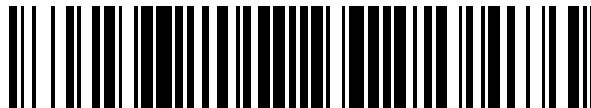


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 515**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2005** **E 05822677 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 1830888**

54 Título: **Complejos lipídicos recubiertos con PEG y su uso**

30 Prioridad:

**27.12.2004 EP 04030846**

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

**19.10.2015**

73 Titular/es:

**SILENCE THERAPEUTICS GMBH (100.0%)**  
**Robert-Rössle-Strasse 10**  
**13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**KEIL, OLIVER y**  
**KAUFMANN, JÖRG**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 548 515 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

Complejos lipídicos recubiertos con PEG y su uso.

La presente invención está relacionada con lípidos catiónicos, composiciones que contienen los mismos y el uso de los mismos, así como un método para transferir los compuestos químicos a las células.

5 Tanto la biología molecular, así como la medicina molecular en gran medida dependen de la introducción de compuestos biológicamente activos en las células. Tales compuestos biológicamente activos comprenden por lo general, entre otros, ADN, ARN, así como péptidos y proteínas, respectivamente. La barrera que hay que superar es por lo general una bicapa lipídica que tiene una superficie exterior cargada negativamente. En la técnica, se ha desarrollado una serie de tecnologías para penetrar la membrana celular y para introducir por lo tanto los compuestos biológicamente  
10 activos. Algunos métodos concebidos para uso en laboratorio, sin embargo, no se pueden utilizar en el campo médico y más particularmente no son apropiados para la administración de fármacos. Por ejemplo, los métodos de electroporación y balísticos conocidos en la técnica, que, en todo caso, sólo permiten una administración local de compuestos biológicamente activos. Aparte de dichas membranas celulares de bicapa lipídica comprenden también sistemas de transporte. De acuerdo con lo anterior, se realizaron esfuerzos para utilizar este tipo de sistemas de  
15 transporte con el fin de transferir los compuestos biológicamente activos a través de la membrana celular. Sin embargo, debido a la especificidad o la reactividad cruzada de tales sistemas de transporte, su uso no es un método de aplicación general.

20 Un enfoque de aplicación más general descrito en la técnica para la transferencia de compuestos biológicamente activos en las células, es el uso de vectores virales. Sin embargo, los vectores virales pueden ser utilizados sólo para la transferencia de genes eficientemente en algunos tipos de células; pero no pueden ser utilizados para introducir moléculas de síntesis química en las células.

25 Un enfoque alternativo fue el uso de los llamados liposomas (Bangham, J. Mol. Biol. 13, 238-252). Los liposomas son vesículas que se generan en asociación de lípidos anfífilos en agua. Los liposomas comprenden por lo general bicapas de fosfolípidos dispuestas concéntricamente. Dependiendo del número de capas los mismos liposomas se pueden clasificar como pequeñas vesículas unilamelares, vesículas multilamelares y grandes vesículas multilamelares. Se ha demostrado que los liposomas son eficaces agentes de suministro, ya que permiten incorporar compuestos hidrófilos en las capas intermedias acuosas, mientras que los compuestos hidrófobos se incorporan en las capas de lípidos. Es bien conocido en la técnica que tanto la composición de la formulación de lípidos, así como su método de preparación tienen un efecto sobre la estructura y el tamaño de los agregados de lípidos resultantes y por lo tanto en los  
30 liposomas. También se sabe que los liposomas incorporan los lípidos catiónicos.

35 Los lípidos catiónicos, aparte de ser componentes de liposomas, también han atraído una considerable atención, ya que pueden ser utilizados como tales para la administración celular de biopolímeros. Utilizando lípidos catiónicos, cualquier compuesto aniónico se puede encapsular esencialmente de una manera cuantitativa debido a la interacción electrostática. Además, se cree que los lípidos catiónicos interactúan con las membranas celulares cargadas negativamente que inician el transporte de la membrana celular. Se ha encontrado que el uso de una formulación liposómica puesto que contiene lípidos catiónicos o el uso de lípidos catiónicos como tales junto con un compuesto biológicamente activo requiere un enfoque heurístico puesto que formulación es de uso limitado, ya que normalmente puede administrarse plásmidos en algunos pero no todos los tipos de células, por lo general en ausencia de suero.

