

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 220**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/133 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10734065 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2451440**

54 Título: **Liposomas anfóteros que comprenden lípidos imino**

30 Prioridad:

09.07.2009 EP 09165106

23.09.2009 EP 09171102

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

21.01.2015

73 Titular/es:

MARINA BIOTECH, INC. (100.0%)

**3830 Monte Villa Parkway
Bothell WA 98021-7266, US**

72 Inventor/es:

**PANZNER, STEFFEN y
SIEPI, EVGENIOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 527 220 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

Liposomas anfóteros que comprenden lípidos imino

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a complejos lipídicos o liposomas que son capaces de superar un bloqueo de captación mediado por lipoproteínas. Más específicamente, esta invención se refiere a mejoras en los liposomas que comprenden lípidos con carga negativa que tienen un grupo principal carboxílico o de fosfato y lípidos de carga positiva que tienen fracciones imino o guanido o derivados de los mismos en las regiones polares respectivas.

Antecedentes de la invención

Los liposomas tienen un uso extenso como portadores de ingredientes activos. Los liposomas neutros o con carga negativa se usan a menudo para el suministro de fármacos de moléculas pequeñas, mientras que los de carga positiva (catiónicos) o la recientemente introducida clase de liposomas anfóteros se usan principalmente para el suministro de ácidos nucleicos tales como plásmidos u oligonucleótidos. Entre los ejemplos importantes de liposomas catiónicos usados para el suministro de cargas en ácidos nucleicos se incluyen, pero no se limitan a Semple y col., Nat. Biotech. (2010) 28:172-176; Akinc y col., Nat. Biotech. (2008) 26:561-569; Chien y col., Cancer Gene Ther. (2005) 12:321-328; de Fougères, Nat. Rev. Drug Discov. (2007) 6:443-453; Kim y col., Mol. Ther. (2006) 14:343-350; Morrissey, Nat. Biotech. (2005) 23: 1002-1007; Peer, Science (2008) 319: 627-630 y Santel, Gene Ther. (2006) 13: 1222-1234. La aplicación de liposomas anfóteros para el suministro de ácidos nucleicos se ha mostrado en Andreakos y col., Arthritis Rheum. (2009) 60:994-1005.

Los liposomas anfóteros pertenecen a la gran familia de liposomas sensibles al pH, que comprenden además liposomas aniónicos o catiónicos sensibles al pH, de los que se han presentado prototipos en Lai y col., Biochemistry (1985) 24:1654-1661 y Budker y col., Nat. Biotech. (1996) 14:760-764. A diferencia de los liposomas aniónicos o catiónicos sensibles al pH, los liposomas anfóteros son estructuras complejas y comprenden al menos un par de lípidos que tienen carga complementaria. El documento WO-02/066.012 desvela una característica clave de liposomas anfóteros en la que tienen una fase estable para pH bajo y neutro. Los documentos WO-02/066.012 y WO-07/10.730 describen un procedimiento de carga de dichas partículas con ácidos nucleicos a partir de un pH bajo.

Hafez, y col. (Biophys. J. 2000, 79(3), 1438-1446) y el documento WO-02/066.012 proporcionan alguna información sobre cómo seleccionar mezclas de lípidos con verdaderas propiedades anfóteras y más específicamente cómo determinar su punto isoelectrico y el inicio de la fusión. Los lípidos neutros pueden ser constituyentes adicionales de liposomas anfóteros. La inclusión de uno o más de dichos lípidos neutros añade una complejidad considerable a la mezcla, especialmente porque las cantidades individuales de todos los componentes pueden variar. El número muy elevado de posibles combinaciones de lípidos representa un obstáculo práctico hacia una optimización más rápida de liposomas anfóteros. A este respecto, el documento WO-08/043.575 revela estrategias para la optimización de la estabilidad, la fusogenicidad y la transfección celular de liposomas anfóteros, en particular un procedimiento para predecir las mezclas de lípidos que forman fases laminares satisfactoriamente estables para pH altos y bajos, a la vez que forman una fase hexagonal fusógena para un pH intermedio.

Los liposomas anfóteros de acuerdo con las referencias mencionadas anteriormente son potentes transfectantes de células. Sin embargo, se ha observado que la función de algunos de estos liposomas podría ser bloqueada por la adición de determinados sueros, lo que limitaría potencialmente la actividad de estos liposomas para el direccionamiento de determinadas células *in vivo*. Esta cuestión se ilustra adicionalmente en los Ejemplos presentados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, el Ejemplo 3.

La inhibición de la captación de liposomas anfóteros observada en diferentes sueros es aparentemente opuesta a la activación publicada recientemente de soporte catiónico a través de la formación compleja con lipoproteínas, en este caso ApoE, tal como se demuestra en Akinc y col., Mol. Ther. (2010), publicación electrónica del 11 de mayo, antes de imprenta. DOI: 10.1038/mt.2010.85

Una investigación más detallada reveló lipoproteínas como mediadores de este efecto inhibitorio. Tal como se muestra en el Ejemplo 4 en la presente memoria descriptiva, el suero humano deficiente en lipoproteínas deja de ser capaz de inhibir la captación de liposomas tal como se indica por el suministro funcional de ARNip en células diana. Los autores de la invención han encontrado de forma sorprendente e inesperada que algunas especies de lípidos imino catiónicos en combinación con lípidos aniónicos que tienen una fracción de carboxilo o fosfato en sus grupos principales polares son especialmente ventajosas para mantener la actividad de transfección en presencia de suero. Frecuentemente, se observó una ventaja especial cuando los complejos lipídicos o liposomas creados a partir de

dichas mezclas de lípidos se formularon de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva y en el documento WO-08/043.575.

Objeto de la invención

5 Por tanto un objeto de la invención es proporcionar complejos lipídicos o liposomas que pueden transfectar células en presencia de diversos sueros.

Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden dichos liposomas como
10 soporte para el suministro de agentes o ingredientes activos, lo que incluye fármacos tales como fármacos de ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos y plásmidos en células o tejidos.

Resumen de la invención

15 La presente invención proporciona complejos lipídicos, liposomas y su uso para transfección de células en los que dichos complejos lipídicos comprenden anfífilos aniónicos y catiónicos y en los que al menos una parte de los anfífilos catiónicos son lípidos imino que se cargan sustancialmente a pH 7,5, y en los que los anfífilos aniónicos son lípidos de carboxilo o fosfato y en los que además la relación de carga entre los anfífilos catiónicos y aniónicos es de 1,5 o menos.

20 En varias realizaciones de la invención, se proporcionan complejos lipídicos que comprenden anfífilos aniónicos y catiónicos en los que al menos una parte de los anfífilos catiónicos son lípidos imino que se cargan sustancialmente en condiciones fisiológicas, y en los que además al menos una parte de los anfífilos aniónicos son lípidos carboxílicos, y en los que la relación entre los anfífilos catiónicos y aniónicos es inferior o igual a 1,5.

25 En aspectos más específicos de la invención, se proporcionan complejos lipídicos que comprenden una combinación de lípidos en los que los lípidos catiónicos de dicha combinación comprenden una fracción guanido y los lípidos aniónicos de dicha combinación comprenden un grupo carboxilo, caracterizados además porque la relación entre las fracciones guanido y los grupos carboxilo es inferior o igual a 1,5.

30 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan complejos lipídicos que comprenden anfífilos aniónicos y catiónicos en los que al menos una parte de los anfífilos catiónicos son lípidos imino que se cargan sustancialmente en condiciones fisiológicas, y en los que además al menos una parte de los anfífilos aniónicos son lípidos de fosfato, y en los que la relación entre los anfífilos catiónicos y aniónicos es inferior o igual a 1,5. En aspectos más preferidos
35 de dichas realizaciones, los lípidos imino son lípidos guanido.

Los grupos imino cargados de los anfífilos catiónicos de la invención tienen un pK de más de 7,5 y se seleccionan entre iminas, amidinas, piridinas, 2-aminopiridinas, bases de nitrógeno heterocíclicas, fracciones guanido, isoureas o tioisoureas. En realizaciones preferidas, los lípidos catiónicos se seleccionan entre el grupo de PONA, CHOLGUA,
40 GUADACA, MPDACA o SAINT-18.

En realizaciones preferidas, los lípidos aniónicos se seleccionan entre el grupo de CHEMS, DMGS, DOGS, DOPA o POPA.

45 En muchas realizaciones, los complejos lipídicos de la invención son liposomas.

En realizaciones adicionales, los complejos lipídicos también comprenden lípidos neutros tales como colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o esfingomiélinas o mezclas de los mismos.

50 En realizaciones preferidas el lípido neutro es colesterol y la fracción molar de colesterol en la mezcla de lípidos se encuentra entre el 10 y el 50% en moles.

En algunas realizaciones, los complejos lipídicos también comprenden lípidos PEGilados y en aspectos preferidos de dichas realizaciones los liposomas se producen por un proceso que comprendía las etapas de (i) formación y
55 sellado de los liposomas en presencia de un ingrediente activo y (ii) adición separada de lípidos PEG después de dicha etapa (i).

Resultó inesperado encontrar que puede conseguirse una transfección resistente al suero con complejos lipídicos o liposomas que tienen una superficie exterior que comprende una mezcla de fracciones aniónicas y catiónicas; en los
60 que al menos una parte de las fracciones aniónicas son fracciones imino que se cargan esencialmente en condiciones fisiológicas. En numerosas realizaciones, los complejos lipídicos y liposomas de la presente invención se formulan usando un procedimiento descrito en el documento WO-08/043.575 que también se describe en más

detalle en la presente memoria descriptiva.

Descripción detallada de la invención

5 Química de los lípidos

Por "cargable" se entiende que el anfífilo tiene un pK en el intervalo entre 4 y pH 8. Un anfífilo cargable puede ser por tanto un ácido o una base débil. "Estable" en relación con anfífilos cargados significa un ácido o una base fuerte con un pK fuera de este intervalo, lo que da como resultado una carga sustancialmente estable en el intervalo de pH 10 4 a pH 8.

Por "anfótero" en la presente memoria descriptiva se entiende una sustancia, una mezcla de sustancias o un complejo supramolecular (por ejemplo, un liposoma) que comprende grupos cargados de carácter aniónico y catiónico en los que:

- 15 1) Al menos uno, y opcionalmente los dos, de los anfífilos catiónico y aniónico es cargable, teniendo al menos un grupo cargado con un pK entre 4 y 8,
- 20 2) La carga catiónica prevalece a pH 4, y
- 3) La carga aniónica prevalece a pH 8.

Como resultado la sustancia o mezcla de sustancias tiene un punto isoelectrico de carga neta neutra entre pH 4 y pH 8. El carácter anfótero es, según esta definición, diferente del carácter zwitterion, ya que los zwitteriones no tienen un pK en el intervalo mencionado anteriormente. En consecuencia, los zwitteriones están esencialmente cargados con carga neutra en un intervalo de valores de pH; las fosfatidilcolinas y las fosfatidiletanolaminas son lípidos neutros con carácter de zwitteriano.

Por "relación de carga" o "C/A" en la presente memoria descriptiva se entiende el valor absoluto o módulo de la relación entre las cargas nominales asignadas normalmente a los anfífilos catiónicos y aniónicos, respectivamente. La carga nominal de un grupo carboxilo es "-1", la de una fracción fosfato es "-2" y la carga nominal de un compuesto de imino es "+1". A continuación se calcula la "relación de carga" en una mezcla de anfífilos dada o en un conjunto de lípidos a partir del producto de estas cargas nominales y las fracciones molares respectivas de los compuestos considerados, los compuestos neutros tales como colesterol o anfífilos zwitterianostales como POPC o 35 DOPE no se tienen en cuenta.

$$C/A = (x_{c1} * z_{c1} + x_{c2} * z_{c2} + \dots + x_{cn} * z_{cn}) / (x_{a1} * z_{a1} + x_{a2} * z_{a2} + \dots + x_{an} * z_{an})$$

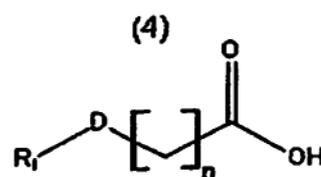
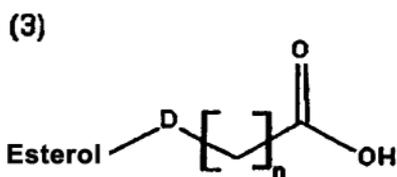
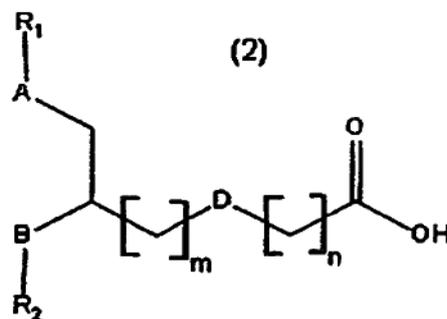
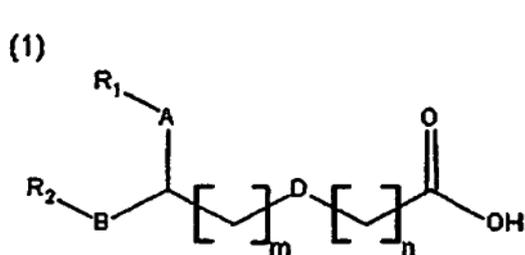
En los que $x_{c1...n}$ representa la fracción molar de un compuesto catiónico dado, $x_{a1...n}$ representa las fracciones molares de compuestos aniónicos, $z_{c1...n}$ significa carga nominal de un compuesto catiónico dado y $z_{a1...n}$ representa la carga nominal del compuesto aniónico.

A modo de ejemplo, una mezcla que comprende el 42% en moles de un lípido carboxílico, el 38% de un lípido imino y el 20% en moles de un lípido neutro tiene una relación de carga o C/A de $38/42 = 0,91$. Otra mezcla que 45 comprende el 27% de un lípido de fosfato, el 43% en moles de un lípido imino y el 30% en moles de un lípido neutro tiene una relación de carga o C/A de $43/54 = 0,8$ debido a la doble carga nominal del grupo fosfato.

Parece evidente a partir de la definición y de los ejemplos, que las relaciones molares o, para mayor brevedad, las relaciones entre lípidos y la relación de cargas tienen el mismo significado para especies de carga única y que estos 50 términos pueden intercambiarse mutuamente dentro de este grupo. Así sucede, por ejemplo, para combinaciones de lípidos imino y carboxi. En cambio, la relación molar es diferente de la relación de carga para lípidos de fosfato, dado que estos compuestos pueden llevar una doble carga, por ejemplo en casos en que el grupo fosfato está presente como un éster de fosfato primario como, por ejemplo, en DOPA. Tal como se muestra en el ejemplo de cálculo anterior, la relación molar o relación de lípidos es el doble de la relación de carga. Para mayor claridad, se usa el 55 término "relación de carga" con preferencia a lo largo de toda la descripción.

Por "pH fisiológico" o "condiciones fisiológicas" en la presente memoria descriptiva se entiende un pH de aproximadamente 7,5.

60 Los lípidos aniónicos que comprenden fracciones de carboxilo en sus grupos principales polares son bien conocidos para el experto en la materia. Pueden seleccionarse ejemplos de lípidos aniónicos que comprenden fracciones de carboxilo en los grupos principales polares a partir de las estructuras (1)-(4) mostradas a continuación,

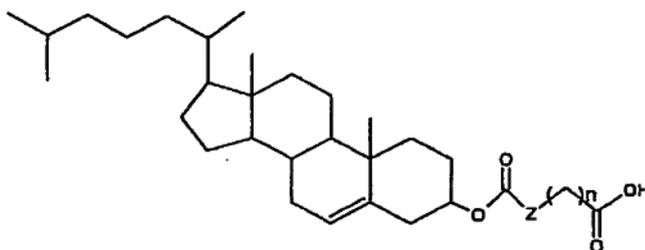


en las que n o m es un número entero entre 0 y 29, R₁ y R₂ son independientemente entre sí una fracción alquilo, 5 alqueniilo o alquinilo que tiene entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 ó 2 enlaces insaturados, A, B o D son independientemente entre sí ausente, -CH₂-, -CH=, =CH-O-, -NH-, -C(O)-O-, -O-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH-, -NH-C(O)-O-, un diéster de ácido fosfórico o fosforoso, y "esterol" puede ser un colesterol unido en su átomo C3.

10 La lista mostrada a continuación proporciona ejemplos específicos adicionales de lípidos portadores de un grupo carboxilo.

	CHEMS	Colesterolhemisuccinato
15	Chol-COOH o Chol-C1	Ácido colesteril-3-carboxílico
	Chol-C2	Colesterolhemioxalato
	Chol-C3	Colesterolhemimalonato
	Chol-C3N	N-(colesteril-oxicarbonil)glicina
	Chol-C5	Colesterolhemiglutarato
20	Chol-C6	Colesterolhemiadipato
	Chol-C7	Colesterolhemipimelato
	Chol-C8	Colesterolhemisuberato
	Chol-C12	Ácido colesterolhemidodecanodicarboxílico
	Chol-C13N	Ácido 12-colesteriloxicarbonilaminododecanoico
25	Chol-C16	Ácido colesterolhemihexadecanodicarboxílico

Los ácidos colesterolhemidicarboxílicos y los ácidos colesteriloxicarbonilaminocarboxílicos de la siguiente fórmula general:



30 en los que Z es C o -NH- y n es cualquier número entre 0 y 29.

