por lípidos irritantes pueden diluirse hasta concentraciones bajas para disminuir la inflamación en el sitio de la administración. La cantidad de complejo de lípido:ácido nucleico administrada dependerá del fármaco concreto utilizado, del estado de enfermedad que se está tratando, y del criterio del médico. En general, la cantidad de complejos de lípido:ácido nucleico administrada será suficiente para transportar una dosis terapéuticamente eficaz del ácido nucleico. La cantidad de complejo de lípido:ácido nucleico necesaria para transportar una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada por los expertos en la técnica. Unas

dosificaciones típicas de complejo de lípido:ácido nucleico serán en general entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg de ácido nucleico por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg de ácido nucleico/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 5,0 mg de ácido nucleico/kg de peso corporal. Para la administración a ratones, la dosis es generalmente de 50-100 µg por 20 g de ratón.

VI. Ensayo de la semivida en sangre

Una ayuda para la localización del complejo de lípido:ácido nucleico en un tejido diana es un tiempo de residencia prolongado del complejo de lípido:ácido nucleico en la corriente sanguínea después de la administración. Una medida del tiempo de residencia del complejo de lípido:ácido nucleico en la corriente sanguínea es la proporción sangre/RES determinada en un momento seleccionado después de la administración del complejo. Generalmente, los complejos de lípido:ácido nucleico que contienen un marcador (por ejemplo, marcador fluorescente, reactivo denso a electrones, o marcador radiactivo), interno dentro del complejo o unido a un lípido que forma el complejo, se inyectan en el organismo de ensayo. Después de un periodo de tiempo fijado, el organismo se sacrifica y se compara la cantidad de marcador detectado en la sangre (por ejemplo, midiendo la luminiscencia, o mediante recuento de centelleo) con la localizada en tejidos concretos (por ejemplo, hígado o bazo).

El tiempo de retención de los complejos de lípido:ácido nucleico en la sangre también puede determinarse con sencillez tomando muestras de sangre a intervalos fijados después de la administración de los complejos de lípido:ácido nucleico que contienen marcador, y determinando la cantidad de marcador que permanece en la circulación. El resultado puede expresarse como la fracción de la dosis original.

VII. Ensayo de la transfección de tejidos por los complejos de lípido:ácido nucleico

La transfección de células diana por los complejos de lípido:ácido nucleico de esta invención puede determinarse de forma similar mediante la administración de complejos de lípido:ácido nucleico que contienen un ácido nucleico que en sí mismo es detectable o que codifica un producto detectable. Después se recogen muestras biológicas (por ejemplo, biopsias de tejidos o muestras de fluidos) y se ensayan para la transfección mediante la detección de la presencia del propio ácido nucleico transfectado o mediante la detección de la presencia del producto expresado del ácido nucleico.

El propio ácido nucleico puede seleccionarse para que contenga una secuencia que pueda detectarse con facilidad, por ejemplo, mediante amplificación del ácido nucleico. En este caso, el ácido nucleico se seleccionará de modo que tenga sitios de cebadores seleccionados para permitir una amplificación exclusiva del ácido nucleico particular y no de otro en la muestra de tejido biológico que se va a ensayar para la transfección.

Los medios para detectar secuencias de ADN específicas son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden emplearse sondas oligonucleotídicas elegidas por ser complementarias con una subsecuencia seleccionada con la región. Como alternativa, secuencias o subsecuencias pueden amplificarse mediante un diversidad de técnicas de amplificación del ADN que incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis *et al.*, *PCR Protocols: A guide to Methods and Application* (1990)), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace, *Genomics*, 4:560 (1989); Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077 (1988); Barringer *et al.*, *Gene*, 89:117 (1990)), amplificación de la transcripción (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989)), y replicación de secuencia autónoma (Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990)).

En una realización particularmente preferida, la transfección se evalúa detectando la presencia o la ausencia o cuantificando un producto génico en uno o más tejidos. Cualquier gen que exprese un producto que pueda ensayarse con facilidad proporcionará un indicador adecuado para el presente ensayo. Los genes indicadores adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen, pero no se limitan a cloranfenicol acetil transferasa bacteriana (CAT), beta-galactosidasa, o luciferasa (véase, por ejemplo, Alam *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 188:245-254 (1990)). Un gen indicador particularmente preferido es el gen Fflux, según se ilustra en los ejemplos.

VIII. Ensayo de la caducidad

Tal como se indicó anteriormente, el término "caducidad" se emplea en la presente para referirse al periodo de tiempo que puede conservarse el complejo de lípido:ácido nucleico (bajo condiciones definidas, por ejemplo, en un tampón a 4 °C) antes de perder su actividad biológica. La actividad biológica ensayada para la determinación de la caducidad en la presente invención es la capacidad del complejo de lípido:ácido nucleico para transfectar células de mamífero *in vivo* después de la administración intravenosa.

En una realización preferida, la caducidad se determina conservando los complejos de lípido:ácido nucleico durante periodos de tiempo variables, inyectando uno o más animales de ensayo con el complejo, y ensayando tejidos seleccionados en el animal para la transfección (por ejemplo, la expresión de un gen indicador) tal como se describió anteriormente y se ilustra en los ejemplos.

Se apreciará que la caducidad puede expresarse en términos absolutos, es decir, la cantidad de tiempo en que la

composición puede conservarse sin perder actividad. Como alternativa, la caducidad puede expresarse en términos relativos con referencia a una composición diferente. Así, por ejemplo, cuando el complejo particular muestra una actividad de transfección después de un periodo de conservación fijado y esta actividad es mayor que la actividad de un complejo diferente conservado de modo similar durante la misma cantidad de tiempo, se dice que el complejo particular tiene una mayor caducidad comparado con el complejo diferente.

IX. Transporte dirigido de los complejos de lípido:ácido nucleico hasta tejidos específicos

Pueden utilizarse restos de transporte dirigido específicos con los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención para el transporte dirigido a células o tejidos específicos. En una realización, el resto de transporte dirigido, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, se une a un polímero hidrófilo y se combina con el complejo de lípido:ácido nucleico después de la formación del complejo. Así, el uso de un resto de transporte dirigido en combinación con un complejo de lípido:ácido nucleico efector genérico proporciona la capacidad de adaptar de modo conveniente el complejo para el transporte a células y tejidos específicos.

Los ejemplos de efectores en los complejos de lípido:ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que codifican citotoxinas (por ejemplo, la toxina de la difteria (DT), la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), la toxina pertussis (PT), y la adenilato ciclasa de pertussis (CYA)), ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ácidos nucleicos marcados, y ácidos nucleicos que codifican genes supresores de tumores, tales como p53, p110Rb, y p72. Estos efectores pueden dirigirse específicamente a células, tales como células de cáncer, células inmunológicas (por ejemplo, células B y T), y otras dianas celulares deseadas, con un resto de transporte dirigido. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, muchos cánceres se caracterizan por la sobreexpresión de marcadores de la superficie celular, tales como HER2, que se expresa en células de cáncer de mama, o IL17R, que se expresa en gliomas. Se emplean restos de transporte dirigido, tales como anticuerpos anti-HER2 y anti-IL17R o fragmentos de anticuerpos, para transportar el complejo de lípido:ácido nucleico a la célula elegida. Así, la molécula efectora se transporta hasta el tipo celular específico, proporcionando un tratamiento terapéutico útil y específico.