40 Las relaciones de carga y/o masa de los lípidos y los compuestos biológicamente activos para ser transportados por ellos han resultado ser un factor crucial en la administración de diferentes tipos de dichos compuestos biológicamente activos. Por ejemplo, se ha demostrado que las formulaciones lipídicas apropiadas para la administración de plásmidos que comprenden 5,000 a 10,000 bases de tamaño, por lo general no son eficaces para la administración de oligonucleótidos tales como ribozimas sintéticas o moléculas antisentido que comprenden por lo general aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases. Además, recientemente se ha indicado que las condiciones de  
45 administración óptimas para oligonucleótidos antisentido y ribozimas son diferentes, incluso en el mismo tipo de célula.

La Patente de los Estados Unidos 6,395,713 revela composiciones basadas en lípidos catiónicos que por lo general consisten en un grupo lipófilo, un enlazante y un grupo de cabeza y el uso de tales composiciones para la transferencia de compuestos biológicamente activos en una célula.

50 La Solicitud de Patente Internacional WO 99/04819 revela una composición liposómica para la administración de un catalizador de ácido nucleico, en donde la composición comprende un conjugado polietileno (PEG)-ceramida, un lípido y un catalizador de ácido nucleico.

La Solicitud de Patente Internacional WO 96/10392 revela un liposoma fusogénico que comprende un lípido capaz de adoptar una fase no laminar, si bien, capaz de asumir una estructura bicapa en presencia de una componente de

estabilización bicapa; y un componente de estabilización bicapa reversiblemente asociado con el lípido para estabilizar el lípido en una estructura de bicapa.

5 La Solicitud de Patente Internacional WO 01/05374 revela partículas de un agente terapéutico encapsulado-lípido totalmente de un agente terapéutico cargado, en donde las partículas se preparan mediante la combinación de una composición de lípidos que contiene las vesículas de lípido preformadas, un agente terapéutico cargado, y un agente desestabilizante para formar una mezcla de vesículas preformadas y agente terapéutico en un solvente de desestabilización.

La Solicitud de Patente Internacional WO 02/34236, revela los vehículos de administración sistémica a base de lípidos y el método para dirigir selectivamente un agente activo a un tejido específico.

10 La Patente de los Estados Unidos 6,586,410 se relaciona con un método para introducir un ácido nucleico en una célula, en donde el método comprende poner en contacto dicha célula con una partícula de lípido-ácido nucleico que comprende un lípido catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas, y un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico en las partículas de lípido-ácido nucleico es resistente en solución acuosa a la degradación con una nucleasa.

15 La Solicitud de Patente Internacional WO 01/80900 revela los métodos para la administración de ácidos nucleicos a las células, en donde los métodos se basan en el hallazgo de que la presencia de desestabilizadores de membrana endosomal tales como el calcio conduce a un aumento en la eficiencia de la transfección de plásmidos formulados como partículas estabilizadas plásmido-lípido.

20 La Solicitud de Patente Internacional WO 2005/105152 revela un lípido catiónico y composiciones que contienen el lípido para la administración de ácidos nucleicos.

El problema subyacente a la presente invención era proporcionar un medio para introducir compuestos biológicamente activos en las células, preferiblemente células animales. Un problema adicional subyacente a la presente invención es proveer un agente de administración de ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos pequeños tales como ARNs, siNA y ARNi o aptámeros y espiegélmeros.

25 Incluso otro problema subyacente de la presente invención es proveer un agente de administración que tiene buenas características de transfección y de administración mientras que proporciona un tiempo de circulación in vivo más largo.

Estos problemas se resuelven por el contenido de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones adjuntas dependientes de la misma.