	DGS o DG-Succ	Diácilglicerolhemisuccinato (anclaje de membrana no especificado)
35	DOGS o DOG-Succ	Dioléilglicerolhemisuccinato
	DMGS o DMG-Succ	Dimiristoilglicerolhemisuccinato

ES 2 527 220 T3

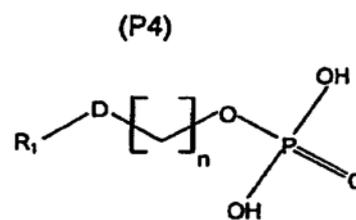
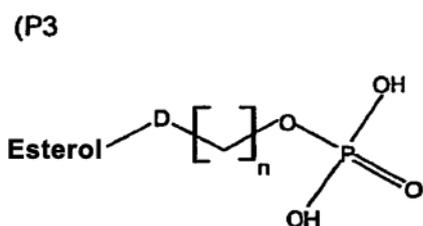
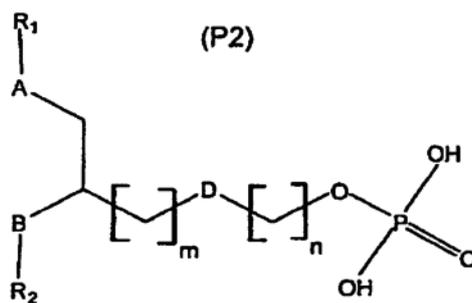
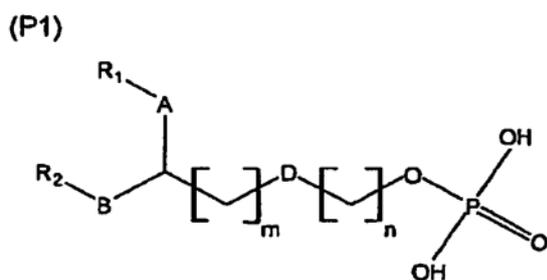
	DPGS o DPG-Succ	Dipalmitoilglicerolhemisuccinato
	DSGS o DSG-Succ	Distearoilglicerolhemisuccinato
	POGS o POG-Succ	1-palmitoil-2-oleoilglicerol-hemisuccinato
5	DOGM	Dioloilglicerolhemimalonato
	DOGG	Dioloilglicerolhemiglutarato
	DOGA	Dioloilglicerolhemiadipato
	DMGM	Dimiristoilglicerolhemimalonato
	DMGG	Dimiristoilglicerolhemiglutarato
	DMGA	Dimiristoilglicerolhemiadipato
10	DOAS	Ácido 4-((2,3-dioleoil-propil)amino)-4-oxobutanoico
	DOAM	Ácido 3-((2,3-dioleoil-propil)amino)-3-oxopropanoico
	DOAG	Ácido 5-((2,3-dioleoil-propil)amino)-5-oxopentanoico
	DOAA	Ácido 6-((2,3-dioleoil-propil)amino)-6-oxohexanoico
	DMAS	Ácido 4-((2,3-dimiristoil-propil)amino)-4-oxobutanoico
15	DMAM	Ácido 3-((2,3-dimiristoil-propil)amino)-3-oxopropanoico
	DMAG	Ácido 5-((2,3-dimiristoil-propil)amino)-5-oxopentanoico
	DMAA	Ácido 6-((2,3-dimiristoil-propil)amino)-6-oxohexanoico
	DOP	Ácido 2,3-dioleoil-propanoico
	DOB	Ácido 3,4-dioleoil-butanoico
20	DOS	Ácido 5,6-dioleoil-hexanoico
	DOM	Ácido 4,5-dioleoil-pentanoico
	DOG	Ácido 6,7-dioleoil-heptanoico
	DOA	Ácido 7,8-dioleoil-octanoico
	DMP	Ácido 2,3-dimiristoil-propanoico
25	DMB	Ácido 3,4-dimiristoil-butanoico
	DMS	Ácido 5,6-dimiristoil-hexanoico
	DMM	Ácido 4,5-dimiristoil-pentanoico
	DMG	Ácido 6,7-dimiristoil-heptanoico
	DMA	Ácido 7,8-dimiristoil-octanoico
30	DOG-GluA	Ácido dioleoilglicerol-glucurónico (con enlace en 1 ó 4)
	DMG-GluA	Ácido dimiristoilglicerol-glucurónico (con enlace en 1 ó 4)
	DO-cHA	Ácido dioleoilglicerolhemiaciclohexano-1,4-dicarboxílico
	DM-cHA	Ácido dimiristoilglicerolhemiaciclohexano-1,4-dicarboxílico
	PS	Fosfatidilserina (anclaje de membrana no especificado)
35	DOPS	Dioloilfosfatidilserina
	DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
	MA	Ácido mirístico
	PA	Ácido palmítico
	OA	Ácido oleico
40	LA	Ácido linoleico
	SA	Ácido esteárico
	NA	Ácido nervónico
	BA	Ácido behénico
	POGA	Ácido palmitoil-oleoil-glutámico
45	DPAA	Ácido dipalmitoilaspártico

Cualquier derivado dialquílico de los lípidos aniónicos que comprenden grupos diacilo enumerados anteriormente se encuentra también dentro del alcance de la presente invención.

50 Los lípidos aniónicos preferidos que tienen un grupo carboxilo pueden seleccionarse entre el grupo de Chol-C1 a Chol-C16 incluidos todos sus homólogos, en particular CHEMS. También se prefieren los lípidos aniónicos DMGS, DPGS, DSGS, DOGS, POGS.

Los lípidos aniónicos que comprenden fracciones de fosfato en sus grupos principales polares son bien conocidos para el experto en la materia.

55 Pueden seleccionarse ejemplos para lípidos de fosfato a partir de las estructuras (P1)-(P4) mostradas a continuación:



en las que n o m es un número entero entre 0 y 29, R₁ y R₂ son independientemente entre sí fracciones alquilo, alquenoilo o alquinoilo que tienen entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 ó 2 enlaces insaturados, A, B o D son 5 independientemente entre sí ausente, -CH₂-, -CH=, =CH-O-, -NH-, -C(O)-O-, -O-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- o -NHC(O)-O- y "esterol" puede ser un colesterol unido en su átomo C3.

La lista mostrada a continuación proporciona ejemplos específicos adicionales de lípidos portadores de un grupo de ácido fosfatídico.

10

Chol-P	Colesterol-3-fosfato
DOPA	Ácido dioleoil-fosfatídico
POPA	Ácido palmitoil-oleoil-fosfatídico
DPPA	Ácido dipalmitoil-fosfatídico
DMPA	Ácido dimiristoilfosfatídico.

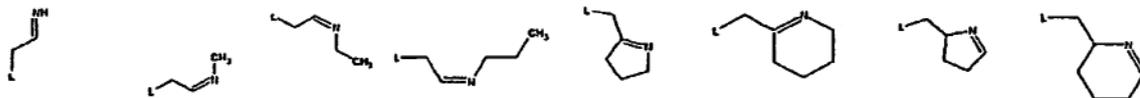
15

Homólogos de ésteres de ácido fosfórico o cetilfosfato con R₁ teniendo entre 16 y 24 átomos de carbono.

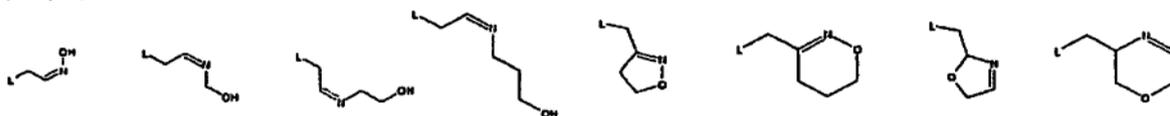
Los lípidos catiónicos que pueden usarse con esta invención son moléculas anfipáticas que comprenden una 20 fracción imino en su grupo principal polar, en los que dicha fracción imino se carga sustancialmente en condiciones fisiológicas. Por tanto, en realizaciones preferidas el valor de pK de este grupo funcional es 7,5 o superior, en formas más preferidas el valor de pK del grupo imino es 8,5 o superior. Las fracciones imino que tienen dichas características pueden ser iminas en sí mismas o formar parte de grupos funcionales más grandes, tales como amidinas, piridinas, 2-aminopiridinas, bases de nitrógeno heterocíclicas, funciones guanido, isoureas, isotioureas y 25 similares.

Las siguientes estructuras (I1)...(I113) representan algunos ejemplos específicos de dichas fracciones imino,

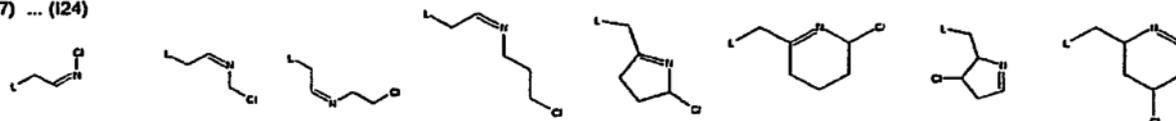
(11) ... (18)



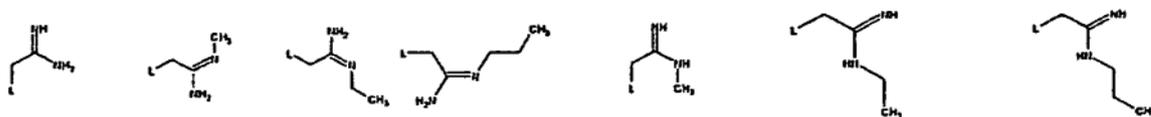
(19) ... (116)



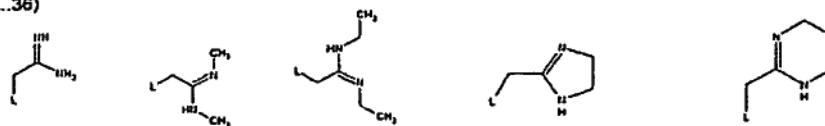
(117) ... (124)



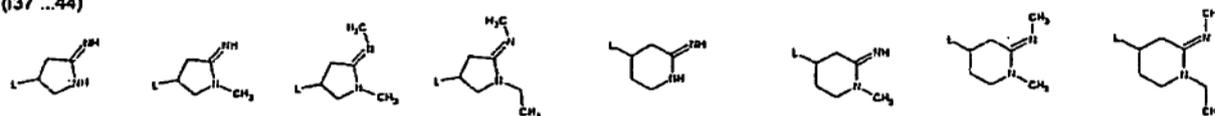
(125) ... (131)



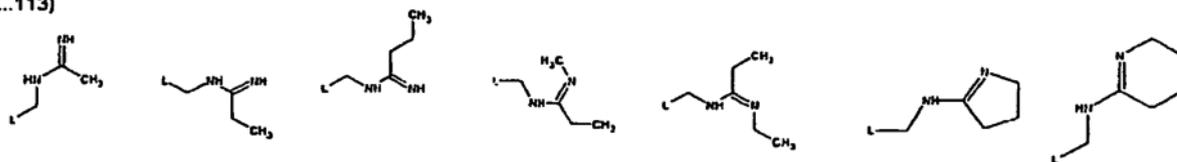
(132 ...36)



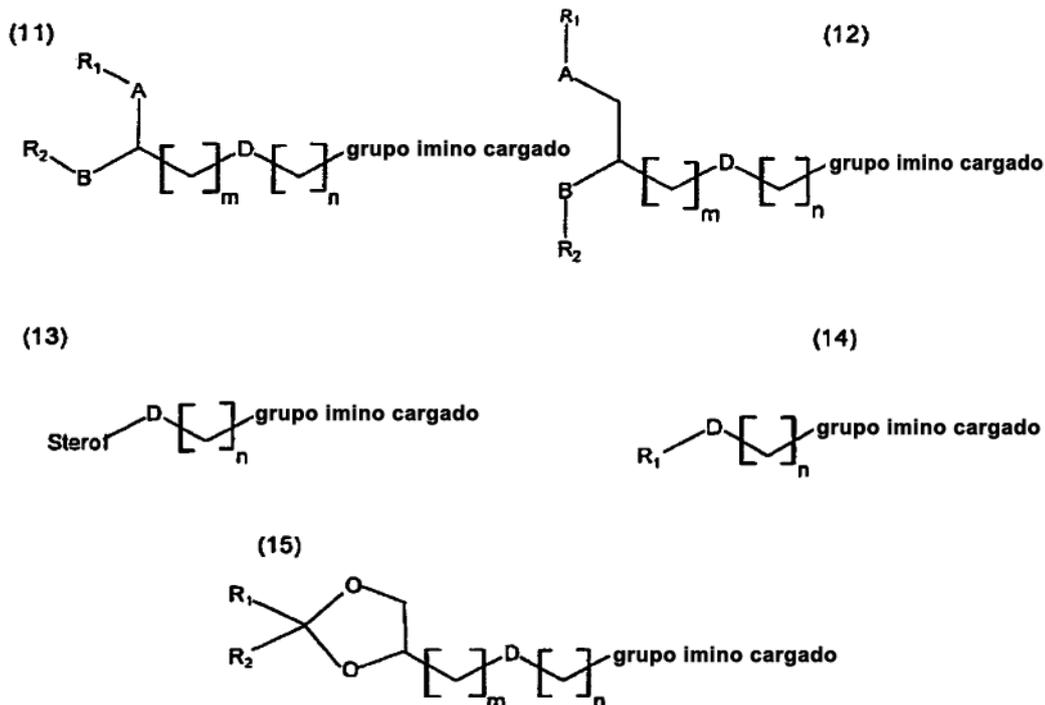
(137 ...44)



(I107...I113)



en las que L representa la región apolar y opcionalmente fracciones de unión o separación de la molécula lipídica anfipática. Pueden seleccionarse ejemplos de L adicionales a partir de las siguientes estructuras generales (11) a 5 (15),



en las que n o m representan un número entero entre 0 y 29, R₁ y R₂ son independientemente entre sí fracciones alquilo, alquenoilo o alquinilo que tienen entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 ó 2 enlaces insaturados, A, B o D son independientemente entre sí ausente, -CH₂-, -CH=, =CH-, -O-, -NH-, -C(O)-O-, -O-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- o -NHC(O)-O- y "esterol" puede ser un colesterol unido en su átomo C3.

La Tabla 1 siguiente proporciona valores calculados o de bases de datos para el pK de las fracciones que contienen imino (I1) a (I113). Para fracciones imino cuaternizadas, se introdujo un valor hipotético de 99 simplemente para resaltar este hecho.

Tabla 1: Valores de pK para las fracciones I1-I113

fracción	pK				fracción	pK			
	imino	amino	anillo N	guanido N		imino	amino	anillo N	guanido N
I1	10,49				I51	10,31	-3,56		
I2	7,23				I52	99	-3,47		
I3	7,23				I53	7,73			
I4	7,08				I54	10,62	-6,91		
I5	8,41				I55	1,92		-5,58	
I6	8,06				I56	10,63	-6,87		
I7	7,87				I57	8,62		-7,89	
I8	7,52				I58	11,03	-5,39		
I9	11,58				I59	9,31		-4,75	
I10	6,18				I60	8,67	-6,83		

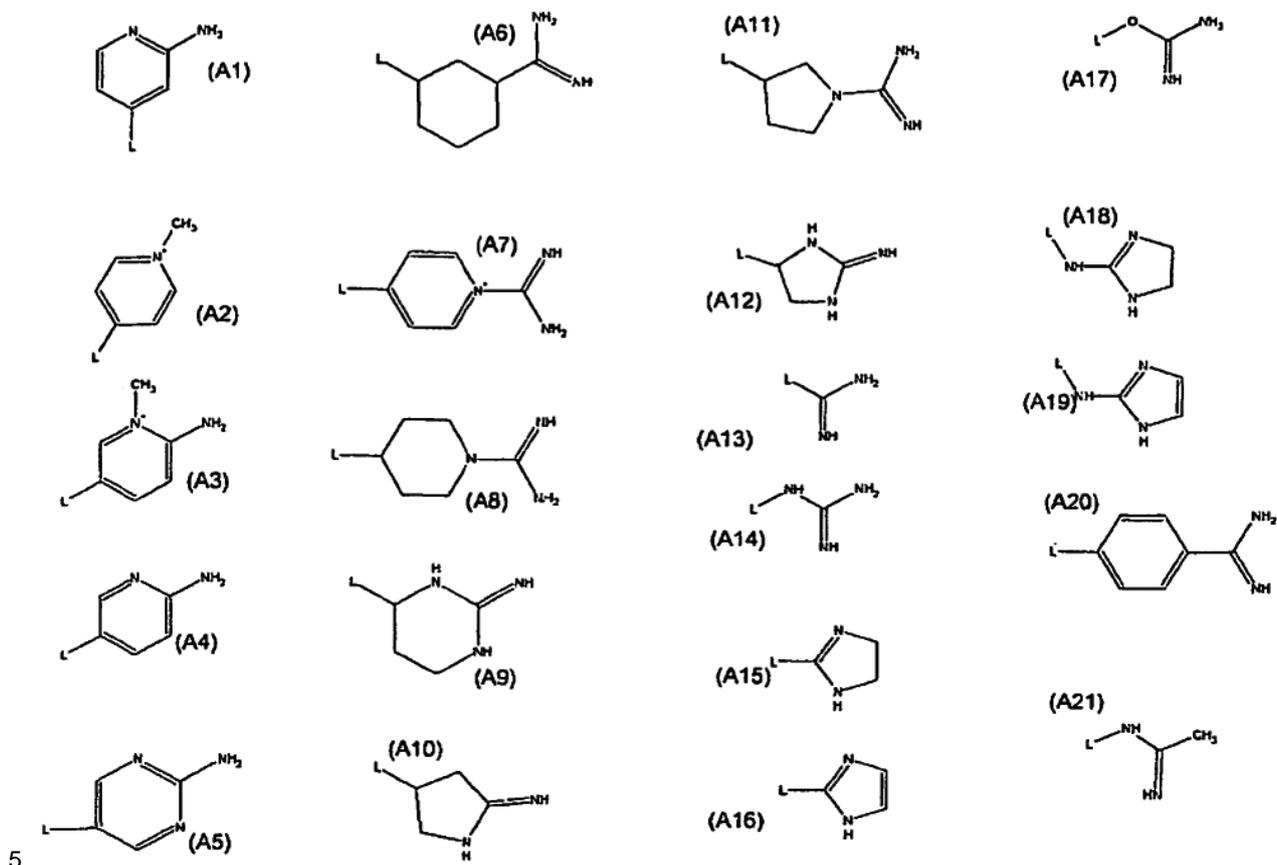
I11	6,61				I61	9,37	-3,47		
I12	7,01				I62	10,66	-3,56		
I13	n.d.				I63	99	-3,47		
I14	n.d.				I64	7,19	-7,59		
I15	5,62				I65	7,41	-2,85		
I16	5,89				I66	8,37	-2,58		
I17	0,63				I67	99	-2,7		
I18	4,53				I68	13,72			-1,04
I19	6,22				I69	14,03			2,05
I20	6,99				I70	14,14			1,71
I21	5,36				I71	11,11			0,94
I22	5,11				I72	14,33			1,68
I23	5,85				I73	14,25			-0,71
I24	6,03				I74	14,73			-0,4
I25	12,06	-5			I75	13,9			-0,09
I26	12,37	-4,91			I76	14,04			-0,1
I27	12,37	-4,91			I77	14,18			-0,72
I28	12,37	-4,91			I78	14,67			-0,41
I29	12,37	-3,58			I79	14,18			-0,2
I30	12,37	-3,68			I80	14,33			-0,2
I31	12,37	-3,58			I81	9,85			-1,92
I32	12,06	-5			I82	10,17			-0,57
I33	12,68	-3,49			I83	11,41			-0,65
I34	12,66	-3,58			I84	99	-0,57		-13,15
I35	10,98	-5,43			I85	14,33			-0,98
I36	12,98	-4,25			I86	14,33			-0,57
I37	12,52	-3,12			I87	14,47			-0,68
I38	12,82	-4,01			I88	99	-0,57		-11,28
I39	13,13	-3,93			I89	10	-8,4		
I40	13,12	-3,68			I90	8,69	-9,2		
I41	12,37	-3,25			I91	10,93	-7,8		
I42	12,68	-4,04			I92	10,08	-6,76		
I43	12,99	-3,96			I93	10,32	-6,88		
I44	12,98	-3,71			I94	3,51			
I45	9,1	-4,89			I95	3,51			
I46	9,37	-3,47							
I47	10,66	-3,56							
I48	99	-3,47							
I49	8,47	-4,89							
I50	9,02	-3,47							
fracción	pK				fracción	pK			
	imino	amino	anillo N	guanido N		imino	amino	anillo N	guanido N
I100	8,98	-8,16			I107	12,49	-3,67		
I101	8,85	-8,94			I108	12,49	-3,67		
I102	9,9	-7,55			I109	12,36	-3,67		
I103	9,69	-6,76			I110	12,8	-3,58		
I104	9,29	-6,88			I111	12,78	-3,58		
I105	8,82	-9,73			I112	10,62	-3,58		
I106	10,58	-8,09			I113	10,27	-3,58		

Parece evidente a partir de los datos presentados aquí que la mayoría de las estructuras I1-I113 comprenden fracciones imino preferidas que tienen un pK mayor que 7,5 o incluso mayor que 8,5.

- 5 Los valores de pK pueden tomarse de bases de datos públicas. Alternativamente, existe un software experto en dominio público que puede calcular, predecir o extrapolar dichos valores, por ejemplo, ACD/Labs v7 (de Advanced Chemistry Development, Ontario, Canadá) o similares.

- 10 Las fracciones imino analizadas anteriormente son ilustrativas de las enseñanzas de la presente invención, sin limitarse a los ejemplos específicos. Por supuesto, es posible cambiar la posición de los sustituyentes, en particular cuando se usan sistemas aromáticos tales como pirroles o piridinas para poner en práctica la presente invención.