X. Kits de complejos de lípido:ácido nucleico

La presente invención también proporciona kits para preparar los complejos de lípido:ácido nucleico descritos anteriormente. Estos kits pueden prepararse con materiales y reactivos fácilmente disponibles, según se describió anteriormente. Por ejemplo, estos kits pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: liposomas, ácidos nucleicos (condensados o no condensados), polímeros hidrófilos, polímeros hidrófilos derivatizados con restos de transporte dirigido, tales como fragmentos Fab', e instrucciones. Puede prepararse una amplia variedad de kits y componentes según la presente invención, dependiendo del usuario previsto del kit y de las necesidades concretas del usuario. Por ejemplo, el kit puede contener uno cualquiera de una serie de restos de transporte dirigido para transportar el complejo hasta un tipo celular específico, según se describió anteriormente.

El kit puede incluir opcionalmente materiales de instrucción que contienen orientaciones (es decir, protocolos) que indiquen el uso del complejo de lípido catiónico:ácido nucleico para transfectar células *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Generalmente, los materiales de instrucción describen el procedimiento para preparar el complejo de lípido:ácido nucleico a partir de liposomas y ácidos nucleicos, según se describió anteriormente. Los materiales de instrucción también describen cómo mezclar el polímero hidrófilo con el complejo de lípido:ácido nucleico. Además, los materiales de instrucción pueden describir procedimientos para transfectar células con el complejo de lípido:ácido nucleico.

Aunque los materiales de instrucción generalmente comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. Esta invención contempla cualquier medio capaz de almacenar esetas instrucciones y de comunicarlas al usuario final. Estos medios incluyen, pero no se limita a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Estos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionen estos materiales de instrucción.

Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de complejos de lípido:ADN plasmídico estables para el transporte de genes *in vivo*

A. Materiales y métodos

1. Lípidos y otros reactivos

La DOPE se adquirió en Avanti (Alabaster, AL). El colesterol altamente purificado se obtuvo en Calbiochem (San Diego, CA). El DDAB y el dextrano (P.m. 40.000) se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO). El DDAB se recrystalizó una vez de una disolución de acetona-metanol. La D-luciferina se obtuvo en Boehringer Mannheim. El PEG-PE fue un obsequio de Sequus Pharmaceuticals (Menlo Park, CA). El DC-Col, MMCE y DOGS se obtuvieron en UCSF Gene Transfer Vehicle Core of Gene Therapy Center. ESPM, DOTAP, POEPC, DOEPC, DMEPC y DODAP fueron

obsequios de Avanti (Alabaster, AL). La disolución de cloroformo de cada lípido se conservó bajo una atmósfera de argón en ampollas selladas a -40 °C. Se adquirieron otros reactivos con la mayor pureza posible y se utilizaron sin más purificación.

2. Preparación de liposomas

5 Se prepararon liposomas catiónicos pequeños en una disolución de dextrosa al 5% (en p/v) de la siguiente manera. Se mezclaron DDAB u otros lípidos catiónicos en cloroformo con DOPE y/o colesterol en la proporción molar deseada, y el disolvente se eliminó lentamente a presión reducida a 50 °C en un evaporador rotatorio. La película de lípidos seca se hidrató con una disolución de dextrosa al 5% precalentada hasta 50 °C y el recipiente se selló bajo una atmósfera de argón. La suspensión de lípidos hidratada se sonicó en un sonicador de baño (Lab Supplies, Hicksville, N.Y.) durante 5-10 min a 50 °C. La concentración final de liposomas fue de 5 mM de lípidos catiónicos, y el tamaño de los liposomas se midió mediante dispersión de luz dinámica y fue de 195 ± 65 nm. Los liposomas sonicados se conservaron bajo una atmósfera de argón a 4 °C hasta su uso.

3. Sistema indicador de luciferasa

15 Se construyó el plásmido pCMV/IVS-luc⁺ como sigue. Un fragmento que contenía el promotor de CMV y el intrón de IgE sintético se cortó de pBGt2.CAT utilizando Spe I y Hind III, y se clonó en pBSIIKS⁺. El ADNc que codifica la luciferasa de luciérnaga modificada (luc⁺), que incluye la señal de poli(A) tardía de SV40, se cortó del vector pGL3-Basic (Promega) con Hind III y Sal I, y se colocó en el clón pBS-CMV-IVS cadena abajo del corte y empalme. Los plásmidos se purificaron utilizando procedimientos de lisis alcalina adaptados y diseñados por Qiagen Corp. (Chatsworth, CA). Se midió la pureza del plásmido mediante la proporción de la absorbancia a 260 nm frente a 280 nm, y se conservó en tampón que contenía Tris-Cl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0 a concentraciones de 1-2 mg/ml.

4. Preparación de complejos de transfección

25 Antes de los experimentos de transfección, se determinó la proporción óptima de ADN/liposomas para formar los complejos que no formasen agregados grandes, mezclando una cantidad fijada de plásmico con diversas cantidades de liposomas. En general, los complejos de transfección se formaron pipeteando el plásmido hacia una suspensión de liposomas de igual volumen y mezclando con rapidez. De modo habitual, los liposomas que contienen 8-12 moles de DDAB pueden formar complejos con 1 µg de plásmido sin formar grandes agregados visibles. Estos complejos tienen un exceso de carga positiva, pero siguen tendiendo a agregarse con el tiempo durante la conservación a 4 °C, y pierden actividad de transfección en 4 días. Para los experimentos *in vitro*, que precisan complejos muy diluidos, se emplearon complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico ("CLDC") a 5 nmol de DDAB por µg de ADN. Para evitar que los complejos de lípido:ADN plasmídico formen agregados grandes y pierdan actividad de transfección con el tiempo, se adoptaron dos estrategias: (1) incorporar una pequeña cantidad de PEG-PE (en una proporción molar de aproximadamente 1%) en los complejos de lípido:ADN plasmídico a los pocos minutos después de su preparación; y/o (2) condensar el ácido nucleico con poliaminas (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 5,0 nmol de espermidina por µg de ADN) antes de mezclar con los liposomas. La cantidad óptima de poliaminas se determinó mediante la titulación de las poliaminas con ADN antes de que se formasen los agregados grandes. El tamaño de estos complejos se calculó mediante dispersión de luz dinámica que esté en el intervalo de 410 ± 150 nm.