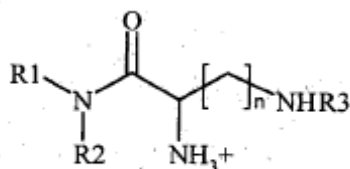
30 El problema subyacente de la presente invención también se resuelve en un primer aspecto mediante una composición de lípidos que comprende

al menos un primer componente lipídico,

al menos un primer lípido auxiliar, y

un compuesto protector que es extraíble de la composición de lípidos en condiciones in vivo,

por lo cual el primer componente lipídico es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I),



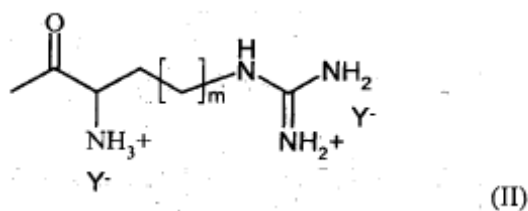
(I)

35

en donde R1 y R2 son cada uno y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo y alquenilo que contiene 8 a 30 átomos de carbono;

n es cualquier número entero entre 1 y 4;

R3 es un acilo seleccionado entre el grupo que consiste en lisil, ornitilo, 2,4-diaminobutirilo, histidilo y una fracción acilo de acuerdo con la fórmula (II),



- 5 en donde m es cualquier número entero de 1 a 3, en donde el NH<sub>3</sub><sup>+</sup> es opcionalmente ausente,
- y
- Y<sup>-</sup> es un anión farmacéuticamente aceptable,
- en donde el compuesto protector se selecciona del grupo que consiste en PEG, HEG, almidón polihidroxietilo (polyHES) y un polipropileno y en donde el compuesto protector está unido a una ceramida, en donde la ceramida comprende, como sustituyente, una cadena de carbono corta de 6 a 10 átomos de carbono y en donde la ceramida se une covalentemente al compuesto protector.
- 10 En una realización del primer aspecto de la cadena de carbono corta es una cadena de hidrocarburo, preferiblemente una cadena de hidrocarburo de 8 átomos de carbono
- En una realización del primer aspecto, el compuesto protector es PEG2000 o PEG5000.
- 15 En una realización del primer aspecto, la composición comprende un constituyente adicional y/o un segundo lípido auxiliar.
- En una realización del primer aspecto, la composición de lípidos comprende un ácido nucleico, por lo cual dicho ácido nucleico es preferiblemente el constituyente adicional.
- 20 En una realización preferida del primer aspecto, el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ARNi, ARNsi, siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espejélmeros.
- En una realización preferida del primer aspecto, el sustituyente ceramida de la ceramida se compone de una cadena de carbono corta de 8 átomos de carbono.
- En una realización del primer aspecto, la ceramida es el primer lípido auxiliar.
- En una realización alternativa del primer aspecto, la ceramida es el segundo lípido auxiliar.
- 25 En una realización preferida del primer aspecto, el compuesto protector comprende un enlazante sensible al pH o una fracción sensible al pH.
- En una realización preferida del primer aspecto, el enlazante o la fracción es un enlazante aniónico o una fracción aniónica.
- 30 En una realización más preferida del primer aspecto, el enlazante aniónico o fracción aniónica es menos aniónica o neutra en un ambiente ácido, por lo cual preferiblemente tal ambiente ácido es un endosoma.
- En una realización del primer aspecto el enlazante sensible al pH o la fracción sensible al pH es seleccionado entre el grupo que comprende oligo (ácido glutámico), oligofenolato (s) y dietileno
- En una realización preferida del primer aspecto R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno y se seleccionan independientemente del grupo que comprende laurilo, miristilo, palmitilo y oleilo.
- 35 En una realización más preferida del primer aspecto R<sub>1</sub> es laurilo y R<sub>2</sub> es miristilo; o

R<sub>1</sub> es palmitilo y R<sub>2</sub> es oleilo.

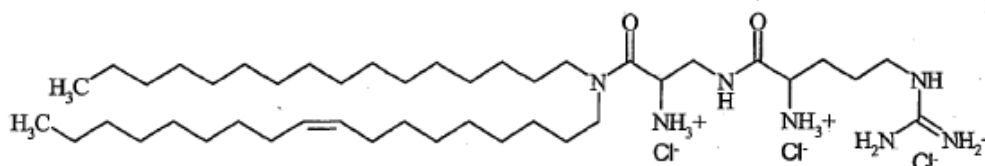
En una realización preferida del primer aspecto, m es 1 o 2.