También es posible sustituir los radicales alifáticos usados en I1-I113 por residuos aromáticos o fracciones arilo. La siguiente lista de compuestos (A1) a (A21) proporciona algunos ejemplos que deberían ilustrar aún más ampliamente dichas modificaciones, en los que L se define como anteriormente.



La Tabla 2 mostrada a continuación proporciona valores calculados o de bases de datos para el pK de las fracciones que contienen imino (A1) a (A21)). Para fracciones imino cuaternizadas, se introdujo un valor hipotético de 99 simplemente para resaltar este hecho.

10

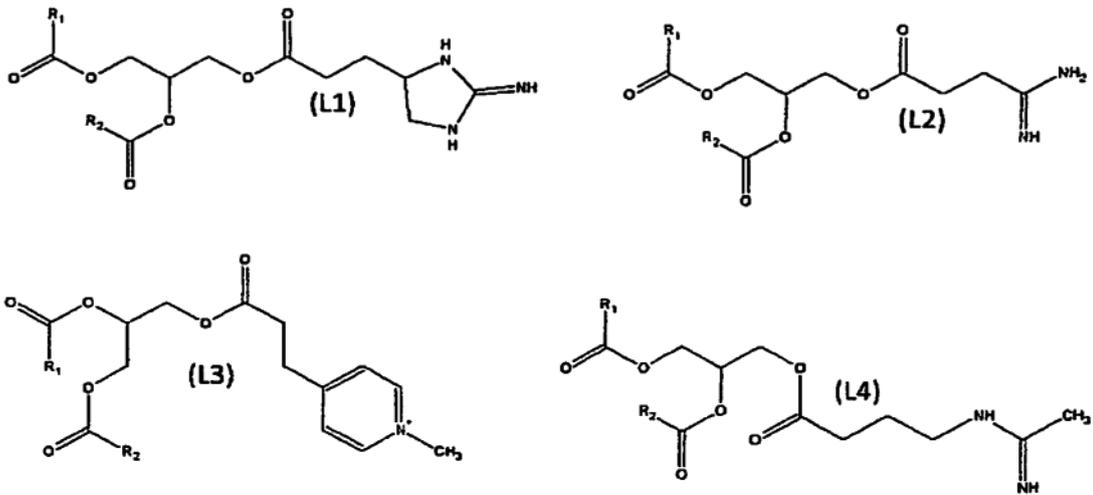
Tabla 2: Valores de pK para estructuras (A1) a (A21).

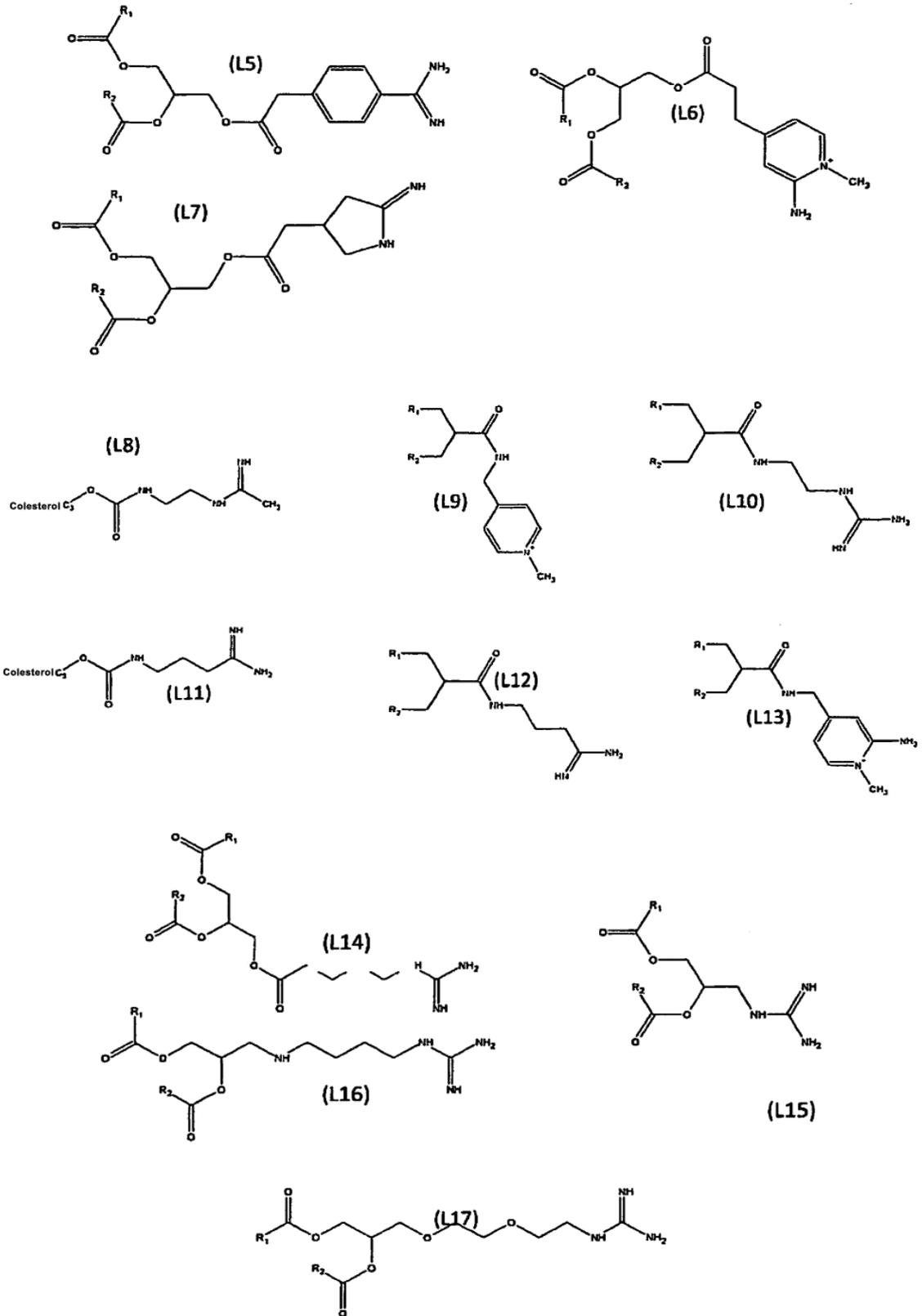
estructura	átomo	pK	átomo	pK	átomo	pK
A1	anillo	7,29	fuera	-7,16		
A2	anillo	99				
A3	anillo	99	fuera	-6,76		
A4	anillo	7,06	fuera	-6,91		
A5	anillo	4,74				
A6	imino	12,15	amidina	-4,95		
A7	imino	3,07	amidina	-12,14	anillo	99
A8	imino	14,24			anillo	-1,31
A9	imino	14,18	amidina	-0,72		
A10	imino	12,52	amidina	-3,12		
A11	imino	14,18			anillo	-1,27
A12	imino	14,25	amidina	-0,71		
A13	imino	12,31	amidina	-5		
A14	imino	13,75	amidina	-0,76		
A15	imino	10,98	amidina	-5,43		
A16	mino	7,96				
A17	imino	9,44	amidina	-8,39		

A18	imino	9,78	amidina	0,95		
A19	imino	8,52	fuera	-1,86		
A20	imino	11,97	amidina	-6,3		
A21	imino	12,5	amidina	-3,6		

De nuevo, muchas de las estructuras presentadas en la Tabla 2 anterior comprenden fracciones imino preferidas que tienen un pK mayor que 7,5 o incluso mayor que 8,5.

- 5 Tal como se menciona anteriormente, las fracciones imino cargadas pueden combinarse con anclajes lipídicos o partes hidrófobas para producir lípidos o anfífilos que son capaces de formar bicapas lipídicas por sí solos o pueden estar integrados en membranas lipídicas formadas a partir de otros lípidos o anfífilos. En algunas realizaciones, se seleccionan lípidos o anfífilos específicos entre los ejemplos L1 a L17 presentados a continuación:





En los que R₁ y R₂ son independientemente entre sí fracciones alquilo, alquenoilo o alquinilo que tienen entre 8 y 24 átomos de carbono y 0, 1 ó 2 enlaces insaturados.

Algunos de estos lípidos se han presentado antes en la bibliografía como, por ejemplo, los lípidos guanido en los documentos WO91/16.024, WO97/43.363, WO98/05.678, WO01/55.098, WO2008/137.758 (lípidos de aminoácidos), en los documentos EP-0.685.234 (basados en diacilgliceroles), US-5.965.434 (también basados en diacilgliceroles) o los compuestos de piridinio en el documento en US-6726.894. Además, tal como se muestra en el documento WO-29.086.558 o se ilustra en la estructura (15), es posible también usar esqueletos lipídicos alternativos, por ejemplo los que comprenden un segmento conector de dioxolano a la vez que se mantiene la funcionalidad de los grupos principales respectivos.

10 Mezclas de lípidos y otros lípidos opcionales

La presente invención desvela mezclas de lípidos que comprenden anfífilos aniónicos y catiónicos; en las que al menos una parte de los anfífilos catiónicos son lípidos imino que se cargan sustancialmente en condiciones fisiológicas, y en los que además al menos una parte de los anfífilos aniónicos son lípidos carboxílicos o lípidos de fosfato.

La copresencia de lípidos catiónicos que comprenden una fracción imino cargada en su grupo principal polar y lípidos aniónicos que comprenden una función carboxilo o fosfato en su grupo principal polar es una característica central de la presente invención. Es decir, en la práctica de la presente invención no se contemplan liposomas o complejos lipídicos que carecen sustancialmente de uno de estos elementos. Los lípidos imino catiónicos y los lípidos aniónicos pueden estar presentes en diferentes relaciones; dichas relaciones se caracterizan en la presente memoria descriptiva como "relación de cargas" (relaciones catión-anión, C/A, ver definiciones) a lo largo de la presente descripción. En muchas realizaciones la relación C/A es superior a 0,33, en realizaciones preferidas esta relación es superior a 0,5 y en algunas realizaciones la relación es igual o superior a 0,66. En aspectos preferidos de dichas realizaciones la C/A es igual o inferior a 3, en aspectos adicionales preferidos la relación es igual o inferior a 2 y en aspectos preferidos en particular la relación es igual o inferior a 1,5.

En muchos aspectos de dichas realizaciones, la mezcla de lípidos resultante tiene carácter anfótero. Los lípidos imino que tienen un pK de más de 7,5, y más todavía los lípidos imino preferidos que tienen un pK de 8,5 o superior se cargan esencialmente en condiciones fisiológicas, su carga real se acerca y en su caso es idéntica a su carga nominal. El pK típico de lípidos carboxílicos está entre 4,5 y 6 y estos lípidos se cargan, por tanto, también a pH fisiológico. Por tanto, las mezclas del lípido imino y el lípido carboxílico tienen carga neta negativa a pH fisiológico siempre que C/A sea inferior a 1, la carga neta se hace 0 a C/A = 1 y positiva para C/A > 1.

A pH bajo, la carga aniónica desaparece en torno al pK del lípido carboxílico, lo que hace que las mezclas de lípidos tengan una C/A < 1 primero de carga neutra y después positiva. La inversión de carga es característica de C/A < 1 y define el carácter anfótero. Las mezclas de lípidos que tienen C/A = 1 o C/A > 1 también experimentan una reducción de cargas negativas a pH bajo, pero no inversión de carga. Sin embargo debe observarse que la relación entre C/A y carácter anfótero de los complejos lipídicos resultantes implica una distribución estadística, esencialmente igual, de las fracciones cargadas en una bicapa dada. Esto significa que las hojas interna y externa de una membrana deben tener la misma composición de lípidos cargados para mantener la plena validez de estos cálculos. Esto no siempre puede suceder así, como se muestra en el ejemplo 9 y pueden formarse liposomas de carácter anfótero incluso con mezclas de lípidos que tienen C/A > 1. Aun así, las correlaciones entre composición de membrana y carácter anfótero desveladas en la presente memoria descriptiva ofrecen orientación para la selección de mezclas de lípidos.

Las mezclas de lípidos pueden comprender además lípidos catiónicos, aniónicos, neutros/ zwitteriones o funcionalizados. Los lípidos catiónicos adicionales pueden ser componentes conocidos tales como DOTAP, DODAP, DC-Chol y similares. Los lípidos aniónicos adicionales pueden seleccionarse entre fosfolípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ácido dicetilfosfórico, cardiolipina y similares. Los lípidos neutros o zwitteriones son colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina y similares.

En realizaciones preferidas el lípido neutro es colesterol. Se prefieren adicionalmente variantes en las que las mezclas de lípidos comprenden entre el 10% en moles y el 50% en moles de colesterol, más preferidas todavía son variantes con aproximadamente el 20% en moles y el 40% en moles de colesterol.

Un grupo importante de lípidos funcionalizados son aquéllos que comprenden extensiones de polímeros como polietilenglicol (lípidos PEG). En la técnica se conocen numerosos lípidos PEGilados y pueden encontrarse diferencias esenciales en (i) el tamaño y el grado de ramificación de la cadena PEG, (ii) el tipo del grupo conector entre PEG y la parte insertada en membrana de la molécula y (iii) el tamaño del dominio hidrófobo con inserción de membrana de un lípido PEGilado. Algunos aspectos adicionales de la PEGilación son (iv) la densidad de la modificación en los complejos lipídicos y (v) su orientación dentro de dichos complejos lipídicos.

En muchas realizaciones del aspecto (i), el fragmento PEG tiene un peso molecular entre 500 Da y 5.000 Da, en realizaciones más preferidas, este fragmento tiene un peso molecular de aproximadamente 700 Da a 2.500 Da y se prefieren más todavía fragmentos PEG de aproximadamente 2.000 Da. En muchas de dichas realizaciones, la fracción PEG es un único PEG no ramificado de cadena única.

Son realizaciones típicas del aspecto (ii) fracciones de fosfoetanolamina, fracciones de diacilgliceroles o los grupos principales polares de ceramidas.

- 10 El tamaño del dominio hidrófobo de inserción de membrana caracterizado en el aspecto (iii) es una característica adicional importante de dichas moléculas ya que determina el tiempo de residencia de membrana del lípido PEG dentro de una bicapa. A modo de ejemplo, lípidos PEGilados que tienen un dominio hidrófobo corto tales como DMPE-PEG2000 (un conjugado de dimiristoilfosfatidiletanolamina-PEG, en el que la cadena PEG tiene un peso molecular de 2.000 Da) difuso a partir de una membrana dada en cuestión de segundos, mientras que el homólogo DSPE-PEG2000 reside en una bicapa durante muchas horas o días (véase Silvius, J.R. y Zuckermann, M.J. (1993) Biochemistry 32, 3153-3161 o Webb, M.S. y col. (1998) en Biochim Biophys Acta 1372: 272-282 o Wheeler y col. (1999) en Gene Ther 6: 271-281.

La PEGilación proporciona al mismo tiempo estabilidad coloidal a los liposomas, en particular a las combinaciones de liposomas catiónicos con cargas aniónicas en ácidos nucleicos tal como se ilustra en el documento US-6.287.591 pero también degrada la captación celular y/o endosómica de liposomas (véase Shi, F. y col. (2002) en Biochem. J. 366:333-341). La PEGilación transitoria es hoy habitual en la técnica y satisface la necesidad de estabilidad coloidal y actividad de las partículas.

- 25 Una aspecto (iv) adicional de PEGilación es la densidad de dicha modificación, que debería estar entre el 0,5 y el 10% en moles de la mezcla de lípidos, en realizaciones preferidas el grado de PEGilación es aproximadamente del 1 al 4% en moles.

Dado que la PEGilación de una bicapa dada estabiliza la fase laminar del conjunto de lípidos y degrada la fusión de lípidos asociada con la formación de una fase hexagonal, la cantidad de fracciones PEG residuales en una bicapa debe ser mínima. Esto puede conseguirse por valoración de las cantidades requeridas de lípidos PEG. En algunas realizaciones del aspecto (v) los liposomas están así PEGilados en las dos hojas de membrana y la cantidad de PEG se reduce al mínimo. En otra variante, la eliminación de PEG es lo más completa posible. Aunque se consigue fácilmente para los lípidos PEG asociados con la bicapa exterior, la difusión esencialmente no es posible para lípidos PEG fijados al interior de la estructura lipídica. Así una realización preferida del aspecto (v) de la presente invención para proporcionar liposomas que comprenden lípidos imino y carboxilo o fosfato cargadas que comprenden además lípidos PEGilados, en los que dichos lípidos PEGilados están situados esencialmente en la superficie exterior.

Dichos liposomas pueden estar caracterizados por el proceso de su producción, en el que los liposomas se forman en una primera etapa y esta etapa comprende también la encapsulación de moléculas de carga. A continuación se introducen los lípidos PEG en la bicapa exterior de los liposomas prefabricados en una segunda etapa, por ejemplo por adición de una solución micelar de lípidos PEGilados en la suspensión de liposomas. En una realización específica de dicho proceso, los liposomas que secuestran ácidos nucleicos se forman mezclando una solución acuosa de ácidos nucleicos con una solución alcohólica de lípidos. Se forman espontáneamente liposomas que atrapan ácidos nucleicos y en una etapa posterior se añaden lípidos PEGilados.

Con especial ventaja, dicho proceso puede ponerse en práctica con liposomas anfóteros, ya que estos liposomas ya proporcionan estabilidad coloidal y el elemento temporal entre la formación de liposomas y la PEGilación es menos crítico. La preparación de liposomas anfóteros que encapsulan ácidos nucleicos se desvela en el documento WO-02/066.012, su continuación US2007/0.252.295 o adicionalmente en el documento WO-07/107.304.

En una realización preferida, se someten a PEGilación liposomas anfóteros que comprenden lípidos imino y de carboxilo o fosfato en su superficie exterior proporcionando las cantidades requeridas de lípido PEG junto con el tampón de neutralización. Para ello, los lípidos PEG pueden disolverse en el tampón de neutralización. En otra realización, dichos liposomas se forman y se neutralizan y el lípido PEG se añade por separado después de un intervalo de tiempo de entre 0,1 s y varios días. En otra realización más, los liposomas se forman y se neutralizan y la suspensión de liposomas se concentra adicionalmente y los lípidos PEG se añaden después de la concentración de los materiales. En otra realización más, los liposomas se forman y se neutralizan y se concentran y se elimina el ácido nucleico no encapsulado y opcionalmente el tampón para que la suspensión de liposomas se intercambie y después se añaden los lípidos PEG. En resumen, los lípidos PEG pueden añadirse en cualquier momento después de la formación y el cierre de los liposomas.

En otras realizaciones los liposomas que comprenden lípidos imino y de carboxilo o fosfato tienen carácter catiónico sensible al pH y están PEGilados en su superficie exterior proporcionando las cantidades requeridas de PEG lípido tras la formación y el cierre de dichos liposomas, siguiendo las etapas expuestas anteriormente. Dado que los liposomas sensibles al pH son más proclives a formar agregados en presencia de ácidos nucleicos, se prefiere una PEGilación rápida y los lípidos PEG se añaden inmediatamente después del cierre de los liposomas, por ejemplo entre 0,1 s y 1 min después de su producción.

A diferencia de los procedimientos anteriores que producen liposomas que están esencialmente PEGilados en su superficie exterior, la presencia de lípidos PEGilados durante la formación real de liposomas; que es antes de que se cierren las estructuras en formación, da lugar a un producto diferente. Aunque no se han obtenido todavía datos estructurales, el experto en la materia esperaría en esta situación que una cantidad sustancial de fracciones de PEG residiera también en la hoja interior de la membrana. Es similar a la situación de la carga de ácidos nucleicos que también tiene acceso a las dos hojas del liposoma en formación y del cual puede detectarse una parte sustancial dentro de los liposomas, una vez que se han cerrado.