5. Ensayo de la expresión del gen indicador

40 La luciferasa purificada se obtuvo en Boehringer Mannheim como un patrón para calibrar el luminómetro y para construir un patrón de control para la actividad específica relativa de la luciferasa. La expresión del gen indicador en un extracto de tejido se presentó en cantidades de nanogramos convirtiendo la unidad de luz relativa medida en un luminómetro en una unidad de peso, según una curva patrón. La luciferasa expresada en células o tejidos se extrajo con una lisis química de las células. El tampón de lisis eficaz consistió en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,8, Triton X-100 al 1%, DTT 1 mM, y EDTA 2 mM.

45 Se obtuvieron ratones CD1 hembra (4-6 semanas, peso de aproximadamente 25 g) en Charles River Laboratory. Los ratones recibieron los complejos de lípido:ADN plasmídico mediante una inyección en la vena de la cola y se sacrificaron 24 h después. Los animales anestesiados se perfusionaron con disolución salina tamponada con fosfato frío (PBS) a través de una punción cardíaca. Cada tejido se diseccionó y se lavó en PBS, y después se homogeneizó en un tubo de cultivo de fondo redondo de 6 ml que contenía 500 µl de tampón de lisis. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 min mezclando de vez en cuando. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Se midió la actividad luciferasa de cada tejido mezclando 100 µl del sustrato de luciferasa reconstituido (Promega, Madison, WI) con 20 µl del sobrenadante del homogeneizado de tejido en el sistema de inyección de un luminómetro. El pico de la emisión de luz se midió durante 10 sg a 20 °C. Las unidades de luz relativas de cada muestra se convirtieron en la cantidad de luciferasa en el extracto de tejido mediante la comparación con una curva patrón que se estableció para cada conjunto de experimentos. Se determinó el contenido en proteínas del extracto utilizando kits de ensayo de proteínas (BioRad, Richmond, CA). El fondo lo constituye el recuento de tampón de lisis solo.

Se cultivaron células SK-BR-3 (Park *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1327-1331 (1995)) en medio 5 A de

McCoy suplementado con suero de ternera bovino inactivado con calor al 10% y en CO₂ al 5%. Las células SK-BR-3 en cultivo de monocapa se cultivaron a 50.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante la noche. Cada pocillo recibió aproximadamente 0,5-1 µg de pCMV/IVS-luc⁺ a los 20 min de la formación del complejo. Las células se recolectaron después de 24 hr de incubación con los complejos a 37 °C. Se determinó la actividad luciferasa en las células según se describió anteriormente.

B. Resultados

1. Optimización del lípido "auxiliar"

El uso de liposomas catiónicos para la transferencia de genes *in vitro* se ha generalizado desde que Felgner *et al.* publicaron su estudio (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987)). Después se estableció (Felgner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:2550-2561 (1994)) que DOPE era, con mucho, el lípido "auxiliar" más eficaz para la transfección génica *in vitro*, y este resultado ha sido confirmado por varios laboratorios (Farhood *et al.*, en *Gene therapy for Neoplastic Diseases*, pp. 23-55 (Huber y Lazo, eds., 1994); Zhou *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1189:195-203 (1994)). Se ha sugerido, basándose en estudios *in vitro*, que DOPE puede facilitar el transporte citoplásmico a través de una fusión con la membrana después de que los complejos de lípido cargado positivamente:ADN plasmídico se hayan unido a la membrana celular (Zhou *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1189:195-203 (1994)). Aunque Friend *et al.* no obtuvieron pruebas morfológicas de que los complejos de lípido DOTMA/DOPE:ADN plasmídico se fusionasen directamente con la membrana plasmática, no excluyeron la posibilidad de acontecimientos de fusión (Friend *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1278:41-50 (1996)). Sugirieron que los complejos son endocitados y que los lípidos catiónicos rompían las membranas endosómicas/lisosómicas y así facilitaban la liberación de los complejos de ADN hacia el citoplasma y en último término hacia el núcleo.

Al contrario de la mayoría de las expectativas, el papel "auxiliar" de DOPE establecido a partir de estudios *in vitro* no es evidente para el transporte de genes *in vivo* después de la inyección intravenosa de los complejos. Cuando se incluye DOPE en liposomas catiónicos con DDAB, la transfección de genes *in vivo* es inhibida. Esta inhibición dependiente de DOPE se muestra en la figura 1. Se descubrió que el colesterol, y no la DOPE, era eficaz como lípido "auxiliar" para el transporte de genes *in vivo*. Se produce una reducción en 10 veces en la expresión de luciferasa en pulmones de ratón cuando la mitad del colesterol se reemplaza por DOPE. Los resultados *in vivo* de DDAB y otros liposomas catiónicos no son coherentes con la suposición general de que DOPE es un lípido "auxiliar" adecuado. Por el contrario, DOPE en los complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico atenúa la transfección *in vivo* hasta un grado tan elevado que DOPE se considera un agente inhibidor en formulaciones para el transporte de genes *in vivo*. En informes de reciente publicación se ha elegido el colesterol para los estudios *in vivo* (Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:24864-24870 (1995); Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34:13537-13544 (1995)), en los que los autores no explican cómo y por qué seleccionaron diferentes lípidos "auxiliares" para sus diseños experimentales, es decir, DOPE para los estudios *in vitro* y colesterol para los estudios *in vivo*. Desde hace tiempo se conoce la estabilización de liposomas aniónicos y neutros en la sangre por el colesterol (Mayhew *et al.*, *Cancer Treat. Rep.*, 63:1923-1928 (1979)). Por tanto, es obvio que para el transporte de genes sistémico se debe considerar la estabilidad de los complejos de lípido:ADN plasmídico en la sangre, de la cual se sabe que diversos de sus componente reaccionan con complejos macromoleculares. De hecho, el estudio preliminar de diversas formulaciones de complejos de lípido:ADN plasmídico empleando la microscopía electrónica de congelación y fractura han demostrado que los complejos que contienen colesterol son más estables desde el punto de vista estructural que los complejos que contienen DOPE en presencia de suero.