En una realización más preferida del primer aspecto, el compuesto es un lípido catiónico, preferiblemente en asociación con un anión Y<sup>-</sup>.

- 5 En una realización más preferida del primer aspecto, Y<sup>-</sup> se selecciona del grupo que comprende halogenuros, acetato y trifluoroacetato.

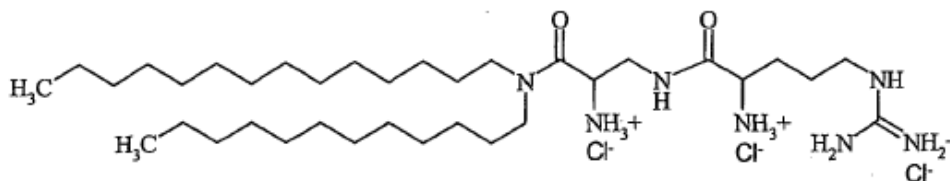
En una realización más preferida del primer aspecto, el compuesto se selecciona del grupo que comprende

- ácido β-arginil-2,3-diamino propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato



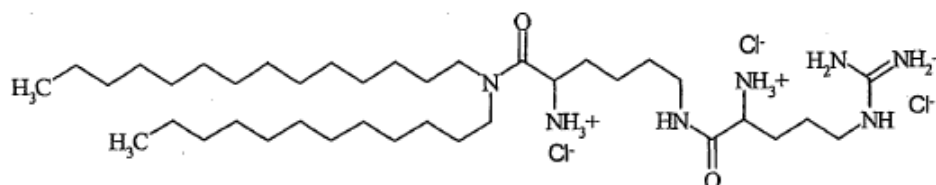
10

- ácido β-arginil-2,3-diamino propiónico-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato



y

- ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato



15

En una realización más preferida del primer aspecto, la composición comprende un portador.

- 20 El problema subyacente de la presente invención también se resuelve en un segundo aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto y un compuesto farmacéuticamente activo y preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización del segundo aspecto, el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.

En una realización preferida del segundo aspecto, la proteína es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

- 25 En una realización alternativa preferida el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN, PNA y LNA.

## ES 2 548 515 T3

- En una realización preferida del segundo aspecto el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, por lo cual preferiblemente el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende ARNi, ARNsi, siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegémeros.
- 5 En una realización del primer y segundo aspecto, el primer lípido auxiliar y/o el segundo lípido auxiliar se selecciona del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides, preferiblemente bajo la condición de que el primer y/o el segundo lípido auxiliar es diferente de una ceramida.
- En una realización preferida del primer y segundo aspecto, el primer y/o el segundo lípido auxiliar o componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que comprende 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- 10 En una realización más preferida del primer y el segundo aspecto, el contenido del componente lipídico auxiliar es de aproximadamente 20 % mol a aproximadamente 80% mol del contenido total de lípidos de la composición.
- En una realización aún más preferida del primer y el segundo aspecto, el contenido del componente lipídico auxiliar es de aproximadamente 35% mol a aproximadamente 65% mol.
- 15 En una realización del primer y segundo aspecto, el lípido es el ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diamino propionico-N-palmitil- N-oleil-amidtriclóridrato, y el lípido auxiliar es la 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- En una realización preferida del primer y el segundo aspecto, el lípido es 50% mol y el lípido auxiliar es 50% mol del contenido total de lípidos de la composición.
- En una realización del primer y segundo aspecto, la composición comprende además un segundo lípido auxiliar.
- 20 En una realización del primer y segundo aspecto, el primer y/o el segundo lípido auxiliar comprende un grupo que se selecciona del grupo que comprende una fracción PEG, una fracción HEG, una fracción de almidón polihidroxietilo (polyHES) y una fracción de polipropileno, por lo cual dicha fracción proporciona preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 10000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2000 a 5000 Da.
- En una realización preferida del primer y el segundo aspecto, el lípido auxiliar que comprende la fracción de PEG se selecciona entre el grupo que comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dialquil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- 25 En una realización más preferida del primer y segundo aspecto, la fracción de PEG del lípido auxiliar tiene un peso molecular de 2,000 a 5,000 Da, preferiblemente un peso molecular de 2,000 Da.
- En una realización aún más preferida del primer y el segundo aspecto, la composición comprende como el componente lipídico ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diamino propionico-N-palmitil-N-oleil-amida triclóridrato, como un primer lípido auxiliar 1,2 difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y como un segundo lípido auxiliar 1,2- difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000.
- 30 En una realización del primer y el segundo aspecto del contenido del segundo lípido auxiliar es de aproximadamente 0,05% mol a 4,9 % mol, preferiblemente aproximadamente 1 a 2% mol.
- En una realización del primer y segundo aspecto, la composición contiene de aproximadamente 1 a 10% mol, más preferiblemente de 1 a 7.5 % mol y más preferiblemente de 1 a 5% mol del conjugado de PEG y la ceramida.
- 35 En una realización del primer y el segundo aspecto el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico de doble hebra, en donde la composición comprende además un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional que es más preferiblemente un ácido ribonucleico de doble hebra y más preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende ARNi, ARNsi, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, por lo cual preferiblemente la relación molar de ARNi con el lípido catiónico es de aproximadamente 0 a 0.075, preferiblemente de aproximadamente 0.02 a 0.05 y aún más preferiblemente 0.037 .
- 40 En una realización del primer y segundo aspecto, el primer componente lipídico y/o al menos uno de los lípidos auxiliares y/o el compuesto protector está/están presentes como una dispersión en un medio acuoso.
- En una realización alternativa del primer y segundo aspecto, el primer componente lipídico y/o al menos uno de los lípidos auxiliares y/o el compuesto protector está/están presentes como una solución en un solvente miscible en agua, por lo cual preferiblemente el solvente se selecciona del grupo que comprende etanol y tert-butanol.
- 45