15 Complejos lipídicos

Los componentes mencionados en la presente memoria descriptiva pueden ensamblarse en varias estructuras conocidas para el experto en la materia. Puede tratarse de liposomas que comprenden una o varias bicapas individuales, otros complejos lipídicos o vesículas supramoleculares que tienen un volumen interior dimensionable que proporciona una fase acuosa. También pueden ser gotitas de emulsión o estructuras en forma de complejos de lipoplejos, esto último en muchas realizaciones que comprenden complejos electrostáticos entre los lípidos y los ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, estas estructuras son liposomas o vesículas. En muchas realizaciones, los liposomas o vesículas tienen un interior acuoso dimensionable. En muchos aspectos de la presente invención, un ingrediente farmacéutico activo se somete a formación de complejos, se encapsula, se secuestra o se asocia de otro modo con los complejos lipídicos. Dado el gran número de lípidos de imino y carboxilo o fosfato adicionales útiles, existe un número muy elevado de combinaciones potencialmente útiles lo que crea así una mayor necesidad de selección y optimización entre las numerosas variantes. El documento WO-08/043.575 ofrece orientación específica y proporciona un procedimiento para la optimización de complejos lipídicos complejos, específicamente para bicapas lipídicas, tal como se expone en más detalle en la presente memoria descriptiva. En suma, las enseñanzas del documento WO-08/043.575 muestran que las mezclas de lípidos anfóteros forman bicapas estables en condiciones de pH ácido y neutro, sin embargo, las bicapas formadas a partir de estas mezclas de lípidos pueden experimentar transición de fase y fusión en su punto isoeléctrico, que normalmente está en condiciones ligeramente ácidas. El documento WO-08/043.575 desvela el uso de grupos principales de lípidos de tamaño pequeño o moderado para los componentes lipídicos cargados. El documento WO-08/043.575 también enseña el uso de iones tampón grandes o voluminosos para estabilizar las fases laminares a pH bajo durante el procedimiento de carga, así como el uso de iones tampón grandes o voluminosos para estabilizar las fases laminares a pH neutro durante el almacenamiento. En particular, se hace referencia a las páginas 44-57 del documento WO-08/043.575, que muestran los elementos esenciales citados anteriormente. La referencia desvela además el uso de lípidos neutros que llevan un grupo principal pequeño de manera que se eleve al máximo la actividad de fusión. Son lípidos neutros típicos para mejora de la fusión colesterol o DOPE. Se presentan adicionalmente consideraciones específicas y reglas de optimización para los lípidos neutros en el documento WO-09/047.006, en particular en las páginas 63 a 70.

45 En conjunto, los documentos WO-08/043.575 o WO-09/047.006, referidos conjuntamente como "las Referencias" en la presente memoria descriptiva, proporcionan una orientación razonada para la optimización de complejos lipídicos. Las Referencias no se limitan a los liposomas anfóteros, sino que proporcionan un modelo extenso para la relación estructura-actividad de los complejos lipídicos.

50 La presente invención representa un avance en la técnica, ya que proporciona procedimientos optimizados de formulación de liposomas que son capaces de sortear la unión celular, la interacción o competencia con lipoproteínas u otros componentes séricos. Aunque los procedimientos enseñados por las Referencias proporcionan la información para la fusogenicidad necesaria de los complejos lipídicos, no aportan nada con respecto a la predicción de la unión celular de los liposomas.

55 Así, un objeto de la presente invención es proporcionar complejos lipídicos, mezclas de lípidos y liposomas formulados por el procedimiento develado en las Referencias en combinación con las propiedades inesperadas observadas cuando se usa un lípido imino que se carga sustancialmente en condiciones fisiológicas en combinación con un lípido aniónico que tiene una fracción de carboxilo o fosfato, es decir, cargada negativamente. Sin querer estar limitado por ninguna teoría, las nuevas composiciones formuladas en la presente memoria descriptiva pueden facilitar mejor la unión y captación celular similar a las lipoproteínas, una característica que no se conoce en la técnica.

Las mezclas de lípidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden tener propiedades catiónicas sensibles a pH o anfóteras, que en general se transportan hacia los complejos lipídicos o liposomas mediante los lípidos que las forman. Las propiedades de carga pueden predecirse fácilmente tal como se describe en el documento WO-02/066.012 para una distribución simétrica de los lípidos hacia las dos hojas de una membrana o bicapa lipídica. Sin embargo, en algunos casos la distribución de lípidos de la hoja más externa puede diferir de otras partes del conjunto. Macroscópicamente, las mezclas de lípidos que comprenden lípidos imino cargados en combinación con lípidos de carboxilo o fosfato que tienen C/A algo mayor que 1 pueden, por tanto, seguir formando liposomas que tienen carácter anfótero, tal como se muestra en el ejemplo 9 y la figura 1

10 Con fines de optimización y predicción *in silico*, las mezclas de lípidos de la presente invención que tienen una C/A < 1 se consideran anfóteras y pueden formar complejos lipídicos clasificados como mezclas "anfóteras I" de acuerdo con la clasificación de las Referencias. En otras realizaciones, se usan mezclas de lípidos que tienen C/A = 1 o C/A > 1; estas son mezclas de lípidos catiónicos sensibles al pH, es decir, su carga es neutra o catiónica a pH fisiológico y se vuelve más catiónica al disminuir el pH. Las mezclas catiónicas sensibles al pH de dichas realizaciones dejan de tener un punto isoeléctrico como sucede con sus contrapartidas anfóteras. Aun así, las relaciones estructura-actividad proporcionadas en las Referencias son aplicables ya que proporcionan una comprensión universal del comportamiento de fase de complejos lipídicos en combinación con el soluto y los iones sea cual sea su carga.

15 20 Con fines de claridad, las mezclas de lípidos de la presente invención comprenden uno o más lípidos catiónicos que tienen un grupo amino que se carga sustancialmente a pH fisiológico, que comprenden además uno o más lípidos aniónicos que tienen un grupo carboxilo o fosfato, que comprende opcionalmente lípidos neutros.

25 El carácter anfótero de los liposomas tiene ventajas adicionales. La carga superficial negativa de dichos liposomas o complejos lipídicos mejora enormemente la estabilidad coloidal de los liposomas en suspensión. Este hecho tiene especial importancia en combinaciones con cargas polianiónicas tales como ácidos nucleicos, que producen fácilmente agregados con liposomas catiónicos.

30 La carga superficial negativa o neutra de los complejos lipídicos o liposomas anfóteros es ventajosa también cuando se administran los liposomas *in vivo*, en los que se evita la adsorción inespecífica en endotelio o la formación de agregados con componentes séricos tal como se observa con liposomas catiónicos (véase Santel y col., (2006) en Gene Therapy 13: 1222-1234 para adsorción endotelial de liposomas catiónicos o en Andreakos y col., (2009) en Arthritis and Rheumatism, 60:994-1005 para la prevención de formación de agregados con liposomas anfóteros).

35 Así, en realizaciones preferidas, los liposomas de la presente invención tienen carácter anfótero. Dentro de este grupo, es ventajoso evitar porcentajes muy bajos del componente catiónico para mantener una carga eficaz de las partículas con cargas polianiónicas, por ejemplo, ácidos nucleicos. En realizaciones adicionales preferidas, la C/A es mayor que 0,5.

40 Cuando se aplican sistemáticamente, es decir, en el torrente sanguíneo, los liposomas experimentan cierta distribución en el organismo. Los lugares diana típicos son el hígado y el bazo, aunque también incluyen las células fagocíticas circulantes. Los liposomas también entran en contacto con el endotelio que rodea a los vasos sanguíneos y pueden transfectar estas células. La acumulación de liposomas en sitios inflamados y tumores tiene especial relevancia terapéutica.

45 El experto en la materia conoce procedimientos para dirigir la distribución de partículas hacia uno u otro sitio. Es bien conocido que los liposomas que tienen un pequeño diámetro de aproximadamente 150 nm o menos pueden penetrar en el endotelio del hígado, obteniendo así acceso a los hepatocitos y otras células del parénquima hepático. En aspectos en los que el direccionamiento de los hepatocitos del hígado tiene interés terapéutico, los liposomas de estas invenciones pueden tener 150 nm o menos de diámetro, en realizaciones preferidas, los liposomas puede ser de menos de 120 nm de diámetro.

50 También se conoce bien que las partículas que tienen un diámetro de 100 nm o superior son células fagocíticas bien reconocidas. Por tanto, en realizaciones en las que los macrófagos o las células dendríticas constituyen el objeto de interés, los liposomas de la presente invención son de 120 nm o más. En algunas realizaciones, estos liposomas son de 150 nm o más. En otras realizaciones estos liposomas pueden ser de hasta 250 nm, o de hasta 400 nm de tamaño.

60 También se ha descrito que la carga superficial puede influir en el tiempo de circulación, y con ello en la biodistribución de liposomas y está bien establecido que la PEGilación reduce la carga superficial y produce una circulación prolongada de los liposomas. Según se cree en general, la circulación prolongada eleva al máximo la distribución hacia tumores. Por tanto, en aspectos en los que los tumores constituyen el objeto de interés, los

liposomas de la presente invención tienen una carga superficial neta pequeña y se caracterizan por una C/A de entre 0,67 y 1,5. En realizaciones preferidas para dichas aplicaciones las mezclas de lípidos que forman dichos liposomas tienen una C/A de entre 0,8 y 1,25. Además, los liposomas que se dirigen a tumores son de pequeño tamaño. En realizaciones preferidas dichos liposomas son de menos de 150 nm, en realizaciones adicionales preferidas los liposomas son de menos de 120 nm. En algunas realizaciones, los liposomas comprenden además lípidos PEG.

Cargas para los liposomas de la presente invención

Los liposomas o complejos lipídicos de la presente invención pueden secuestrar o encapsular al menos un agente activo. Dicho agente activo puede comprender un fármaco. En algunas realizaciones, dicho agente activo puede comprender uno o más ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, el ingrediente activo consiste en ácidos nucleicos.

Sin limitarse a dicho uso, los liposomas o complejos lipídicos descritos en la presente invención están bien adaptados para su uso como portadores de fármacos basados en ácidos nucleicos como, por ejemplo, oligonucleótidos, polinucleótidos y plásmidos de ADN. Estos fármacos se clasifican en ácidos nucleicos que codifican una o más secuencias específicas para proteínas, polipéptidos o ARN y en oligonucleótidos que pueden regular específicamente los niveles de expresión de proteínas o influyen en la estructura de proteínas a través de, entre otros, la interferencia con el empalme y el truncamiento artificial.

En algunas realizaciones de la presente invención, por tanto, el agente terapéutico basado en ácidos nucleicos puede comprender un ácido nucleico que es capaz de ser transcrito en una célula de vertebrado en uno o más ARN, en los que dichos ARN pueden ser ARNm, ARNhc, ARNm o ribozimas, en los que dichos ARNm codifican para una o más proteínas o polipéptidos. Dichos agentes terapéuticos de ácidos nucleicos pueden ser plásmidos de ADN circulares, construcciones de ADN lineales, como vectores MIDGE (Expresión Génica Definida Inmunógenamente Minimalista) tal como se desvela en el documento WO-98/21.322 o DE-19.753.182, o ARNm preparados para traducción (por ejemplo, documento EP-1.392.341).

En otras realizaciones de la invención, pueden usarse oligonucleótidos que pueden dirigirse a ácidos nucleicos o proteínas intracelulares existentes. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar para un gen específico, de manera que dicho oligonucleótido esté adaptado para atenuar o modular la transcripción, modificar el procesamiento del transcrito o interferir de otro modo en la expresión de la proteína. El término "ácido nucleico diana" comprende ADN que codifica un gen específico, así como todos los ARN derivados de dicho ADN, que son pre-ARNm o ARNm. Una hibridación específica entre el ácido nucleico diana y uno o más oligonucleótidos dirigidos contra dichas secuencias puede producir la inhibición o modulación de la expresión de proteínas. Para conseguir dicho direccionamiento específico, el oligonucleótido debería comprender de forma adecuada una extensión continua de nucleótidos que sea sustancialmente complementaria a la secuencia del ácido nucleico diana.

Los oligonucleótidos que cumplen los criterios mencionados anteriormente pueden construirse con una serie de químicas y topologías diferentes. Los oligonucleótidos pueden comprender nucleósidos modificados o de ocurrencia natural que comprenden, pero no se limitan a, ADN, ARN, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos nucleicos no bloqueados (ANN), ARN 2'O-metil (2'Oma), ARN 2'O-metoxietilo (2'MOE) en sus formas de fosfato o fosfotioato o morfolinos o ácidos nucleicos peptídicos (ANP). Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

Los oligonucleótidos son estructuras polianiónicas que tienen 8-60 cargas. En la mayoría de los casos, estas estructuras son polímeros que comprenden nucleótidos. La presente invención no se limita a un mecanismo de acción en particular de los oligonucleótidos y no es necesaria una comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Los mecanismos de acción de oligonucleótidos pueden variar y podrían comprender entre otros efectos el empalme, la transcripción, el transporte citoplásmico nuclear y la traducción.

En una realización preferida de la invención, pueden usarse oligonucleótidos monocatenarios, lo que incluye, pero no se limita a, oligonucleótidos basados en ADN, ácidos nucleicos bloqueados, oligonucleótidos modificados en 2' y otros, conocidos normalmente como oligonucleótidos antisentido. Las modificaciones en el esqueleto o la base o el azúcar incluyen, pero no se limitan a, ADN de fosfotioato (PTO), ARN 2'O-metil (2'Oma), ARN 2'fluoro (2'F), ARN 2'O-metoxietilo (2'MOE), ácidos nucleicos peptídicos (ANP), fosfoamidatos N3'-P5' (NP), 2'fluoroarabino-ácidos nucleicos (FANA), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos nucleicos no bloqueados (ANN), fosfoamidato de morfolina (morfolino), ácido nucleico de ciclohexeno (ANCe), triciclo-ADN (ADNtc) y otros. Por otra parte, se conocen químicas mixtas en la técnica, que se construyen a partir de más de una especie de nucleótido como copolímeros, copolímeros de bloque o gápmers o en otras configuraciones.

Además de los oligonucleótidos mencionados anteriormente, la expresión de proteínas puede inhibirse también usando moléculas de ARN bicatenario que contienen los motivos de secuencias complementarios. Dichas moléculas

de ARN son conocidas en la técnica como moléculas ARNip (por ejemplo, documentos WO-99/32.619 o WO-02/055.693). Otros ARNip comprenden ARN monocatenarios o ARNip bicatenarios que tienen una cadena no continua. De nuevo, se han adaptado varias químicas para esta clase de oligonucleótidos. Además, en la técnica se conocen sistemas híbridos de ADN/ARN. Otras variedades de ARNip comprenden construcciones de tres cadenas
5 en los que dos cadenas pequeñas se hibridan en una cadena común más larga, los denominados ARNip o merodúplex, que tienen marcas o huecos en su arquitectura.

En otra realización de la presente invención puede usarse un oligonucleótido señuelo. Estas moléculas de ADN bicatenarias y modificaciones químicas de las mismas no se dirigen a ácidos nucleicos sino a factores de
10 transcripción. Esto significa que el oligonucleótido señuelo se une a proteínas de unión a ADN específicas de la secuencia e interfiere con la transcripción (por ejemplo, Cho-Chung, y col., en Curr. Opin. Mol. Ther., 1999).

En una realización adicional de la invención, pueden usarse oligonucleótidos que pueden influir en la transcripción al hibridarse en condiciones fisiológicas con la región de promotor de un gen. De nuevo existen varias químicas que
15 pueden adaptarse a esta clase de oligonucleótidos.

En una alternativa más de la invención pueden usarse ADNzimas. Las ADNzimas son oligonucleótidos monocatenarios y modificaciones químicas de los mismos con actividad enzimática. Las ADNzimas típicas, conocidas como modelo "10-23", son capaces de escindir ARN monocatenario en sitios específicos en condiciones
20 fisiológicas. El modelo 10-23 de ADNzimas tiene un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos altamente conservados, flanqueados por 2 dominios de reconocimiento de sustrato complementarios a una secuencia diana en el ARN. La escisión de los ARNm diana puede derivar en su destrucción y las ADNzimas reciclan y escinden múltiples sustratos.

En otra realización más de la invención pueden usarse ribozimas. Las ribozimas son oligorribonucleótidos monocatenarios y modificaciones químicas de los mismos con actividad enzimática. Pueden estar divididos operativamente en dos componentes, una estructura de tallo-bucle conservada que forma el núcleo catalítico y secuencias flanqueadoras que son complementarias inversas de secuencias que rodean al sitio diana en un transcrito de ARN. Las secuencias flanqueadoras pueden conferir especificidad y constituir generalmente 14-16 nt
30 en total, que se extienden a los dos lados del sitio diana seleccionado.

En otras realizaciones de la invención pueden usarse aptámeros para dirigirse a las proteínas. Los aptámeros son macromoléculas compuestas por ácidos nucleicos, tales como ARN o ADN, y modificaciones químicas de los mismos que se unen estrechamente a una diana molecular específica y tienen normalmente 15-60 nt de longitud. La
35 cadena de nucleótidos puede formar interacciones intramoleculares que pliegan la molécula en una forma tridimensional compleja. La forma del aptámero permite que se una estrechamente con la superficie de su molécula diana lo que incluye pero no se limita a proteínas ácidas, proteínas básicas, proteínas de membrana, factores de transcripción y enzimas. La unión de moléculas de aptámeros puede influir en la función de una molécula diana.

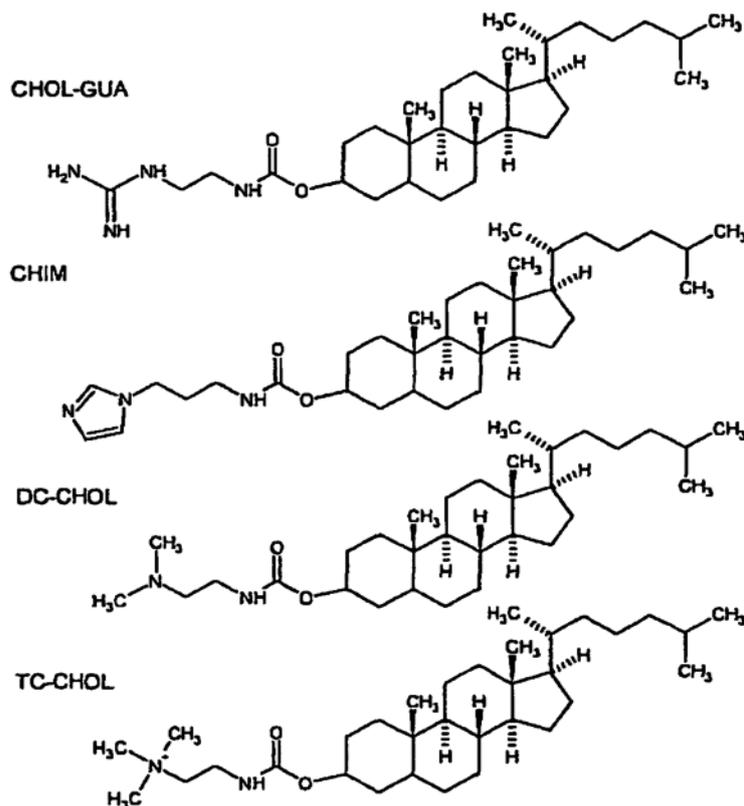
Todos los oligonucleótidos mencionados anteriormente pueden tener una longitud que varía entre apenas 5 ó 10, preferentemente 15 y incluso más preferentemente 18, y hasta 50 ó 60, preferentemente 30 y más preferentemente 25, nucleótidos por cadena. Más específicamente, los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos antisentido de 8 a 50 nucleótidos de longitud que catalizan la degradación mediada por ARNasa H de su secuencia diana o bloquean la traducción o redirigen el empalme o actúan como antagonistas; pueden ser ARNip de 15 a 30 pares de bases de
45 longitud; o pueden representar además oligonucleótidos señuelo de 15 a 30 pares de bases de longitud. Alternativamente, pueden ser oligonucleótidos complementarios que influyen en la transcripción de ADN genómico de 15 a 30 nucleótidos de longitud; además pueden representar ADNzimas de 25 a 50 nucleótidos de longitud o ribozimas de 25 a 50 nucleótidos de longitud o aptámeros de 15 a 60 nucleótidos de longitud. Dichas subclases de oligonucleótidos se definen a menudo funcionalmente y pueden ser idénticas o diferentes o compartir algunas, pero
50 no todas, de las características de su naturaleza o arquitectura química sin influir sustancialmente en las enseñanzas de la presente invención. El ajuste entre el oligonucleótido y la secuencia diana es preferentemente perfecto de manera que cada base del oligonucleótido forma un par de bases con su base complementaria en el ácido nucleico diana en un segmento continuo del número de oligonucleótidos mencionados anteriormente. El par de secuencias puede contener uno o varios desapareamientos dentro de dicho segmento continuo de pares de bases,
55 aunque esto es menos preferido. En general el tipo y la composición química de dichos ácidos nucleicos tienen un impacto escaso en el rendimiento de los liposomas de la invención como vehículos *in vivo* o *en vitro*, y el experto en la materia puede encontrar otros tipos de oligonucleótidos o ácidos nucleicos adecuados para su combinación con los liposomas anfóteros de la invención.