Utilizando los complejos de lípido DDAB/Col:ADN plasmídico (8 nmol de DDAB/µg de ADN) para experimentos de transfección *in vivo*, la expresión detectable de luciferasa en el pulmón de un ratón de 25 g requiere una dosis de ADN que varía de 30 µg a 60 µg. Habitualmente, 40-60 µg de ADN plasmídico por ratón produce una expresión génica constante. Se descubrió que la cantidad de DDAB normalmente asociada con 80 µg de ADN (o más) por ratón era demasiado tóxica para el animal. La expresión de la luciferasa en diversos tejidos se muestra en la figura 2. Tal como se ha observado anteriormente (Zhu *et al.*, *Science*, 261:209-211 (1993); Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:24868-24870 (1995); Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34:13537-13544 (1995)), se encontró la expresión máxima en tejido de pulmón. Para 60 µg de plásmido inyectados, se obtuvieron habitualmente 1-2 ng de luciferasa por mg de proteína de tejido. La figura 3 muestra la duración de la expresión del gen indicador en tejido de pulmón. La expresión de luciferasa disminuye con rapidez y alcanza niveles indetectables en 2 semanas. Zhu *et al.* indican que, tras la inyección intravenosa de complejos de DOTMA/DOPE (1:1):plásmido a ratones adultos, la expresión del gen indicador (CAT) resultó generalizada entre diversos tejidos, y que la expresión máxima provenía de complejos con una proporción de 1 µg de plásmido a 8 nmol de lípidos totales (Zhu *et al.*, *Science*, 261:209-211 (1993)). Sin embargo, a esta proporción (que corresponde a 1 µg de plásmido por 4 nmol de lípido catiónico), los complejos de lípido DDAB/Col:ADN plasmídico tienden a agregar y no producen una expresión génica mensurable en esta investigación.

Puesto que se han empleado diferentes genes indicadores en diferentes laboratorios, es difícil atribuir las variaciones en la eficacia del transporte génico *in vivo* a cambios en la formulación de los liposomas. Para una comparación directa de los resultados en la bibliografía, las unidades de luz relativas de la actividad luciferasa medidas en un luminómetro se convirtieron en un patrón de luciferasa purificada. Haciendo esto, el pico de actividad

de transfección de las formulaciones de DDAB/Col fue 3 órdenes de magnitud mayor que los valores indicados recientemente en experimentos comparables (Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9742-9746 (1995)). Puesto que en el diseño experimental se emplea el mismo gen indicador junto con el mismo promotor, la diferencia en la expresión puede reflejar la selección de la formulación de liposomas. De hecho, DDAB/Col era uno de los vehículos de transporte de genes más eficaz entre muchas formulaciones de 18 lípidos catiónicos diferentes que se han seleccionado recientemente. Los resultados preliminares de la expresión en pulmón de ratón tras una inyección intravenosa indican que DOTMA/Col, DOTAP/Col, MMCE/Col y ESPM/Col producen una actividad de transfección de 10-100% de DDAB/Col, DOGS/Col, POEPC/Col, LYSPE/DOPE y DC-Col/DOPE produjeron 1-10% de DDAB/Col. DOEPC/Col, DMEPC/Col, DODAP/Col y DDAB/DOPE no produjeron ninguna actividad mensurable.

En paralelo con los estudios de transfección, se estudió la morfología de estos complejos en el suero y en medio celular mediante microscopía electrónica de congelación y fractura. Cuando se estudian en suero de ratón al 50% (tiempo de incubación de 10 min), los CLDC no estabilizados de un día son tan pequeños como en un tampón de baja fuerza iónica (100-250 nm) pero muestra pocas protuberancias. Los CLDC no estabilizados de 6 días incubados en suero de ratón al 50% se muestran como agregados muy compactos de partículas esféricas, con un gran número de partículas unidas. Estas formulaciones han perdido toda su actividad de transfección *in vivo* a los 4 días. No se observan protuberancias fibrilares residuales.

Los CLDC estabilizados con PEG-PE incubados en suero de ratón al 50% eran pequeños (100-200 nm) incluso después de 6 días. De modo similar, los CLDC preparados con ADN condensado también eran bastante pequeños incluso después de 6 días de conservación. De modo específico, los CLDC tenían una forma de "chincheta con cabezal" que eran estructuralmente estables en presencia de suero.

Después de la incubación en medio celular (RPMI-1640 con FCS al 10%) los CLDC no estabilizados de 6 días eran morfológicamente similares a los incubados en suero de ratón, según se describió anteriormente. Sin embargo, estos complejos no estaban tan compactados y no mostraban protuberancias fibrilares. Se observó un morfología similar con CLDC estabilizados con PEG-PE y CLDC de ADN condensado incubados en medio celular.

2. Aumento de la caducidad para la actividad de transfección

La relación estre estabilidad estructural y actividad de transfección de los complejos de lípido:ADN plasmídico no ha sido detallada en los informes publicados hasta la fecha. Se han establecido procedimientos de selección para evitar que los complejos de lípido:ADN plasmídico formen agregados grandes cambiando la proporción de ADN a lípido de una carga negativa neta a una carga positiva. Se prepararon complejos de lípido:ADN plasmídico de cada lípido catiónico concreto a diversas proporciones de ADN/lípido, y las formulaciones estables y metaestables resultantes se utilizaron para la transfección *in vivo*. Se descubrió que los complejos que contenían de 8 a 12 nmol de lípido catiónico por μg de ADN tenían la mayor actividad de transfección *in vivo*. Sin embargo, la actividad de transfección de estos complejos disminuyó con el tiempo. Sin modificar los procedimientos para formar los complejos de lípido:ADN plasmídico, se produjo una agregación visible en unos pocos días, y la actividad de transfección disminuyó en más de 1000 veces hasta casi los niveles de fondo después de un mes de conservación a 4 °C (figura 4). Por tanto, se emprendió la formulación de complejos de lípido:ADN plasmídico estabilizados que pudiesen mantener una alta actividad de transfección *in vivo* durante la conservación.

i. Aumento de la estabilidad de la transfección: PEG-PE

La inserción de PEG-PE (1% de los lípidos totales) en complejos de lípido:ADN plasmídico recién formados no sólo puede evitar que los complejos se agreguen durante la conservación, sino también que los complejos que contienen PEG-PE muestran una actividad de transfección bastante alta *in vivo*, una actividad sólo ligeramente inferior comparada con los complejos sin PEG-PE (figura 4). La incorporación de PEG-PE en los complejos es evidente a la vista de la inhibición relacionada con la dosis de la actividad de transfección con un porcentaje creciente de PEG-PE (los resultados no se muestran). De modo inesperado, la conservación de los complejos que contienen PEG-PE a 4 °C ha restablecido lentamente la actividad original, tal como se muestra en la figura 4. Los aspectos mecánicos del efecto de inhibición sobre la transfección por PEG-PE, así como la recuperación de la actividad tras una conservación a baja temperatura, no se conocen en el momento actual.

ii. Aumento de la estabilidad de la transfección: poliaminas

Además del papel del PEG-PE para aumentar la caducidad de complejos de lípido:ácido nucleico, la condensación del ácido nucleico con poliaminas también produce un aumento similar inesperado de la caducidad de los complejos. Los complejos de lípido:ADN plasmídico formados con ADN condensado son estables a una proporción menor de lípido a ADN sin agregación. La figura 4 muestra el nivel de actividad de transfección *in vivo* de esta preparación, y su destino durante la conservación. De nuevo, se descubrió un aumento inesperado en la actividad de transfección en complejos de lípido:ADN plasmídico tratados con poliamina envejecidos, cuando se compara con la de muestras que no han sido pretratadas con poliaminas y utilizadas inmediatamente después de que se formasen los complejos. En fechas recientes se ha publicado una estrategia diferente para obtener complejos de lípido catiónico/ADN estables complejando el plásmido con el lípido en micelas de detergente-lípido (Hofland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7305-7309 (1996)). Sin embargo, dichos compuestos mantuvieron sólo 30% de la eficacia de transfección

en suero al 15% en los resultados indicados, *in vitro*, y no se ofrecen resultados *in vivo*.