El problema subyacente de la presente invención también se resuelve en un tercer aspecto mediante el uso de una composición de acuerdo con el primer o el segundo aspecto para la fabricación de un medicamento.

El problema subyacente de la presente invención también se resuelve en un cuarto aspecto mediante el uso de una composición de acuerdo con el primer o el segundo aspecto como un agente de transferencia.

- 5 En una realización del cuarto aspecto, el agente de transferencia transfiere un componente farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional en una célula, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula humana.

El problema subyacente de la presente invención también se resuelve en un quinto aspecto mediante un método *in vitro* para la transferencia de un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional en una célula o a través

- 10 - proporcionar la célula o la membrana;  
 - proporcionar una composición de acuerdo con el primer o el segundo aspecto, el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional; y  
 - poner en contacto la célula o la membrana con la composición de acuerdo con el primer o el segundo aspecto.

En una realización del quinto aspecto, el procedimiento comprende como etapa adicional:

- 15 - detectar el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional en la célula y/o más allá de la membrana.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que una administración muy eficaz en aplicaciones *in vivo* de ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos pequeños tales como ARNi, ARNsi y siNA, se puede lograr mediante el uso de una composición de lípidos que comprende al menos un primer componente lipídico, al menos un primer lípido auxiliar y un compuesto protector. El compuesto protector provee un tiempo de circulación *in vivo* más larga y por lo tanto permite una mejor biodistribución del ácido nucleico que contiene la composición de lípidos. Por este mecanismo, es posible en los sitios diana dentro de un cuerpo humano o animal que están comparativamente a distancia desde el sitio de administración de tal composición de lípidos ya que la composición de lípidos no es absorbida inmediatamente por el tejido que rodea el sitio de inyección, por lo general el revestimiento endotelial de la vasculatura cuando se realiza una administración intravenosa. El compuesto protector como se usa en este documento es preferiblemente un compuesto que evita la interacción inmediata de la composición de lípidos con compuestos de suero o compuestos de otros fluidos corporales o membranas citoplasmáticas, preferiblemente membranas citoplasmáticas del revestimiento endotelial de la vasculatura en el que la composición de lípidos se administra preferiblemente. El término protector también significa que los elementos del sistema inmunitario no interactúan inmediatamente con la composición de lípidos de nuevo aumentando su tiempo de circulación en un organismo vivo. En la medida que, el compuesto protector actúa como un compuesto antiopsonizante. Sin pretender estar ligado por ningún mecanismo o teoría, parece que el compuesto protector forma una cubierta o capa que reduce el área superficial de la composición de lípidos disponible para la interacción con su ambiente, que de otro modo daría lugar a la composición de lípidos para fusionarse con otros lípidos o estar sujetos a factores del cuerpo humano y animal, respectivamente, en un momento en que es demasiado pronto para esta interacción, aunque hay que reconocer que en una etapa posterior, i.e. después de un tiempo prolongado después de la administración de la composición de lípidos, tal interacción se prefiere generalmente al menos en cierta medida con el fin de proporcionar la administración. Otro mecanismo en el cual la eficacia observada del compuesto protector parece basarse es la protección de la carga total de la composición de lípidos y, en particular, de la composición de lípidos que contiene un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional tal como se define en este documento y más preferiblemente una ARNsi, siNA y ARNi. Una vez más, la interacción de la composición de lípidos parece ser afectada, por lo cual surge el efecto de la protección de las cargas en lugar de la protección de los componentes lipídicos. En relación con la presente descripción, es necesario reconocer que una composición puede comprender tan solo un lípido.