En algunos aspectos y tal como se muestra en la presente memoria descriptiva, los liposomas de acuerdo con la presente invención son útiles para transfectar células *en vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Realizaciones específicas

Lípidos basados en colesterol

- 5 Para ilustrar las enseñanzas de la presente invención, se combinaron sistemáticamente derivados catiónicos de colesterol que comprenden fracciones guanido (grupo cargado imino, CHOL-GUA), fracciones de imidazol (grupo imino no cargado, CHIM) o fracciones de dimetilamino o trimetilamonio (grupos no imino, pero cargados, DC-CHOL o TC-CHOL) con diferentes lípidos aniónicos.



10

Los lípidos aniónicos usados fueron CHEMS (colesterol como parte hidrófoba, grupo de carga de ácido carboxílico), DMGS o DOGS (diacilgliceroles como parte hidrófoba, grupo de carga de ácido carboxílico) o DOPA (diacilglicerol como parte hidrófoba, grupo de carga de éster fosfato). Para la mayoría de las combinaciones catión/anión, se preparó una serie de 8 mezclas binarias que tenían relaciones C/A entre 0,33 y 2, se probaron combinaciones de los lípidos catiónicos con DOPA a C/A de 0,75 y 1. Se añadió colesterol a todas las mezclas de lípidos para constituir entre el 20 y el 40% en moles, tal como se indica.

15

Todos los liposomas se cargaron con ARNip PLK-1, un oligonucleótido capaz de inhibir la producción de la cinasa del ciclo celular PLK-1 y se midió con éxito la transfección por inhibición de viabilidad celular de las células de prueba (véase también Hauptenthal y col., *Int. J. Cancer* (2007), 121:206-210. Se supervisó la inhibición inespecífica de la viabilidad celular, es decir, los efectos citotóxicos, mediante preparaciones de control que comprenden un ARNip de direccionamiento no lineal de la misma composición general y en las mismas cantidades.

20

25 La transfección de células se siguió en medio de cultivo celular regular o con la presencia adicional del 10% de suero de ratón, un potente inhibidor de captación celular para muchos liposomas anfóteros. La eficacia de la transfección se expresa como IC_{50} , la concentración necesaria para conseguir una inhibición del 50% de la viabilidad celular.

30 La relación entre la IC_{50} en medio regular y la IC_{50} tras adición de suero de ratón se usa como métrica de la inhibición de la captación celular por suero de ratón. Esta relación es de 5 o más para liposomas sin propiedades de direccionamiento específicas. Es de 5 o menor para los liposomas de la presente invención; es decir, liposomas que comprenden grupos cargados imino en combinación con lípidos con carga negativa.

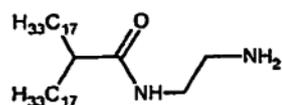
Tal como se demostrará adicionalmente en los ejemplos 14, la mejor transfección resistente al suero de células HeLa puede conseguirse mediante combinaciones de CHOLGUA con el lípido carboxílico DOGS. Se obtuvieron resultados especialmente buenos en presencia de menos del 40% de colesterol y para mezclas que tenían una C/A de entre 0,5 y 1,5. Si todos los demás componentes tales como DOGS o colesterol se mantuvieran constantes y el grupo principal GUA se intercambiara con una dimetilamina como en DC-CHOL, los liposomas siguen activos en ausencia, pero ya no en presencia, de suero de ratón. Puede observarse el mismo efecto para combinaciones de CHIM y DMGS.

Las combinaciones de lípidos catiónicos basados en colesterol con el lípido de fosfato DOPA se asemejan a los hallazgos en los que las mejores actividades se observaron para el lípido imino CHOLGUA. Además, podría observarse transfección resistente al suero de liposomas CHOLGUA:DOPA, aunque con una inhibición sustancial comparada con la ausencia de suero. Las combinaciones para DOPA con CHIM o DC-CHOL no produjeron ninguna transfección en presencia de suero.

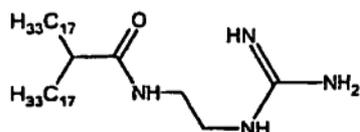
15 Lípidos basados en DACA

Para investigar adicionalmente la dependencia de la transfección resistente al suero a partir de la química de los grupos principales, se sintetizaron los siguientes lípidos usando un anclaje de ácido dialquil-carboxílico (DACA) común como dominio hidrófobo:

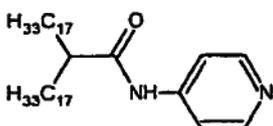
20



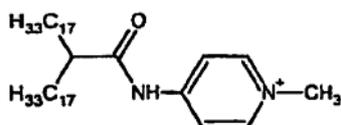
ADACA (Amino-DACA)



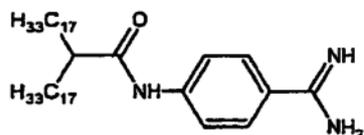
GUADACA (Guanidino-DACA)



PDACA (Piridil-DACA)



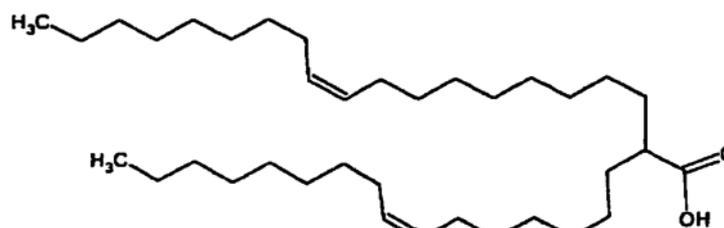
MPDACA (Metilpiridil-DACA)



BADACA (Benzamidin-DACA)

En los que la fracción DACA se obtuvo por adición de yoduro de oleilo a ácido oleico tal como se describe en el ejemplo 10 y el compuesto resultante es:

25



Ácido DACA-dialquilcarboxílico

De los lípidos catiónicos, GUADACA, MPDACA o BADACA tienen una fracción imino cargada en sus grupos principales polares. El grupo principal de PDACA es esencialmente no cargado debido al bajo pK de la fracción de piridina (el pK calculado es 5,9) mientras que la variante metilada da lugar a la formación del compuesto de piridinio cargado constantemente MPDACA. ADACA tiene un pK suficientemente alto de aproximadamente 9, carece del componente imino. Sin embargo, pueden formarse pequeñas cantidades de amina respectiva a partir de ese componente ya que el grupo amino está situado en la posición α de la amida, lo que permite la estabilización mesomérica de la forma imina.

10

Se prepararon combinaciones con los lípidos aniónicos CHEMS, DMGS, DOGS y DOPA tal como se describe anteriormente para los lípidos basados en colesterol y se produjeron series similares de diferentes liposomas que tienen diversas relaciones C/A de entre 0,33 y 2 (o 0,75 y 1 para el lípido de fosfato).

15 Además, los liposomas se cargaron con ARNip de direccionamiento de PLK-1 o una secuencia no relacionada y se sometieron a ensayo las propiedades de transfección en células HeLa en presencia o ausencia de suero de ratón.

Tal como se demostrará adicionalmente en los ejemplos 14 y 15, puede conseguirse transfección resistente al suero de células HeLa mediante combinaciones de GUADACA o MPDACA con lípidos carboxílicos o lípidos de fosfato.

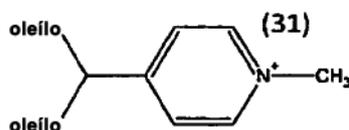
20 Además, estos lípidos producen una transfección muy eficiente de ARNip PLK-1 también en ausencia de suero. Esto implica que no existe activación de los liposomas con componentes séricos tal como se ha descrito recientemente para liposomas que tienen un grupo principal dimetilamino (Akinc y col., Mol. Ther. (2010) publicación electrónica del 11 de mayo antes de imprenta. DOI: 10:1038/mt.2010.85). Se observan también niveles muy elevados de actividad de portador para relaciones C/A entre 0,5 y 1,5 para las combinaciones con los lípidos carboxílicos y para C/A 0,75 ó 25 1 para los lípidos de fosfato. En muchos de estos casos, las formulaciones tienen propiedades de carga de anfótero.

La falta de metilación del compuesto de piridinio MPDACA produce el PDACA relacionado. Aunque lleva todavía una función imina, esta función ya no está cargada como en MPDACA; PDACA tampoco está activo como lípido catiónico para fines de transfección. En otra variante más, se mantuvo el anillo aromático del grupo principal, pero entonces la imina cargada se presentó como parte de un grupo aminada extraanular. Se encontró que este compuesto estaba activo como un lípido para transfección, por ejemplo en combinaciones con CHEMS o DMGS en las que también produjo transfección resistente al suero.

30 Lípidos adicionales basados en ácidos dialquilcarboxílicos.

35

Se han realizado hallazgos similares usando el lípido de piridinio SAINT-18 tal como se describe en el documento US-6.726.894 (estructura 31).



40

SAINT-18 se combinó con varios aniones lipídicos, tales como CHEMS, DMGS o DOGS. Se modificaron las relaciones entre lípidos catiónicos y aniónicos de una forma sistemática y a las mezclas binarias resultantes se les suministró opcionalmente el 20 o el 40% en moles de colesterol. Las mezclas de lípidos individuales se transformaron en liposomas y se usaron para la encapsulación de un ARNip activo y de control. Cuando se probaron en células HeLa en presencia de medio de cultivo celular normal, se observó una inhibición eficiente y específica de la viabilidad celular para numerosas de las formulaciones probadas, tal como se muestra en el Ejemplo 8. Sin embargo, ninguno de los liposomas que tienen una C/A ≥ 1 produjo transfección de células en presencia de suero de ratón. En claro contraste, muchas de las formulaciones anfóteras resistieron la prueba de provocación con suero y no transfectaron las células con eficacia. Además, el efecto era específico del ARNip PLK-1 y fueron necesarias

45

concentraciones mucho más elevadas de liposomas cargados con un ARNip (SCR) no relacionado para inhibir de forma inespecífica la proliferación celular. Los mejores resultados se obtuvieron usando SAINT 18 en combinación con DMGS. Los liposomas que comprenden SAINT-18 y DMGS, caracterizados adicionalmente por $C/A < 1$, están por tanto dentro del alcance de la presente invención.

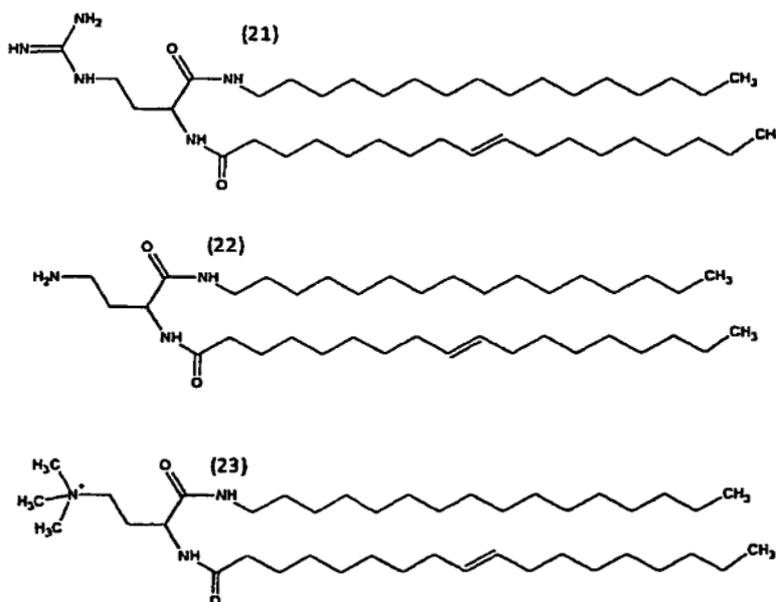
5

Lípidos basados en aminoácidos

Para ilustrar adicionalmente las enseñanzas de la presente invención, se combinó el lípido guanido catiónico PONA (palmitoil-oleoil-nor-arginina, estructura 21) con varios aniones lipídicos tales como CHEMS o DMGS. Se modificaron las relaciones de los lípidos catiónicos y aniónicos de un modo sistemático y a las mezclas binarias resultantes se les suministró opcionalmente el 20% en moles de colesterol. Las mezclas de lípidos individuales se transformaron en liposomas y se usaron para la encapsulación de un ARNip activo y de control. Cuando se probaron en células HeLa, se observó una inhibición eficaz y específica de la viabilidad celular para la mayoría de las formulaciones sometidas a prueba, tal como se muestra en el Ejemplo 5. La actividad no estuvo afectada, o lo estuvo sólo marginalmente, por la presencia de suero humano o de ratón.

En el Ejemplo 6, se combinó el lípido aniónico CHEMS con derivados de PONA, en los que la fracción guanido se sustituyó por un grupo amino (PONamina) o un grupo amonio cuaternizado (PONamónio) tal como se muestra en las estructuras (21) y (23).

20



De nuevo, se modificaron sistemáticamente las relaciones entre componentes lipídicos aniónicos y catiónicos y en todas las mezclas de lípidos estuvo presente el 20% de colesterol. El material se formuló en liposomas y se usó para la encapsulación de ARNip activo y de control. Cuando se sometió a prueba en células HeLa, se observó una inhibición eficaz y específica de la viabilidad celular para todas las formulaciones que comprendían un exceso molar de los lípidos catiónicos. Para mezclas que comprendían cantidades molares superiores del lípido aniónico CHEMS, se observó la mejor actividad en combinaciones con PONA, mientras que las combinaciones PONamina:CHEMS fueron eficaces sólo en algunos casos. Las combinaciones PONamónio:CHEMS no fueron eficaces cuando se usó un exceso del lípido aniónico.

Por otra parte, de las mezclas que comprenden un exceso del lípido aniónico CHEMS, la actividad de transfección de las combinaciones PONA:CHEMS resultó afectada sólo marginalmente por la presencia de suero humano o de ratón, mientras que la actividad de las combinaciones de PONamina:CHEMS estaba completamente suprimida en presencia de suero de ratón. Las formulaciones de PONamónio permanecieron inactivas en presencia de sueros.

También se sometieron a ensayo las combinaciones de PONA, PONamina o PONamónio con los lípidos de fosfato DOPA tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 15. PONA y PONamina, pero no PONamónio, produjeron transfección resistente al suero de células HeLa.

Los datos combinados apoyan una captación preferida de combinaciones de lípidos que comprenden lípidos

guanido en combinación con lípidos de carga negativa, por ejemplo de carboxilo o fosfato. Esto puede estar relacionado con las consideraciones mecánicas que se indican más adelante. La alta y constante actividad de las formulaciones que tienen un exceso del componente de lípido catiónico puede deberse a la interacción electrostática entre estas partículas y la superficie celular, que sin embargo es inespecífica. En línea con esta opinión puede 5 aducirse que la actividad de las formulaciones catiónicas no dependía de la naturaleza del lípido aniónico o catiónico.

En experimentos adicionales, el lípido guanido PONA se combinó con CHEMS, DMGS o DOGS. De nuevo, se realizó una variación sistemática de las relaciones del compuesto lipídico aniónico y catiónico en las mezclas 10 binarias respectivas y se suministró adicionalmente en las formulaciones el 0, el 20 o el 40% en moles de colesterol. Cuando se sometió a ensayo como antes, la gran mayoría de las formulaciones estaban activas para la inhibición de la proliferación celular de células HeLa con un IC₅₀ menor 6 nM (véase el Ejemplo 7). Sin embargo, una comparación entre las concentraciones necesarias para la eficacia del ARNip activo e inactivo reveló diferencias sustanciales entre las formulaciones. Una medida para dicha comparación es la relación entre los valores de IC₅₀ para los dos 15 ARNip, expresada en este caso como relación SCR/PLK. Sólo formulaciones seleccionadas alcanzan valores significativamente superiores a 5. Incluso las formulaciones más preferidas tienen SCR/PLK \geq 10. Todas estas formulaciones preferidas pueden caracterizarse por su relación entre el componente lipídico catiónico y aniónico, que es menor que 1.

20 Esta invención identifica la química de grupos principales de lípidos específicos que es crucial para la captación en ciertas células en presencia de sueros inhibidores. Preferentemente, las combinaciones anfóteras de lípidos aniónicos que comprenden grupos carboxilo y lípidos catiónicos que comprenden fracciones imino cargadas producen las propiedades deseadas. En cambio, las formulaciones catiónicas que comprenden los mismos lípidos no dependen de la química de grupos principales específicos y son menos toleradas por las células.

25

Unión a lipoproteínas

Las lipoproteínas que compiten con la transfección de liposomas comprenden una diversidad de estructuras, de acuerdo con su densidad. Son conocidas como partículas de quilomicrones, VLDL, LDL, IDL o HDL. En la vía 30 endógena, los quilomicrones son sintetizados en la mucosa epitelial del intestino delgado y se ensamblan usando ApoB-48, una variante más corta del producto génico ApoB. Un posterior intercambio de lipoproteínas con partículas HDL conduce a la transferencia de ApoC-II y ApoE a la partícula de quilomicrones, de manera que la primera media en la activación de la lipoproteína lipasa, una enzima necesaria para la liberación de lípidos desde la partícula. Los quilomicrones hidrolizados forman los denominados residuos, que son captados principalmente en el hígado 35 mediante el reconocimiento de su parte ApoE. La síntesis, maduración, uso y reciclado de partículas VLDL sigue la misma vía, aunque empieza en el hígado y usa la proteína ApoB-100 como su unidad de formación de estructuras. De nuevo, la ApoE media en la posible captación y reciclado de residuos de VLDL, las denominadas partículas IDL. (véase también <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein>).