iii. Aumento de la estabilidad de transfección: liofilización

Por último, se establecieron condiciones para la estabilización de los complejos de lípido:ADN plasmídico mediante liofilización. Liposomas compuestos de DDAB/Col suspendidos por sonicación en 5% (en p/v) de dextrano en agua, cuando se mezclan con ADN en una proporción 1:10 (μg de ADN por nmol de DDAB), según se describe en métodos, pueden liofilizarse sin perder actividad. La concentración final de dextrano en que se forman los complejos de lípido:ADN plasmídico fue de 8% (en p/v). Las preparaciones liofilizadas se reconstituyeron añadiendo agua destilada y se midió su actividad de transfección en los pulmones de ratones después de una inyección intravenosa, mediante la expresión del gen indicador de luciferasa. La congelación y la descongelación de la preparación reconstituida no afecta a la actividad (habitualmente 1-2 ng de proteína de luciferasa por mg de proteína de tejido).

Varios de los complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico descritos en la presente son estables y producen una actividad de transfección *in vivo* constante (que varía de 0,5 a 2 ng de luciferasa por mg de proteína de tejido), incluso después de una larga conservación a 4 °C o liofilización. Las formulaciones que contienen colesterol como lípido "auxiliar" generan una eficacia de transfección *in vivo* mucho mayor. La estabilización de la estructura del complejo con PEG-PE mantiene la actividad del complejo durante la conservación y puede prolongar el tiempo de circulación en sangre para el transporte hacia tejidos específicos. La condensación del ADN con poliaminas antes de la formación del complejo con el lípido potencia la conservación *in vitro* y los niveles de actividad *in vivo*. La estrategia metódica para producir formulaciones estables de complejos de lípido:ADN plasmídico que muestran una alta actividad de transfección *in vivo* confiere ventajas para establecer preparaciones farmacéuticamente aceptables y, por tanto, facilita la terapia génica basada en liposomas.

Ejemplo 2: Transfección *in vitro* de complejos de lípido:ADN plasmídico con ligandos de transporte dirigido

A. Preparación de fragmentos Fab'

Secuencias de rhuMAbHER2 clonadas para la cadena pesada y ligera se coexpresaron en *E. coli* como se ha descrito (Carter *et al.*, *Biotechnology*, 10:163-167 (1992)). El fragmento de anticuerpo, rhuMAbHER2-Fab', se recuperó a partir de pastas de fermentación de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad con la proteína G estreptocócica (Carter *et al.*, *Biotechnology*, 10:163-167 (1992)), produciendo generalmente Fab' con 60-90% que contiene tiol libre reducido (Fab'-SH).

B. Preparación de liposomas

El ADN condensado se complejó con tres composiciones lipídicas diferentes, utilizando los métodos descritos anteriormente en el ejemplo 1, con las siguientes modificaciones. El primer complejo se preparó con DDAB/DOPE (1/1), que produce liposomas catiónicos complejados sólo con ADN, según se describió anteriormente. El segundo complejo se preparó con DDAB/DOPE (1/1) con PEG-PE al 1% derivatizado con maleimida en la última posición de PEG, que produce CLDC con el componente de estabilización estérica añadido después de la formación del complejo con el ADN. El tercer complejo se preparó con DDAB/DOPE (1/1) con PEG-PE al 1% derivatizado con el fragmento Fab' de un anticuerpo anti-Her-2 humanizado unido en la última posición de PEG a través de un grupo tiol libre del resto maleimida. Esto produce CLDC con el ligando de transporte dirigido unido al componente de estabilización estérica añadido después de la formación del complejo con el ADN.

C. Transfección y resultados

Las células se transfectaron según se describió anteriormente en el ejemplo 1, pero sin conservación del complejo de lípido:ADN plasmídico. Se emplearon dos líneas celulares en este ejemplo. La primera línea celular fue MCF-7, que no sobreexpresa el receptor HER-2. Estas células se cultivaron en DME H-21 con suero de ternera bovino al 10% y en CO₂ al 5%. La segunda línea celular fueron células SK-BR3, que sobreexpresan el receptor HER-2, cultivadas en medio 5A de McCoy con suero de ternera bovino en CO₂ al 5%. En ambos casos, las células (aproximadamente 5×10^4 por pocillo) se transfectaron y se incubaron con 12 μg de ADN plasmídico que forma un complejo con el lípido, según se describió anteriormente (PCMV/IVS-luc+, gen indicador de luciferasa según se describió anteriormente) durante 4 horas a 37 °C. Después se aspiró el sobrenadante, se añade medio fresco, y las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células después se recolectaron lavando con PBS (sin Ca/Mg) y después se suspendieron en tampón de lisis para el ensayo de luciferasa, según se describió anteriormente.

La figura 5A demuestra que la transfección de células que no son la diana, que no sobreexpresan el receptor HER-2, fue inhibida por la adición de PEG-PE, incluso en presencia del ligando de transporte dirigido conjugado en el extremo final de PEG a través del resto maleimida terminal. La figura 5B demuestra que la transfección de células diana que sobreexpresan el receptor HER-2 también fue inhibida mediante la adición de PEG-PE, pero la actividad de transfección se restablece y aumenta cuando el PEG-PE se conjuga con un ligando de transporte dirigido, que reconoce el receptor HER-2.

La comparación de las figuras 5A y 5B indica que los inmuno-CLDC dirigidos son activos para transfectar células diana con mucha más eficacia que para células que no son la diana. Este resultado se produce debido a la adición

del agente estabilizante que porta el ligando (PEG-PE) conjugado con anti-HER-2-Fab', que inhibe la transfección de las células que no son la diana (figura 5A) pero que aumenta la transfección de las células diana (figura 5B).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para aumentar la caducidad de un complejo de lípido:ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- poner en contacto un ácido nucleico con un polication orgánico para producir un ácido nucleico condensado;
- 5 combinar dicho ácido nucleico condensado con un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico para producir dicho complejo de lípido:ácido nucleico;
- mezclar dicho complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo neutro; y
- conservar dicho complejo de lípido:ácido nucleico antes de su uso;
- 10 en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico que comprende dicho ácido nucleico condensado tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho polication orgánico.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho polication orgánico se selecciona del grupo que consiste en poliamina, poliamonio, poliaminoácido básico, y proteína básica.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicha poliamina se selecciona del grupo que consiste en espermina, espermidina, y proteína básica.
- 15 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN y ARN.
- 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de combinar dicho ácido nucleico condensado con dicho lípido comprende formar en primer lugar un liposoma que comprende dicho lípido catiónico anfifílico.
- 20 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de combinar dicho ácido nucleico condensado con dicho lípido comprende combinar dicho lípido y dicho ácido nucleico en una proporción que varía de 1 a 20 nmol de lípido:µg de ácido nucleico.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de poner en contacto dicho ácido nucleico con dicho polication orgánico comprende poner en contacto dicho polication orgánico y dicho ácido nucleico en una proporción que varía de 0,05 a 5,0 nmol de polication orgánico:µg de ácido nucleico.
- 25 9.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende las etapas de:
- poner en contacto un módulo de expresión con una poliamina seleccionada del grupo que consiste en espermidina y espermina, para producir un módulo de expresión condensado; y
- 30 combinar dicho módulo de expresión condensado con un lípido que comprende DDAB (bromuro de didodecildimetilamino) y colesterol con una proporción molar de 2:1 a 1:2, para producir un complejo de lípido:módulo de expresión;
- 35 en el que dicho complejo de lípido:módulo de expresión que comprende dicho módulo de expresión condensado tiene una mayor caducidad a aproximadamente 4 °C, comparado con un complejo de lípido:módulo de expresión idéntico que carece de dicha poliamina.
- 10.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho polímero hidrófilo está unido a un resto de transporte dirigido.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que dicho resto de transporte dirigido es un anticuerpo.
- 12.- El método de la reivindicación 10, en el que dicho resto de transporte dirigido es un fragmento de anticuerpo.
- 40 13.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico está liofilizado.
- 14.- Un método para aumentar la caducidad de un complejo de lípido:ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 45 combinar dicho ácido nucleico con un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico para producir dicho complejo de lípido:ácido nucleico; y
- mezclar dicho complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrófilo con carga neutra;

en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho polímero hidrófilo.

- 5 15.- El método de la reivindicación 14, en el que dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con un ácido graso de sorbitán, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), y gangliósido G_{M1}.
- 16.- El método de la reivindicación 14 o 15, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN y ARN.
- 17.- El método de la reivindicación 14 o 15, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 10 18.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 17, en el que dicha etapa de combinar dicho ácido nucleico con dicho lípido comprende formar en primer lugar un liposoma que comprende dicho lípido catiónico anfifílico.
- 15 19.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha etapa de combinar dicho ácido nucleico con dicho lípido comprende combinar dicho lípido y dicho ácido nucleico en una proporción que varía de 1 a 20 nmol de lípido:µg de ácido nucleico.
- 20 20.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que dicha etapa de mezclar dicho complejo de lípido:ácido nucleico con dicho polímero hidrófilo comprende mezclar dicho polímero hidrófilo y dicho complejo de lípido:ácido nucleico en una proporción molar del 0,1% al 10% de polímero hidrófilo al lípido dentro del complejo de lípido:ácido nucleico.
- 21.- El método de la reivindicación 14, en el que dicho método comprende las etapas de:
- combinar un módulo de expresión con dicho lípido que comprende dicho lípido catiónico anfifílico, para producir un complejo de lípido:módulo de expresión; y
- mezclar dicho complejo de lípido:módulo de expresión con polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE);
- 25 en el que dicho complejo de lípido:módulo de expresión tiene una mayor caducidad a aproximadamente 4 °C, comparado con un complejo de lípido:módulo de expresión idéntico que carece de dicho polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE).
- 22.- El método de la reivindicación 21, en el que dicho lípido comprende polietilenglicol unido a un fragmento Fab' de un anticuerpo.
- 30 23.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico está liofilizado.
- 24.- El uso de un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende:
- un ácido nucleico que se ha puesto en contacto con un polímero orgánico seleccionado de poliamonio, poliaminoácido básico, proteína básica, espermina y espermidina, para producir un ácido nucleico condensado;
- 35 un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico; y
- un polímero hidrófilo neutro;
- para la fabricación de un medicamento para transfectar una célula con dicho ácido nucleico después de su conservación.
- 25.- El uso de la reivindicación 24, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico se conserva a una temperatura de aproximadamente 22 °C o menor.
- 40 26.- El uso de la reivindicación 24, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 27.- El uso de la reivindicación 24, 25 o 26, en el que dicho medicamento es para la administración a un mamífero.
- 28.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que dicho complejo comprende polietilenglicol unido a un fragmento Fab' de un anticuerpo.
- 45 29.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico se conserva a una temperatura de aproximadamente 22 °C o menor.
- 30.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, en el que dicho polímero hidrófilo con carga neutra se

selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con un ácido graso de sorbitán, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), y gangliósido G_{M1}.

- 31.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 5 32.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico es para la administración sistémica a un mamífero.
- 33.- El uso de la reivindicación 32, en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico es para la administración intravenosa a un mamífero.
- 10 34.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, en el que dicho polímero hidrófilo neutro está unido a un resto de transporte dirigido.
- 35.- El uso de la reivindicación 34, en el que dicho resto de transporte dirigido es un anticuerpo.
- 36.- El uso de la reivindicación 34, en el que dicho resto de transporte dirigido es un fragmento de anticuerpo.
- 37.- Un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende:
- 15 un ácido nucleico que se ha puesto en contacto con un policatión orgánico seleccionado del grupo que consiste en poliamonio, poliaminoácido básico, proteína básica, espermina y espermidina, para producir un ácido nucleico condensado;
- un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico; y
- un polímero hidrófilo neutro;
- 20 en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho policatión orgánico.
- 38.- El complejo de la reivindicación 37, en el que dicho policatión orgánico se selecciona del grupo que consiste en poliamonio y poliaminoácido básico.
- 39.- El complejo de la reivindicación 38, en el que dicha poliamina se selecciona del grupo que consiste en espermina y espermidina.
- 25 40.- El complejo de la reivindicación 37, 38 o 39, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN y ARN.
- 41.- El complejo de la reivindicación 37, 38 o 39, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 42.- El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 41, en el que la cantidad de dicho lípido y dicho ácido nucleico está en una proporción que varía de 1 a 20 nmol de lípido:µg de ácido nucleico.
- 30 43.- El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 41, en el que dicho ácido nucleico se pone en contacto con dicho policatión orgánico en una proporción que varía de 0,05 a 5,0 nmol de policatión orgánico:µg de ácido nucleico.
- 44.- El complejo de la reivindicación 37, en el que dicho complejo comprende:
- 35 un módulo de expresión que se ha puesto en contacto con una poliamina seleccionada del grupo que consiste en espermidina y espermina, para producir un módulo de expresión condensado; y
- dicho lípido comprende dicho lípido catiónico anfifílico;
- en el que dicho complejo de lípido:módulo de expresión tiene una mayor caducidad a aproximadamente 4 °C, comparado con un complejo de lípido:módulo de expresión idéntico que carece de espermidina o espermina.
- 45.- El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 44, en el que dicho complejo comprende polietilenglicol unido a un fragmento Fab' de un anticuerpo.
- 40 46.- Una composición farmacéutica que comprende:
- un ácido nucleico condensado con un policatión orgánico seleccionado de poliamonio, poliaminoácido básico, proteína básica, espermina y espermidina, complejado con:
- un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico; y
- 45 un polímero hidrófilo neutro;

en un vehículo farmacéuticamente aceptable;

en la que dicha composición farmacéutica tiene una mayor caducidad, comparado con una composición farmacéutica idéntica que carece de dicho policatión orgánico.