40 La ApoE comparte homología estructural con las apolipoproteínas A y C dado que todas comprenden repeticiones en tándem anfipáticas de 11 aminoácidos. Los datos cristalográficos confirman la existencia de estructuras helicoidales anfipáticas extendidas para fragmento de ApoA-I y ApoE y también revelan una organización de carga mixta en la cara polar de estas hélices. Estos datos son accesibles públicamente en el Banco de Datos de Proteínas RCSB (disponible en www.rcsb.org/pdb/home/home.do) y la entrada 1AV1.pdb produce la estructura de proteínas de 45 ApoA-I. Los aminoácidos 129 a 166 de 1lpe.pdb representan el fragmento de unión al receptor LDL de ApoE. A diferencia de su semejanza global, las tres apolipoproteínas muestran desviaciones específicas cuando se analiza su composición de aminoácidos. En la ApoE, la arginina es el aminoácido catiónico prevalente en las repeticiones en tándem. En cambio, la ApoA tiene cantidades iguales de lisina y arginina, mientras que la ApoC tiene un exceso de residuos de lisina.

50

Tabla 3: Análisis de la composición de aminoácidos en repeticiones en tándem de apolipoproteínas relacionadas. Los datos de secuencias se obtuvieron de Swiss-Prot disponibles en www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html).

Secuencia	ApoA1	ApoE	ApoC-II
Entrada de SwissProt	P02647	P02649	P02655
Criterios de valoración	68-267	80-255	23-101
longitud	199	175	78
IP	5,55	9,16	4,66
# de lisina	18	8	6
# de arginina	14	25	1
# de histidina	5	1	0
# de ácido aspártico	10	8	4

# de ácido glutámico	28	22	7
	ApoA1	ApoE	ApoC-II
Lisina (%)	9%	5%	8%
Arginina (%)	7%	14%	1%
Histidina (%)	3%	1%	0%
Ácido aspártico (%)	5%	5%	5%
Ácido glutámico (%)	14%	13%	9%

En resumen, la superficie polar de las lipoproteínas naturales se cubre con apolipoproteínas, de las que la ApoE es un motivo de unión común para la captación celular de estas partículas. Las partes expuestas al agua de la ApoE representan un mosaico de cargas aniónicas y catiónicas, en el que las cargas aniónicas se crean a partir de un extremo carboxilo libre de residuos de ácido aspártico y glutámico. Las cargas catiónicas comprenden una mezcla de grupos amino y guanido con muy pocos imidazoles presentes.

Con el fin de emular el patrón de reconocimiento de la casete de unión de ApoE en la superficie de los liposomas, pueden seguirse diferentes alternativas. Es posible sintetizar fragmentos de péptidos ApoE e injertos como, por ejemplo, péptidos en la superficie de los liposomas. Así se ha demostrado en Mims y col., J Biol. Chem. 269, 20539 (1994); Rensen y col., Mol Pharmacol. 52, 445 (1997); Rensen y col., J. Lípido Res. 38, 1070 (1997); Sauer y col., Biochemistry 44, 2021 (2005) o Versluis y col., J Pharmacol. Exp. Ther 289, 1 (1999). Sin embargo, el alto coste asociado con la síntesis y derivación de péptidos requiere enfoques alternativos.

Una presentación directa de las fracciones cargadas requeridas que use mezclas de diferentes lípidos cargados, que además comprenden potencialmente lípidos neutros, produciría una estructura mucho más sencilla y eliminaría la necesidad de una costosa producción y derivación de péptidos. Un reto considerable de dicho enfoque es la difusión plana de los grupos cargados dentro de la bicapa lipídica; hasta ahora no estaba claro si la afinidad de dicho conjunto menos organizado competiría de manera eficaz con las afinidades proporcionadas por las lipoproteínas auténticas. Por otra parte, los grupos principales de lípidos con carga opuesta pueden formar puentes salinos entre sí, mientras que sólo se detectan algunos enlaces de hidrógeno entre grupos funcionales en la casete de unión de lipoproteínas, por ejemplo ApoE. Esto puede explicar la actividad de las combinaciones de lípidos imino:fosfato tales como GUADACA:DOPA o MPDACA:DOPA. Mientras que DOPA proporciona dos cargas negativas en condiciones fisiológicas, el impedimento estérico inhabilita la formación de una sal a partir de un lípido DOPA y dos GUADACA. De este modo, en estas membranas la sal de carga negativa entre DOPA y GUADACA debe coexistir con moléculas de GUADACA libres, con lo que facilita la presencia simultánea de elementos aniónicos y catiónicos separados en un conjunto de lípidos común.

La teoría anterior se menciona sin limitación de los hallazgos de la presente invención. Sin querer limitarse a esta teoría en particular, se puede suponer que las combinaciones de lípidos cargados imino con lípidos con carga negativa de carboxilo o fosfato imitan las propiedades superficiales de las lipoproteínas cubiertas con ApoE. Naturalmente, las partículas pueden usarse, desarrollarse y optimizarse sin este conocimiento. Sin embargo, las bases teóricas pueden ser útiles para comprender los principios de guía o la aplicabilidad de los vectores descritos en las diversas realizaciones de la presente invención.

Por ejemplo, se sabe que los receptores de lipoproteínas tienen diferentes perfiles de expresión en diversos tipos celulares y dicho conocimiento puede usarse para evaluar las poblaciones de células diana para los liposomas de la presente invención.

El receptor LDL tiene una expresión elevada en tumores y en las células broncoepiteliales del pulmón (véase Su Al, Wiltshire T, Batalov S, y col. (2004). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (16): 6062-7, también publicado en http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_GE_LDRLR_202068_s_at_tn.png).

Los liposomas de la presente invención son así adecuados específicamente para aplicaciones en el campo de la oncología, pero también para transfeción de células pulmonares específicas. Mientras que los tumores son accesibles desde la circulación sistémica a través del efecto EPR (permeabilidad y retención mejoradas), es decir mediante una vasculatura tumoral permeable, es posible dirigirse a las células broncoepiteliales también desde las vías respiratorias.

En una realización específica de la presente invención, se usan así aerosoles de liposomas que comprenden lípidos imino y de carboxilo o fosfato cargados para formas de dosificación inhaladas de cara al direccionamiento de células pulmonares, en particular células broncoepiteliales.

Leyendas de figuras

55

Las Figuras 1 a 6 muestran los resultados del experimento de cribado descrito en el ejemplo 14. La naturaleza de los lípidos catiónicos se indica en las figuras menores y otras leyendas y ejes son similares para el resto de los elementos y se suministran en la figura más pequeña separada que se muestra más adelante. Las dobles barras denotan liposomas con el 20% de colesterol (barra izquierda) y el 40% de colesterol (barra derecha), 5 respectivamente.

Las barras representan los valores de IC₅₀ para las combinaciones respectivas de liposoma/ARNip en las condiciones experimentales para cada figura, es decir, en presencia o ausencia de suero de ratón. Estos valores de IC₅₀ denotan las concentraciones necesarias para una inhibición semimáxima del crecimiento celular y se 10 suministran en nM. Las concentraciones máximas de los elementos de prueba fueron 40 y 36 nM para la ausencia o presencia de suero de ratón, respectivamente.

El orden de los elementos de prueba es el siguiente:

15 Figura 1 el lípido aniónico es CHEMS - sin adición de suero de ratón

Figura 2 el lípido aniónico es CHEMS + adición de suero de ratón

Figura 3 el lípido aniónico es DMGS - sin adición de suero de ratón

20

Figura 4 el lípido aniónico es DMGS + adición de suero de ratón

Figura 5 el lípido aniónico es DOGS - sin adición de suero de ratón

25 Figura 6 el lípido aniónico es DOGS + adición de suero de ratón

Ejemplos

Las enseñanzas de la presente invención pueden comprenderse mejor con la consideración de los siguientes 30 ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no limitan en ningún modo las enseñanzas de la presente invención.

Ejemplo 1 - Producción de liposomas, caracterización y encapsulación de ARNip

Se prepararon liposomas usando procedimientos tal como se desvela en el documento WO-07/107.304. Más 35 específicamente, se disolvieron lípidos en isopropanol y se produjeron los liposomas por adición de solución de ARNip en NaAc 20 mM, Sacarosa 300 mM, pH 4,0 (pH ajustado con HAc) a la mezcla lipídica alcohólica, con el resultado de una concentración final de alcohol del 30%. Las suspensiones liposómicas formadas se desplazaron a pH 7,5 con dos veces el volumen de Na₂HPO₄ 136 mM, NaCl 100 mM (pH 9), lo que dio como resultado una concentración final de lípidos de 3 mM y una concentración final de isopropanol del 10%.

40

Los liposomas se caracterizaron con respecto a su tamaño de partículas usando dispersión luminosa dinámica (MALVERN 3000HSA).

ARNip activo: 21 meros de ARNm PLK-1 de ratón y humano de direccionamiento a extremo romo como en 45 Hauptenthal y col., Int. J. Cancer (2007), 121:206-210.

ARNip de control (SCR): 21 meros de la misma fuente.

Ejemplo 2 - Cultivo celular general y ensayo de proliferación

50

Se obtuvieron células HeLa de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) y se mantuvieron en DMEM (Gibco-Invitrogen) y se suplementaron con FCS al 10%. Se sembraron en placa las células en una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/ml y se cultivaron en 100 μ l de medio a 37°C en CO₂ al 5%. Después de 16 h, se diluyeron los liposomas que contenían ARNip y se añadieron 10 μ l a las células para producir concentraciones 55 finales de entre 0,4 y 100 nM de PIK1 o ARNip aleatorizado; se añadieron también 10 μ l de tampón de dilución a las células no tratadas y en pocillos sin células. Se incubaron las bandejas de cultivo celular durante 72 h a 37°C en CO₂ al 5%.

Se determinó la proliferación/viabilidad celular usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue (Promega, 60 EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 3 - Inhibición de transfección por sueros

Se cargaron liposomas de DODAP:DMGS:Coolesterol (24:36:40% en moles) con ARNip activo y de control como anteriormente y se incubaron 25 μ l de los liposomas con 75 μ l de sueros de diferentes especies (SIGMA-Aldrich) durante 30 min. A continuación, se añadieron liposomas a las células, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente.

Cuando se incubó sin suero, la administración del ARNip activo produce una intensa inhibición de la proliferación celular. Tal como se muestra en la Tabla 7 mostrada a continuación, este proceso se inhibe mediante la adición de sueros.

10

Tabla 7: Inhibición de transfección celular por sueros de diferente origen.

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

Ejemplo 4 – La inhibición es dependiente de las lipoproteínas

15

Se incubaron liposomas como en el Ejemplo 3 con suero humano desprovisto de determinados factores de complemento o lipoproteínas (SIGMA-Aldrich) como anteriormente y se analizó su capacidad para mediar en el efecto del ARNi en células HeLa.

20 Tal como se muestra en la Tabla 8, la eficacia de la transfección puede restaurarse mediante una depleción de las lipoproteínas. La eliminación de los factores de complemento fue ineficaz.

Tabla 8: Restauración de transfección celular en sueros deficientes en varios factores.

Tipo de ARNip	Concentración de ARNip	Suero	Viabilidad celular (%)
PLK1	50 nM	no	7
PLK1	50 nM	Humano, completo	98
PLK1	50 nM	Humano, sin factor de complemento C3	91
PLK1	50 nM	Humano, sin factor de complemento C9	98
PLK1	50 nM	Humano, deficiente en lipoproteínas	18
No	No	No	100

25

Ejemplo 5 - Transfección resistente al suero usando un lípido guanido

Se construyó una serie de liposomas a partir de PONA:Lípido aniónico:Coolesterol (x:y:20% en moles) y se cargó con ARNip activo y de control como en el Ejemplo 1. Dentro de esa serie, se modificó sistemáticamente la relación entre el componente catiónico PONA y los lípidos aniónicos CHEMS o DMGS entre 0,33 y 2 tal como se indica en la tabla. A los liposomas que tenían una relación de lípido catiónico:aniónico de 1 o superior se les suministró adicionalmente el 2% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación está indicada con una "+" en la tabla. Las reacciones de control con partículas que tenían C/A < 1 no revelaron un cambio en las propiedades de transfección en presencia o ausencia de lípidos PEG.

35

Se cultivaron y mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadieron sueros de origen humano o de ratones (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. A continuación, se añadieron los liposomas a las células en concentraciones de entre 50 pM y 50 nM, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC₅₀, la concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50%. Por tanto, los valores de IC₅₀ bajos representan una transfección altamente eficaz.

40 Resulta evidente a partir de los resultados en la Tabla 9, que la adición de sueros afecta sólo marginalmente a la transfección de ARNip mediada por los liposomas del ejemplo. Se observa todavía cierta inhibición para liposomas de PONA:CHEMS que comprenden bajas cantidades del lípido aniónico (relaciones 0,33 y 0,5, una inhibición especialmente intensa con suero de ratón).

45

Tabla 9: Eficacia de transfección de liposomas que comprenden fracciones guanido en presencia de sueros.

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

Ejemplo 6 – Valor crítico del grupo principal guanido

5

Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones modificadas sistemáticamente entre los componentes de lípidos catiónicos y aniónicos y se cargaron con ARNip como en el Ejemplo 5. Los componentes de lípidos catiónicos fueron PONA, PONamina y PONamónio, el lípido aniónico fue CHEMS y el contenido en colesterol se fijó en el 20% en moles. A los liposomas que tenían una relación de lípido catiónico:aniónico de 1 o superior se les suministró el 10 2% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación se indica mediante un “+” en la tabla.

Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadieron sueros de origen humano o de ratones (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. A continuación, se añadieron los liposomas a 15 las células en concentraciones de entre 50 pM y 50 nM, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC₅₀ como en el Ejemplo 5.

A partir de los datos de la Tabla 10 parece evidente que sólo PONA, pero no PONamina y menos aún PONamónio, 20 media en la transfección de células HeLa en presencia de suero. Este hecho adquiere la máxima relevancia en el caso de suero de ratón, que inhibe la transfección de forma más agresiva. Un exceso de los componentes de lípidos catiónicos compensa en cierta medida la pérdida de actividad mediada por los sueros, si bien puede deberse a la adsorción electrostática inespecífica de estos liposomas a las células.

Tabla 10: Valor crítico del grupo principal guanido para la transfección resistente al suero de células.

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

5 **Ejemplo 7 - Optimización de la composición de liposomas**

Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones modificadas sistemáticamente entre los componentes de lípidos catiónicos y aniónicos y se cargaron con ARNip como en el Ejemplo 5. El componente de lípido catiónico fue PONA, los lípidos aniónicos fueron CHEMS, DMGS o DOGS y el contenido en colesterol se varió entre el 0 y el 40% en moles. A los liposomas que tenían una relación de lípido catiónico:aniónico de 1 o superior pero también a algunos de los otros liposomas se les suministró adicionalmente el 2% en moles de DMPEPEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación se indica mediante un “+” en la tabla.

Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadieron liposomas a las células en concentraciones de entre 6 nM y 200 nM, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC₅₀ como en los ejemplos anteriores. Además, se determinó la IC₅₀ para los liposomas que llevaban el ARNip inactivo (SCR) y se determinó la relación entre IC₅₀ (SCR) e IC₅₀ (PLK1). Un valor elevado para este parámetro indica una inhibición muy específica de la viabilidad celular mediante el ARNip PLK1, bajos efectos inespecíficos a los que contribuyó el soporte y bajos niveles de citotoxicidad en general.

ES 2 527 220 T3

Tabla 11: Resultados de optimización para CHEMS. Los valores de IC₅₀ mínimos y máximos detectables son 6 y 200 nM, respectivamente.

	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK	0% Col	44	77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	20% Col	54	79	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	40% Col	67	94	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR	0% Col	90	86	113	152	23	200	16	21	15	16	14	11
	20% Col	73	90	109	128	200	200	26	23	21	11	16	10
	40% Col	94	117	198	200	200	200	6	6	30	14	27	12
	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR/PLK	0% Col	2,05	1,12	18,86	25,33	3,81	83,33	2,60	3,52	2,50	2,68	2,30	1,84
	20% Col	1,37	1,14	18,10	21,39	83,33	83,33	4,26	3,77	3,45	1,84	2,65	1,69
	40% Col	1,40	1,24	32,96	83,33	83,33	83,33	1,00	1,00	5,00	2,39	4,48	1,97

5

Tabla 12: Resultados de optimización para DMGS. Los valores de IC₅₀ mínimos y máximos detectables son 6 y 200 nM, respectivamente.

	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK	0% Col	98	200	200	188	6	6	6	6
	20% Col	6	6	6	6	6	6	6	6
	40% Col	6	6	6	6	6	6	6	6
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR	0% Col	200	200	200	158	14	6	10	14
	20% Col	200	54	8	8	13	9	9	10
	40% Col	155	23	11	6	6	14	9	12
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR/PLK	0% Col	5,11	sin efecto	sin efecto	0,84	2,26	1,00	1,66	2,36
	20% Col	83,33	9,01	1,27	1,26	2,20	1,55	1,45	1,69
	40% Col	25,85	3,90	1,83	1,00	1,00	2,27	1,54	1,97

10 Tabla 13: Resultados de optimización para DOGS. Los valores de IC₅₀ mínimos y máximos detectables son 6 y 200 nM, respectivamente.

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

Ejemplo 8 - Liposomas que comprenden un lípido de piridinio

Se usó SAINT-18 como lípido catiónico, su estructura de piridinio metilado proporciona una fracción imino cargada. Se usaron individualmente CHEM, DMGS y DOGS como lípidos aniónicos que proporcionaban el grupo funcional carboxilo. Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones modificadas sistemáticamente entre los componentes de lípidos catiónicos y aniónicos y se cargaron con ARNip como en el Ejemplo 5. A la mezcla de lípidos se le suministró adicionalmente el 20 o el 40% en moles de colesterol. A liposomas que tenían una relación de lípido catiónico:aniónico de 1 o superior se le suministró el 2% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la agregación de las partículas. Esta modificación se indica mediante un “+” en la tabla.

Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadieron liposomas a las células en concentraciones de entre 50 pM y 50 nM, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC₅₀ como en los ejemplos anteriores. Además, se determinó la IC₅₀ para los liposomas que llevaban el ARNip inactivo (SCR) y se determinó la relación entre IC₅₀ (SCR) e IC₅₀ (PLK1). Un valor elevado para este parámetro indica una inhibición muy específica de la viabilidad celular por el ARNip PLK1, bajos efectos inespecíficos a los que contribuyó el soporte y bajos niveles de citotoxicidad en general.

Tabla 14: resultados de transfección para liposomas de SAINT-18, CHEMS y colesterol

anión de lípido CHEMS, sin suero									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	2,2	sin efto.	1,7	33,9	17,8	7,2	4,1	2,7
	40% Col	7,8	sin efto.	1,5	32,0	7,2	4,4	2,1	6,4
SCR	20% Col	sin efto.	sin efto.	11,9	sin efto.	37,4	19,6	20,7	29,0
	40% Col	sin efto.	16,9	18,6	28,0				
SCR/PLK-1	20% Col	>22,7		7,2	>1,5	2,1	2,7	5,0	10,6
	40% Col	>6,4		>32,5	>1,6	>7,0	3,9	8,7	4,4
anión de lípido CHEMS, más suero de ratón									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	sin efto.	sin efto.	14,4	sin efto.	sin efto.	sin efto.	sin efto.	31,7
	40% Col	sin efto.	35,5	23,1					
SCR	20% Col	sin efto.							
	40% Col	sin efto.	41,5	38,1					
SCR/PLK-1	20% Col			>3,5					>1,6
	40% Col							1,2	1,6

Tabla 15: resultados de transfección para liposomas de SAINT-18, DMGS y colesterol

anión de lípido DMGS, sin suero									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	0,8	2,3	1,7	43,6	24,3	7,5	5,2	3,8
	40% Col	1,6	2,3	1,8	2,2	11,4	8,9	3,8	5,8
SCR	20% Col	7,7	8,2	5,3	36,0	28,1	27,6	10,5	10,3
	40% Col	4,7	sin efto.	22,6	5,7	27,7	28,5	8,1	8,2
SCR/PLK-1	20% Col	9,2	3,6	3,1	0,8	1,2	3,7	2,0	2,7
	40% Col	2,9	>22,1	12,6	2,5	2,4	3,2	2,1	1,4
anión de lípido DMGS; más suero de ratón									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	4,0	8,0	2,7	sin efto.	26,5	28,8	sin efto.	sin efto.
	40% Col	2,0	2,2	1,6	1,6	sin efto.	21,0	sin efto.	sin efto.
SCR	20% Col	10,1	sin efto.	23,4	sin efto.	29,1	31,2	25,7	28,4
	40% Col	7,7	18,0	25,8	6,3	28,0	37,4	31,7	25,7

SCR/PLK-1	20% Col	2,5	>6,2	8,6		1,1	1,1		
	40% Col	3,9	8,0	16,5	3,9		1,8		

Tabla 16: resultados de transfección para liposomas de SAINT-18, DOGS y colesterol

anión de lípido DOGS, sin suero									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	36,9	38,0	sin efto.	sin efto.	9,2	8,1	7,0	6,1
	40% Col	6,9	19,4	sin efto.	sin efto.	22,7	8,7	6,6	8,5
SCR	20% Col	sin efto.	sin efto.	sin efto.	sin efto.	27,5	20,5	10,2	25,9
	40% Col	sin efto.							
SCR/PLK-1	20% Col	>1,4	>1,3			3,0	2,5	1,5	4,3
	40% Col	>7,3	>2,6			>2,2	>5,7	>7,6	>5,9
anión de lípido DOGS, más suero									
	relación C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK-1	20% Col	2,2	18,4	sin efto.	sin efto.	27,5	30,5	26,3	28,1
	40% Col	2,7	7,7	sin efto.	sin efto.	27,4	29,2	30,4	30,8
SCR	20% Col	2,8	sin efto.	sin efto.	sin efto.	32,6	34,4	30,9	33,2
	40% Col	sin efto.	8,2	sin efto.	sin efto.	30,6	sin efto.	sin efto.	42,8
SCR/PLK-1	20% Col	1,3	>2,7			1,2	1,1	1,2	1,2
	40% Col	>18,6	1,1			1,1	>1,7	>1,6	1,4

5 Como queda claro a partir de los datos de las tablas 14 a 16, un gran número de liposomas anfóteros facilita la transfección de células incluso en presencia de suero de ratón. Son especialmente útiles los liposomas que comprenden SAINT-18 en combinación con los diacilgliceroles DMGS y DOGS, mientras que la combinación con CHEMS fue eficaz sólo a C/A = 0,67. En cuanto a las combinaciones PONA, las construcciones anfóteras transfectan las células con alta especificidad, mientras que las composiciones que tienen C/A > 1 no proporcionan una transfección muy específica tal como se indica por SCR/PLK1 que es inferior a 2.

Otras realizaciones y usos de la invención serán evidentes para el experto en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y de la práctica de la invención desvelada en la presente memoria descriptiva. La memoria descriptiva y los ejemplos deben considerarse sólo como ilustrativos, y el alcance y el espíritu verdadero de la invención están indicados por las siguientes reivindicaciones.

Ejemplo 9 – Medidas de potencial zeta

9.1 Análisis del potencial zeta para liposomas formados a partir de PONA:CHEMS:CHOL

20 Se inyectaron 100 µl de una mezcla lipídica que comprendía el x% en moles de PONA, el y% en moles de CHEMS y el 20% en moles de colesterol (20 mM de concentración total de lípidos, disolvente: isopropanol) en 900 µl de un tampón que comprendía ácido acético 10 mM y ácido fosfórico 10 mM pH 4. X e Y, los porcentajes molares para PONA y CHEMS se ajustaron para producir las relaciones C/A de la tabla 17. Se sometió la suspensión inmediatamente a mezcla vorticial y se añadieron 3 mL de un tampón de ajuste de pH. Los tampones se seleccionaron entre el grupo de: ácido acético 50 mM y ácido fosfórico 50 mM, ajustado a pH 4, 5, 6,5 ó 7,5 usando NaOH o Na₂HPO₄ 50 mM/acetato de sodio 50 mM pH 9,4. Se registró el pH de la mezcla y se suministra en la tabla 17 mostrada a continuación junto con los potenciales zeta de las partículas de lípidos resultantes que se sometieron a monitorización usando un Zetasizer HSA3000.

Tabla 17: Potenciales zeta para partículas de lípidos de PONA:CHEMS:CHOL

relación C/A	0,5	0,67	0,82	1,00	1,22	1,5	2,00
pH final							
7,56	-54,40	-58,90	-58,20	-61,80	-21,80	22,60	#NV
7,20	-48,47	-46,00	-44,90	-50,00	-21,10	14,97	#NV
6,32	-44,33	-37,07	-31,37	0,64	23,43	9,60	#NV
4,84	19,67	18,00	22,15	31,80	32,77	32,57	28,37
relación C/A	0,5	0,67	0,82	1,00	1,22	1,5	2,00

pH final							
3,93	35,53	41,73	43,75	46,63	46,20	43,40	43,23

Claramente, las partículas muestran carácter anfótero incluso para mezclas que tienen una C/A de 1,22, es decir, mayor que 1. Las partículas que tienen una C/A de 0,67, 0,82 ó 1 también se produjeron a pH 7,4 y posteriormente se expusieron a pH inferior. No se apreciaron cambios aparentes en los potenciales zeta mostrados en la tabla 17.

5

9.2 Medidas de potencial zeta para combinaciones en las que DOPA es el lípido aniónico

También se prepararon partículas de lípidos a partir de mezclas binarias de GUADACA y DOPA, una combinación imino/fosfato de grupos principales de lípidos. Las partículas se prepararon de la misma forma que se describe en

10 9.1 y se registraron los potenciales zeta de tabla 18 para mezclas que tenían diferentes relaciones C/A:

Tabla 18: Potenciales zeta para partículas de lípidos de GUADACA:DOPA

C/A	0,65	0,75	0,98	1,16	1,4
pH final					
4,5	21	13	38	46	51
5,32	-24	22	20	33	35
6,25	-8	-45	-30	2	24
7,02	-61	-67	-8	-56	-6
7,81	-67	-78	-76	-65	-21

15 Al igual que con las partículas obtenidas en 9.1, también se obtienen partículas con carácter anfótero con C/A >1. Aun así, la desviación en el punto isoeléctrico sigue lo esperado.

9.3 Medidas de potencial zeta para DOTAP:CHEMS:CHOL

20 Para comparación, se realizaron las mismas medidas con mezclas de lípidos en los que PONA se sustituyó por DOTAP. Los resultados se muestran en la tabla 19. A diferencia de PONA:CHEMS, las partículas anfóteras de DOTAP:CHEMS sólo se encuentran en C/A < 1.

Tabla 19: Potencial zeta para partículas de lípidos de DOTAP:CHEMS:CHOL

25

Relación C/A	0,67	0,82	1	1,22
pH final				
7,56	-37,7	-29,63	4,9	13,25
7,20	-50,17	-24,1	#NV	12,55
6,32	#NV	#NV	11,43	7,37
4,84	25,6	32,1	20,27	9,3
3,93	52,13	43,93	47,77	12,15

Ejemplo 10 - Síntesis de CHOLGUA

30 Se disolvieron 25 g cloroformiato de colesterol y 50 equivalentes (eq.) de etilendiamina en diclorometano y se dejó que reaccionaran durante 6 h a 20°C. Se aisló el aminoetilcarbamoil-colestererol usando cromatografía y cristalización. El rendimiento fue de 28,7 g, pureza 90%.

35 Se sintetizó CHOLGUA a partir del aminoetilcarbamoil-colesterol aislado antes. Se incubaron 30 g de la sustancia con 1,5 eq. de clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamidinio y 4 eq. de N,N-diisopropiletilamina en diclorometano/etanol durante 16 h a 20°C, después de lo cual se aisló el producto por cromatografía. La pureza fue del 95%. Rendimiento 16,5 g.

Ejemplo 11 - Síntesis de DACA, PDACA y MPDACA

40 Se hicieron reaccionar 42,4 g de alcohol oleílico, 2,5 eq. de diisopropilazodicarboxilato, 2,5 eq. de trifenilfosfina y 5 eq. de Lil en tetrahidrofurano (THF) durante 24 h a 20°C. Se aisló el yoduro de oleílo por cromatografía con una pureza del 90%, el rendimiento fue de 13,4 g.

45 En una segunda etapa, se mezclaron 10 g de ácido oleico con 2,2 eq. de diisopropilamida de litio en THF durante 0,5 h a 20°C, después de lo cual se añadió 1 eq. de yoduro de oleílo. Se incubó la mezcla durante 2 h a 20°C y se

purificó DACA a partir de la mezcla de reacción usando cromatografía. La pureza fue del 95%, rendimiento 14,96 g.

Para la síntesis de PDACA, se mezclaron 2 g de DACA, 1,2 eq. de 4-picolilamina, 1,4 eq. de tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio y 4 eq. de N-metilmorfolina en THF durante 24 h a 20°C. Se purificó la
5 mezcla de reacción incluyendo cromatografía. La pureza de PDACA fue del 95%, el rendimiento fue de 1,72 g.

Para la síntesis de MPDACA, se disolvieron 2 g de PDACA en THF junto con 2 eq. de dimetilsulfato y se incubó la mezcla durante 16 h a 20°C, después de lo cual se purificó MPDACA por cromatografía. Pureza de MPDACA: 95%,
rendimiento: 1,71 g

10

Ejemplo 12 - Síntesis de GUADACA

En una primera etapa, se disolvieron 3,5 g DACA y 1,5 eq. de 1,1'-carbonildiimidazol en diclorometano y se incubó durante 16 h a 20°C, después de lo cual se añadieron 30 eq. de etilendiamina. Se incubó la mezcla de reacción
15 durante 4 h a 20°C después de lo cual se purificó aminoetil-DACA incluyendo cromatografía. La pureza fue del 90%, rendimiento 3,2 g.

Se sintetizó GUADACA a partir de aminoetil-DACA y para eso, se incubaron 3,2 g de aminoetil-DACA, 2,5 eq. de clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamida y 12 eq. de N,N-diisopropiletilamina durante 3 h a 20 °C, después de lo
20 cual se aisló GUADACA. Pureza: 95%, rendimiento: 2,24 g.

Ejemplo 13 - Síntesis de BADACA

Se sintetizó BADACA a partir de DACA de acuerdo con el siguiente procedimiento: se mezclaron 4,15 g DACA, 1,2
25 eq. de p-aminobenzamida, 1,2 eq. de N,N'-diclohexilcarbodiimida y 3 eq. de 4-dimetilaminopiridina en dimetilformamida en seco y se incubó durante 16 h a 70°C. Se aisló BADACA a partir de la reacción usando cromatografía. Pureza: 95%, rendimiento: 1,62 g

Ejemplo 14 - Transfección resistente al suero de DACA o lípidos basados en colesterol catiónicos en combinación con lípidos carboxílicos

Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones modificadas sistemáticamente entre los componentes de lípidos catiónicos y aniónicos y se cargaron con ARNip como en el Ejemplo 5. Los componentes de lípidos catiónicos fueron CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, TC-CHOL, GUADACA, MPDACA, BADACA y PDACA. Los lípidos aniónicos
35 fueron CHEMS, DMGS o DOGS y el contenido en colesterol fue del 20 o el 40% en moles, todas las mezclas de lípidos se identifican en las tablas de datos. A los liposomas que tenían una relación de lípido catiónico:aniónico de 1 o superior (C/A \geq 1) se les suministró adicionalmente el 1,5% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats).

Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadió suero de ratón (SIGMA-Aldrich)
40 directamente a las células durante 120 min. A continuación, se añadieron los liposomas a las células, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. Las máximas concentraciones de liposomas fueron 40 nM y 36 nM para experimentos en ausencia o presencia de suero de ratón, respectivamente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC_{50} (en ARNip nM) como en el Ejemplo
45 5. Todos los resultados de este experimento de cribado se muestran en las figuras 1 a 6.

Muchas de las mezclas transfectantes produjeron una transfección muy potente de células HeLa con ARNip, tal como indican los valores muy bajos de IC_{50} . Las combinaciones de lípidos que comprenden lípidos imino tales como CHOLGUA, pero más MPDACA, GUADACA o PONA, siguen siendo potentes transfectantes incluso en presencia de
50 suero de ratón.

Ejemplo 15 - Transfección resistente al suero de varios lípidos catiónicos en combinación con lípido de fosfato

Se produjeron series de liposomas que tenían relaciones C/A de 0,75 ó 1 y se cargaron con ARNip como en el
55 Ejemplo 5. Los componentes de lípidos catiónicos fueron CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, GUADACA, MPDACA, BADACA, PONA, DOTAP o DODAP. El lípido aniónico fue DOPA y el contenido en colesterol fue del 40% en moles, todas las mezclas de lípidos se identifican en la tabla 20. A los liposomas se les suministró adicionalmente el 1,5% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats).

60 Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadió suero de ratón (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. A continuación, se añadieron los liposomas a las células, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección

se expresa en este caso como IC₅₀ (en nM de ARNip) como en el Ejemplo 5.

Muchas de las mezclas transfectantes produjeron una transfección muy potente de células HeLa con ARNip, tal como indican los muy bajos valores de IC₅₀. Las combinaciones de lípidos que comprenden lípidos imino tales como CHOLGUA, pero más MPDACA, GUADACA o PONA, siguen siendo potentes transfectantes incluso en presencia de suero de ratón.

10 Tabla 20: Valores de IC₅₀ (ARNip nM) para varios liposomas en presencia y ausencia de suero de ratón. Inhibición sérica "no potente" se refiere a falta de potencia mínima en presencia de suero de ratón, en estos casos el factor de inhibición no puede ser definido. La máxima concentración de ARNip en la prueba fue de 146 nM.

C/A	Cación	- suero de ratón		+ suero de ratón		inhibición sérica
		PLK1 IC ₅₀	Scr. IC ₅₀	PLK1 IC ₅₀	Scr. IC ₅₀	
0,75	CholGUA	8	160	104	146	12
	CHIM	26	160	146	146	no potente
	DC-Chol	28	160	146	146	no potente
	MPDACA	5	67	10	146	2
	GUADACA	6	39	26	146	4
	BADACA	159	160	146	146	no potente
	PONA	6	24	146	146	no potente
	DOTAP	21	152	146	146	no potente
	DODAP	160	160	146	146	no potente
1	CholGUA	9	141	128	146	14
	CHIM	33	160	146	146	no potente
	DC-Chol	29	160	146	146	no potente
	MPDACA	12	100	4	146	0,3
	GUADACA	9	89	7	146	1
	BADACA	38	160	146	146	no potente
	PONA	2	66	21	146	10
	DOTAP	13	160	76	146	6
	DODAP	94	160	146	146	no potente

Ejemplo 16 – La transfección resistente al suero es baja en ausencia de lípidos con carga negativa.

15 Se produjo una serie de liposomas a partir de lípidos catiónicos y colesterol como un lípido neutro. No se usaron lípidos aniónicos en estas preparaciones. Los componentes de lípidos catiónicos fueron CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, ADACA, GUADACA, MPDACA, BADACA, PONA, DOTAP y DODAP y los liposomas se produjeron con el procedimiento descrito en el ejemplo 5. El contenido en colesterol fue del 40% en moles y a los liposomas se les suministró adicionalmente el 1,5% en moles de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar la formación de agregados en presencia de ARNip.

20 Se cultivaron y se mantuvieron las células HeLa como en el Ejemplo 2 y se añadió suero de ratón (SIGMA-Aldrich) directamente a las células durante 120 min. A continuación, se añadieron los liposomas a las células, se continuó con la incubación durante 72 h y se determinó la viabilidad celular como anteriormente. La eficacia de transfección se expresa en este caso como IC₅₀ (en nM de ARNip) como en el Ejemplo 5.

30 Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21 a continuación. En todos los casos, la eficacia de la transfección es sustancialmente menor que la de las mezclas que comprenden además un lípido aniónico. Con la excepción de GUADACA o PONA, no hubo actividad detectable en presencia de suero de ratón.

35 Tabla 21: Valores de IC₅₀ (ARNip nM) para varios liposomas en presencia y ausencia de suero de ratón. Inhibición sérica "no potente" se refiere a falta de potencia mínima en presencia de suero de ratón, en estos casos el factor de inhibición no puede ser definido. La máxima concentración de ARNip en la prueba fue de 160 ó 146 nM en ausencia o presencia de suero de ratón, respectivamente.

Cación	sin suero de ratón		con suero de ratón		inhibición sérica
	PLK1 IC ₅₀	Scr. IC ₅₀	PLK1 IC ₅₀	Scr. IC ₅₀	
CholGUA	93	160	146	146	no potente
CHIM	160	160	146	146	no potente
DC-Chol	101	109	146	146	no potente
MPDACA	27	154	146	146	no potente

ES 2 527 220 T3

GUADACA	22	69	95	146	4
BADACA	99	160	146	146	no potente
PONA	30	100	70	99	2
DOTAP	160	160	146	146	no potente
DODAP	160	160	146	146	no potente

REIVINDICACIONES

1. Complejos lipídicos que comprenden anfífilos aniónicos y catiónicos; en los que al menos una parte de los anfífilos catiónicos son lípidos imino que están cargados sustancialmente en condiciones fisiológicas, y en los que los anfífilos aniónicos son lípidos de carboxilo o fosfato y en los que además la relación de carga entre los anfífilos catiónicos y aniónicos es < 1 .
2. Complejos lipídicos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que al menos una parte de los anfífilos aniónicos son lípidos carboxílicos.
3. Complejos lipídicos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprenden una combinación de lípidos, en los que los lípidos catiónicos de dicha combinación comprenden una fracción guanido y los lípidos aniónicos de dicha combinación comprenden un grupo carboxilo, **caracterizados porque** además la relación entre las fracciones guanido y los grupos carboxilo es < 1 .
4. Complejos lipídicos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que al menos una parte de los anfífilos aniónicos son lípidos de fosfato.
5. Complejos lipídicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados porque** además los grupos imino cargados de los anfífilos catiónicos tienen un pK de más de 7,5 y se seleccionan entre iminas, amidinas, piridinas, 2-aminopiridinas, bases de nitrógeno heterocíclicas, fracciones guanido, isoureas y tioisoureas.
6. Complejos lipídicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que los anfífilos catiónicos se seleccionan entre el grupo que comprende las estructuras de I1 a I113, las estructuras A1 a A21 o las estructuras L1 a L17, en los que los miembros de dicho grupo se seleccionan además de acuerdo con un pK superior a 7,5.
7. Complejos lipídicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque** además los lípidos catiónicos se seleccionan entre el grupo de PONA, CHOLGUA, GUADACA, MPDACA y SAINT-18.
8. Complejos lipídicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque** además los lípidos aniónicos se seleccionan entre el grupo de CHEMS, DMGS, DOGS, DOPA y POPA.
9. Complejos lipídicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque** además dichos complejos tienen una relación de carga de los lípidos catiónicos y aniónicos de entre 0,5 y < 1 .
10. Complejos lipídicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizados porque** además dichos complejos son liposomas.
11. Liposomas de acuerdo con la reivindicación 10, que comprenden además (a) un lípido neutro o zwitteriano seleccionado entre colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y mezclas de los mismos, o (b) lípidos PEG.
12. Liposomas de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizados porque** además el lípido neutro es colesterol y la fracción molar de colesterol en la mezcla de lípidos se encuentra entre el 10 y el 50% en moles, o **porque** los lípidos PEG están situados en la hoja de membrana más externa.
13. Liposomas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones a 12, que comprenden además un oligonucleótido.
14. Liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, en los que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido señuelo, un oligonucleótido antisentido, un ARNip, un agente que influye en la transcripción, una ribozima, una ADNzima o un aptámero.
15. Liposomas de acuerdo con la reivindicación 14, en los que dichos oligonucleótidos comprenden nucleósidos modificados tales como ADN, ARN, ANB, ANP, ARN 2'OMe, ARN 2'MOE, ARN 2'F en sus formas de fosfodiéster o fosfotioato.