5 47.- La composición de la reivindicación 46, en la que dicho policatión orgánico se selecciona del grupo que consiste en poliamonio, poliaminoácido básico, y proteína básica.

48.- La composición de la reivindicación 47, en la que dicho policatión orgánico se selecciona del grupo que consiste en espermina y espermidina.

49.- La composición de la reivindicación 46, 47 o 48, en la que dicho ácido nucleico es ADN.

10 50.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en la que la cantidad de dicho lípido y dicho ácido nucleico está en un intervalo que varía de 1 a 20 nmol de lípido:µg de ácido nucleico.

51.- La composición de la reivindicación 46, en la que dicha composición comprende:

un módulo de expresión que se ha puesto en contacto con una poliamina seleccionada del grupo que consiste en espermidina y espermina, para producir un módulo de expresión condensado; y

dicho lípido que comprende dicho lípido catiónico anfifílico;

15 en la que dicha composición tiene una mayor caducidad a aproximadamente 4 °C, comparado con una composición idéntica que carece de dicha poliamina.

52.- La composición de la reivindicación 51, en la que dicho complejo comprende polietilenglicol unido a un fragmento Fab' de un anticuerpo.

53.- Un kit para preparar un complejo de lípido:ácido nucleico, comprendiendo dicho kit:

20 (i) un recipiente que contiene un liposoma que comprende un lípido catiónico anfifílico;

(ii) un recipiente que contiene un ácido nucleico; y

(iii) un recipiente que contiene un polímero hidrófilo neutro;

en el que el liposoma y el ácido nucleico se van a mezclar para formar el complejo de lípido:ácido nucleico, y en el que el complejo de lípido:ácido nucleico se va a poner en contacto con el polímero hidrófilo.

25 54.- Un kit de la reivindicación 53, en el que dicho polímero hidrófilo está derivatizado con un resto de transporte dirigido.

55.- Un kit de la reivindicación 54, en el que dicho resto de transporte dirigido es un fragmento Fab'.

56.- Un kit de la reivindicación 53, 54 o 55, en el que dicho ácido nucleico es un ácido nucleico condensado.

57.- El uso de:

30 (i) un ácido nucleico que se ha puesto en contacto con un policatión orgánico para producir un ácido nucleico condensado;

(ii) un lípido que comprende un lípido catiónico anfifílico; y

(iii) un polímero hidrófilo neutro;

para producir un complejo de lípido:ácido nucleico para su conservación antes del uso;

35 en el que dicho complejo de lípido:ácido nucleico tiene una mayor caducidad, comparado con un complejo de lípido:ácido nucleico idéntico que carece de dicho policatión orgánico.

40 58.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con un ácido graso de sorbitán, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), y gangliósido G_{M1}.

59.- El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 44, en el que dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con un ácido graso de sorbitán, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), y gangliósido G_{M1}.

60.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 46 a 51, en la que dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polietilenglicol derivatizado con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), polietilenglicol derivatizado con un ácido graso de sorbitán, polietilenglicol derivatizado con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), y gangliósido G_{M1}.

5

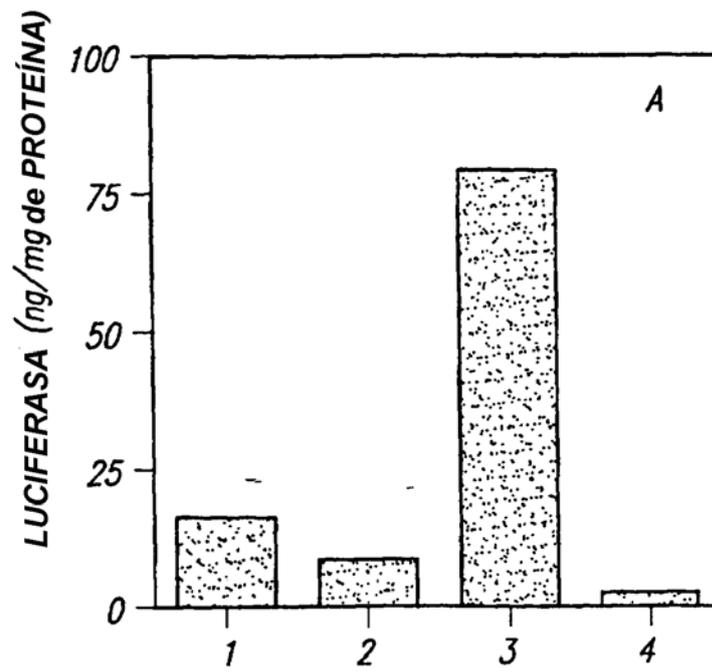


FIG. 1A

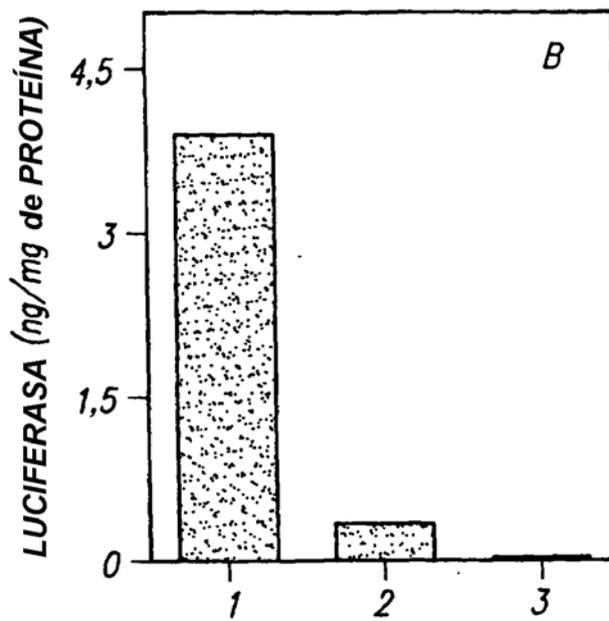


FIG. 1B

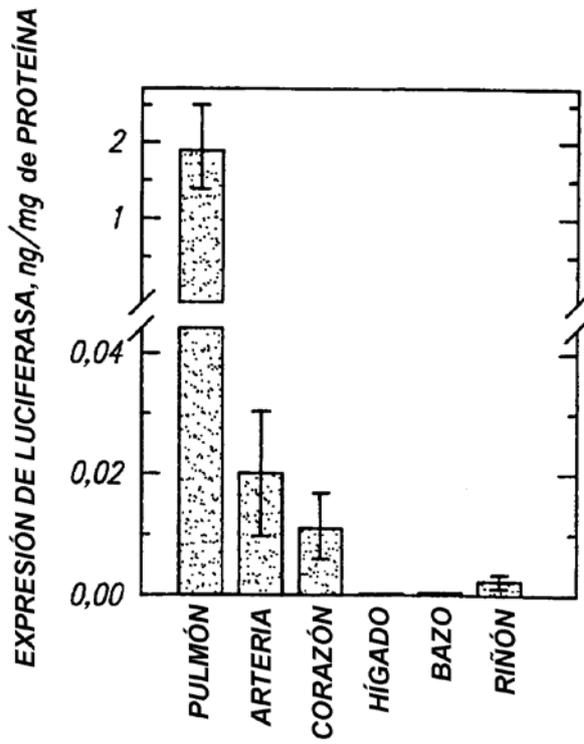


FIG. 2

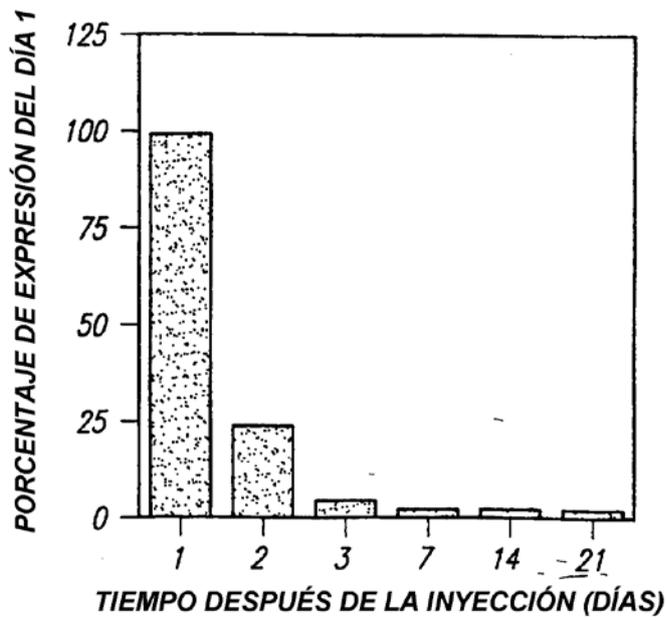


FIG. 3

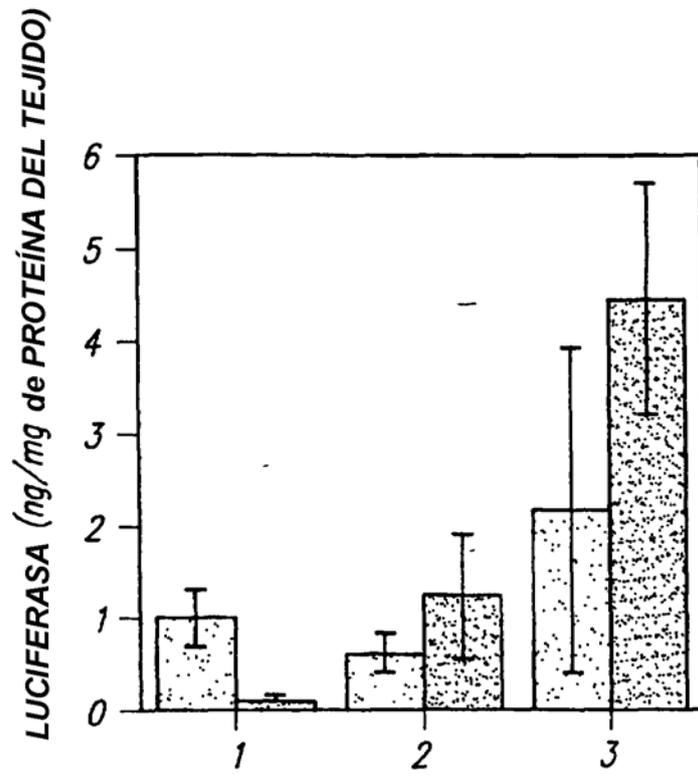


FIG. 4

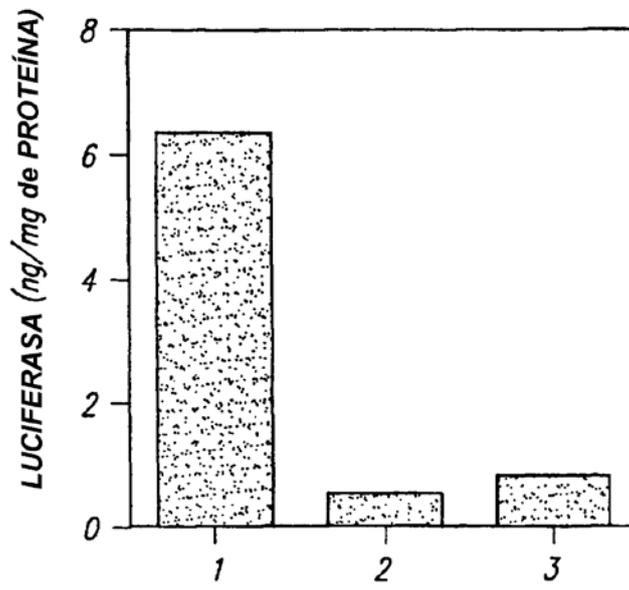


FIG. 5A

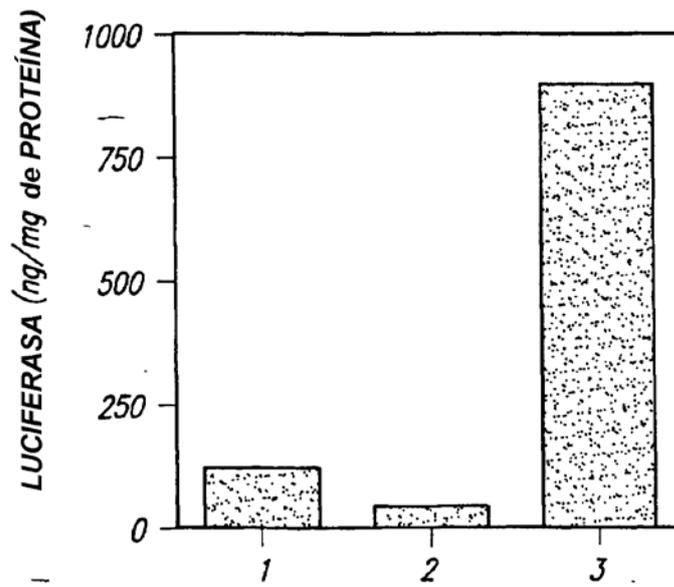


FIG. 5B