16. Uso de los liposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para la transfección de células *in vitro* o *ex vivo*.

17. Un aerosol que comprende liposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para su uso en la transfección de células pulmonares.

Figura 1

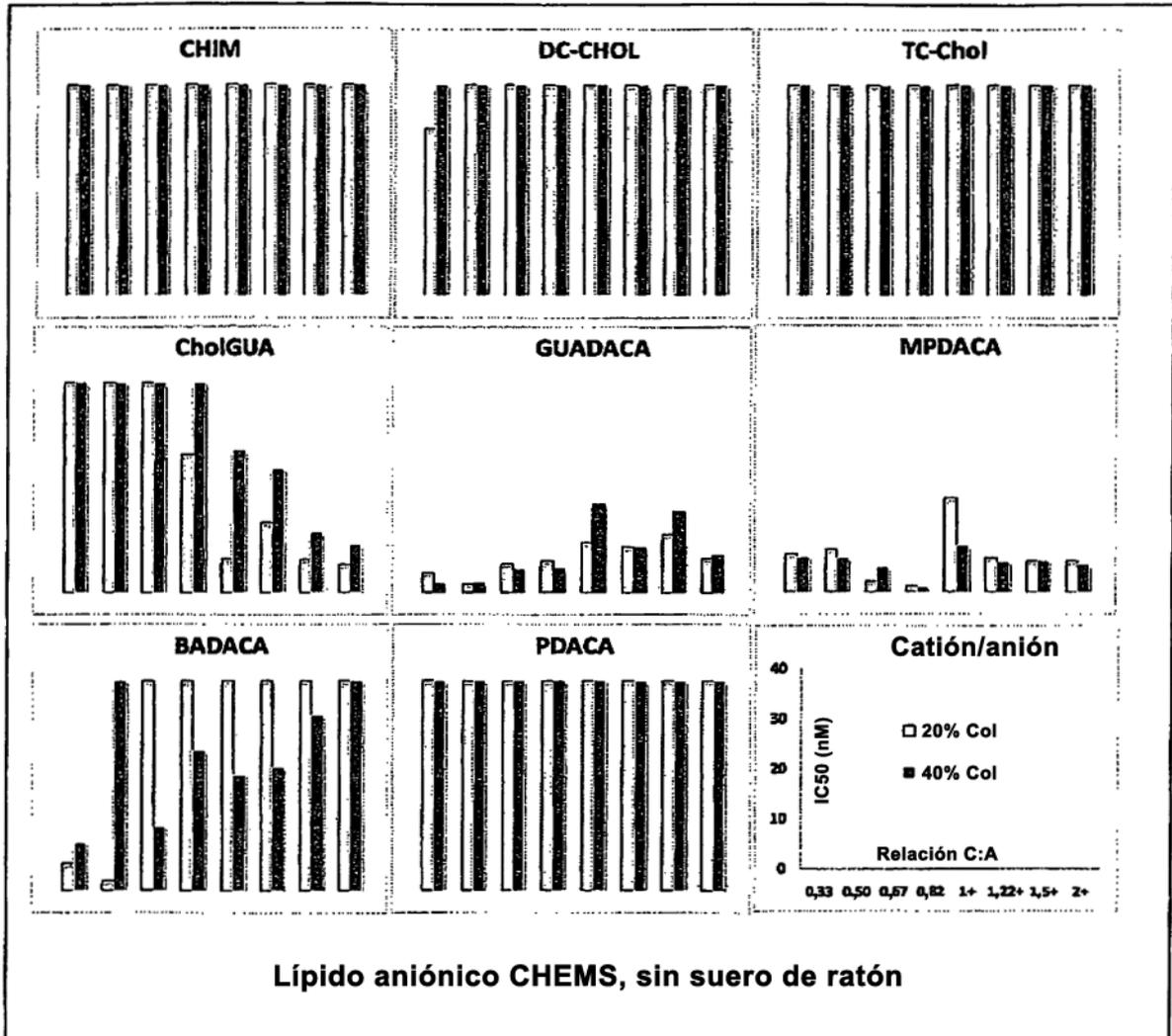


Figura 2

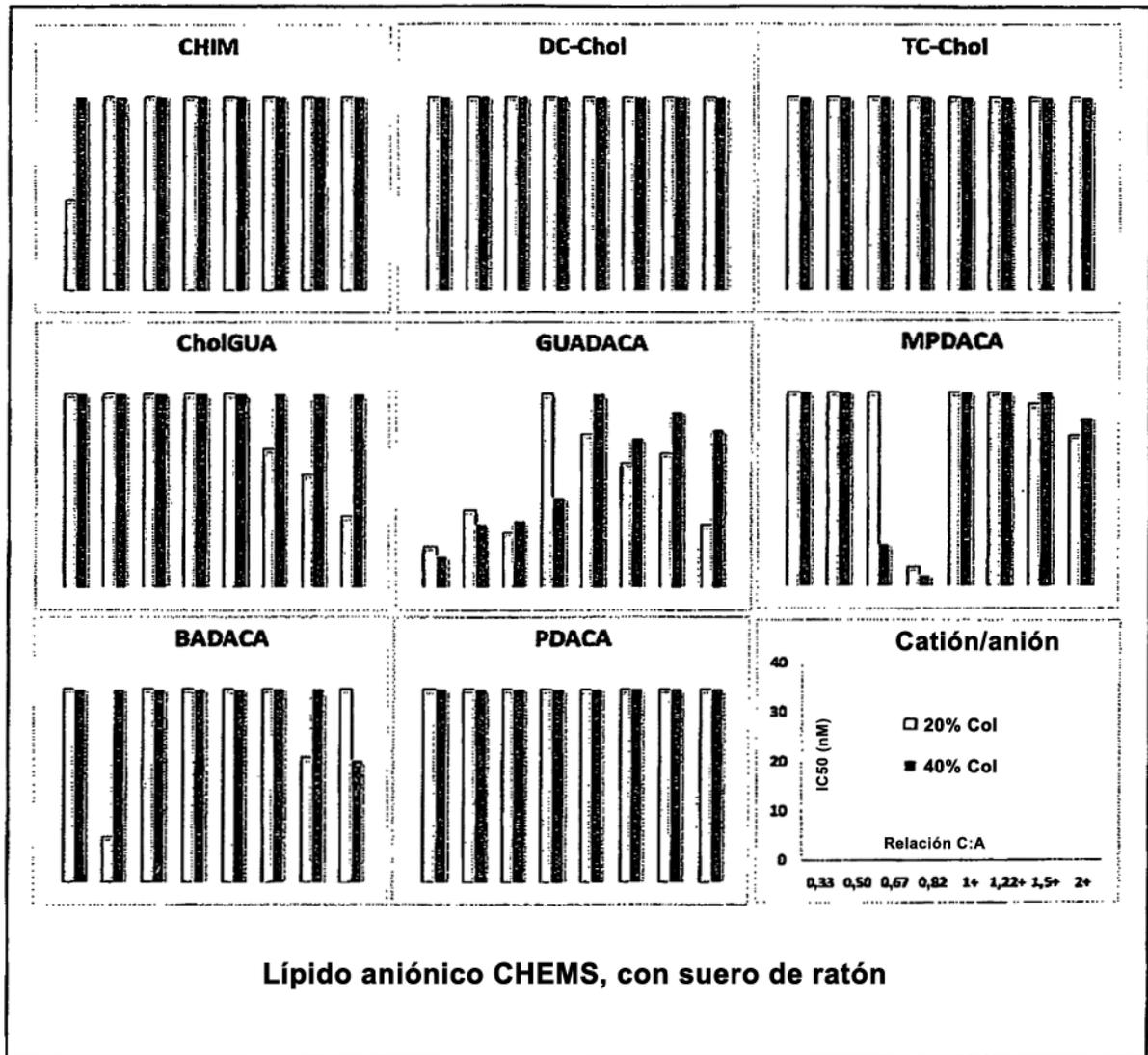


Figura 3

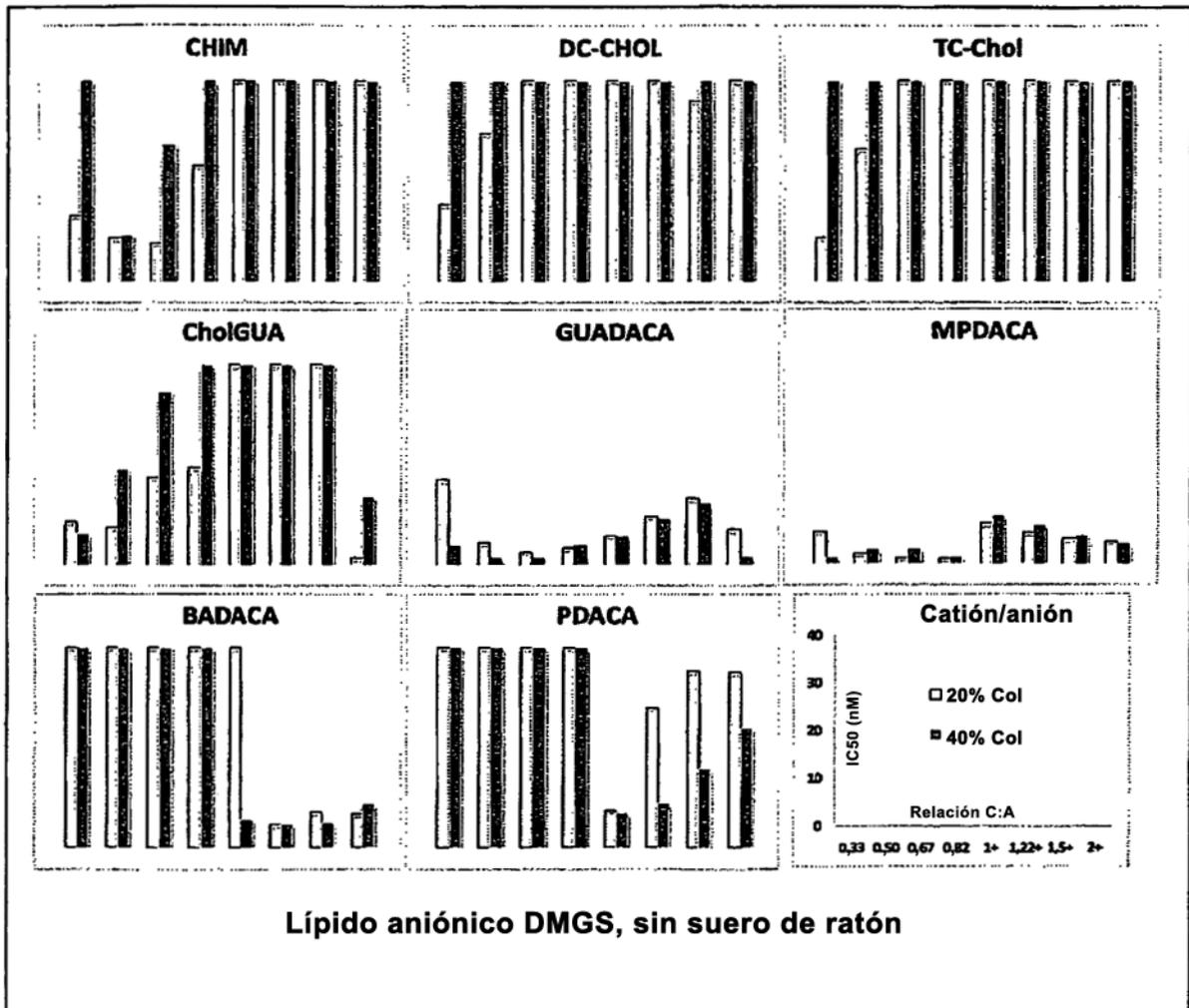


Figura 4

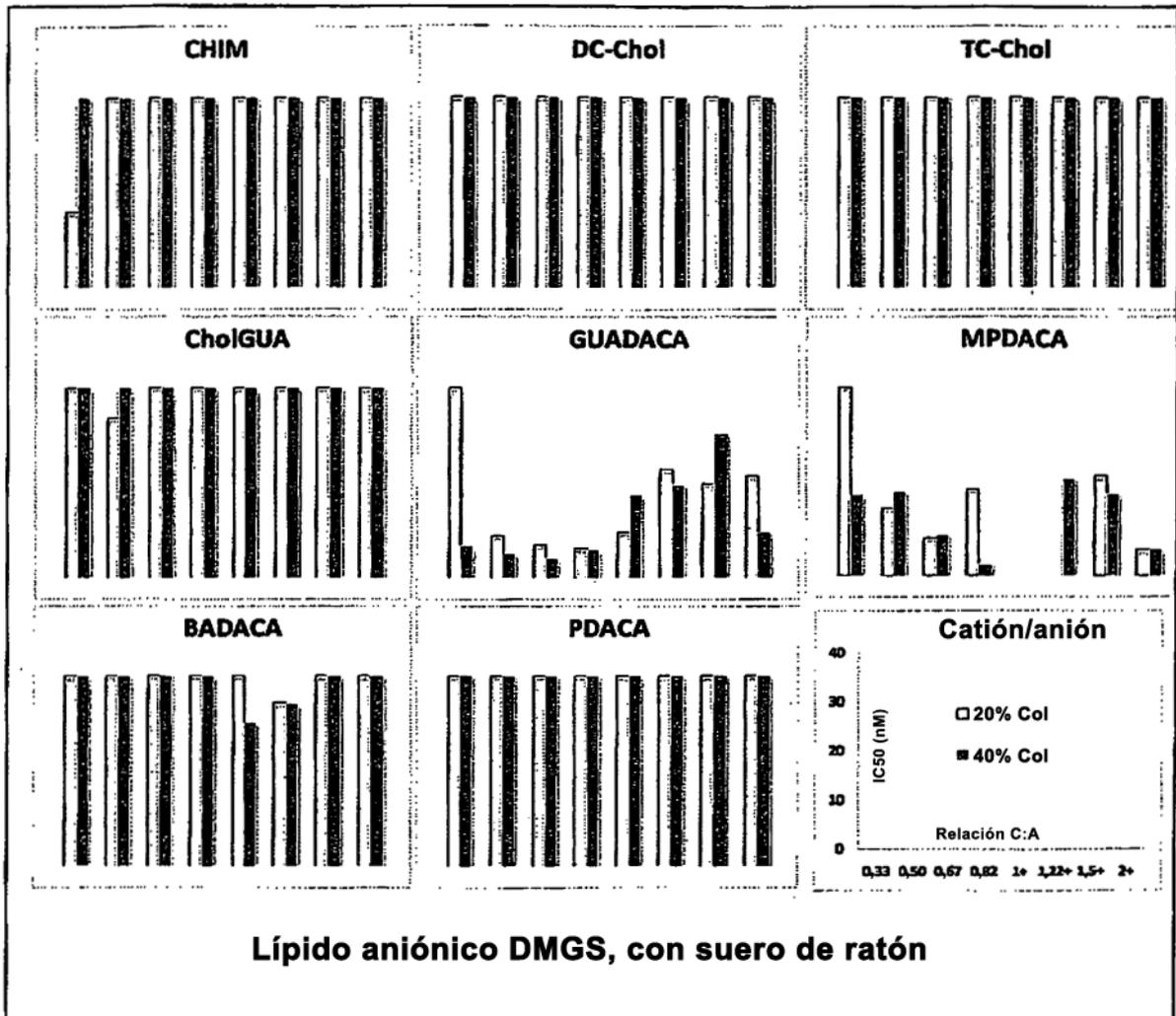


Figura 5

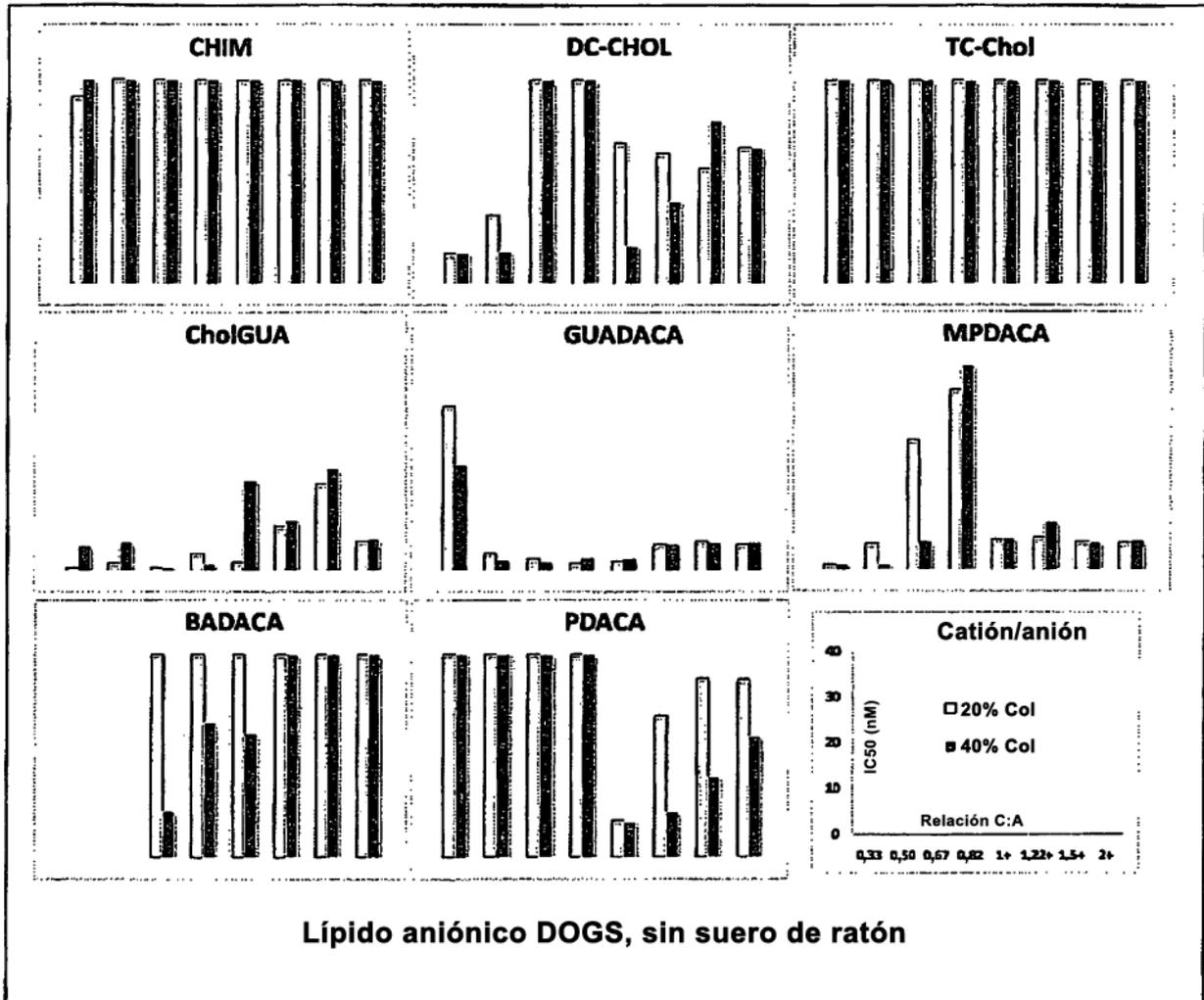


Figura 6