45 El compuesto protector es preferiblemente un compuesto biológicamente inerte. Más preferiblemente, el compuesto protector no lleva ninguna carga en su superficie o en la molécula como tal. Los compuestos protectores son polietilenglicoles, polímeros basados en hidroxietilglucosa, almidón polihidroxietilo (polyHES) y polipropileno, por lo cual cualquiera de dichos compuestos preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a 10000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2000 a 5000 Da.

50 Es una característica importante de la presente invención es que el compuesto protector se pueda retirar de la composición de lípidos bajo condiciones *in vivo*. Tal eliminación expone los otros componentes de la composición de lípidos o parte del mismo al ambiente tal como el cuerpo humano y animal, y en última instancia permite la liberación y administración, respectivamente, de un compuesto tal como un ácido nucleico contenido en la composición de lípidos. El

término condiciones *in vivo* preferiblemente significa las condiciones existentes en un cuerpo animal o humano, preferiblemente en cualquier fluido corporal tal como sangre, intersticio y líquidos intracelulares, y/o los existentes en un endosoma y/o lisosoma. Dependiendo del diseño del compuesto protector, la eliminación se puede afectar de varias maneras, como se describirá con más detalle a continuación.

5 Un efecto adicional que surge de la pérdida del agente de protección, particularmente si el agente de protección es PEG, es debido al hecho de que la provisión de formulaciones de lípidos con PEG, que también se conoce como PEGilación, a menudo resulta en una administración funcional deteriorada de las moléculas de ácido nucleico que se administrarán por dicha formulación lipídica en el citoplasma. La presencia voluminosa del PEG en la formulación lipídica deteriora la absorción endosomal de los liposomas por lo general formados por el lípido. El compuesto protector se selecciona del grupo que consiste en PEG, HEG, almidón polihidroxietilo (polyHES) y polipropileno, que está unido, preferiblemente de forma covalente adjunta, a una ceramida. La ceramida interactúa con el compuesto lipídico y, si está presente, con un lípido auxiliar. En la medida que, la ceramida puede ser el primer lípido auxiliar o un segundo lípido auxiliar. Se prefiere que la ceramida conjugada con PEG es diferente del primer lípido auxiliar. La ceramida está incrustada en la fracción lipídica de la composición de lípidos preferiblemente formada por el primer componente lipídico y el primer lípido auxiliar y será liberado debido a la cadena de hidrocarburo relativamente corta a una cierta velocidad. Cuando la ceramida se libera, de esta manera, de la composición de lípidos, así también es el agente de protección. Por lo tanto, en esta realización, las condiciones *in vitro* permiten la desintegración de la formulación de lípidos y por lo tanto proveen un prolongado tiempo de vida o tiempo de circulación *in vivo* de la composición de lípidos.

20 Se revela que, el agente de protección está unido a un ácido nucleico contenido en la composición de lípidos o asociado con el mismo. Preferiblemente, el agente de protección está unido covalentemente al ácido nucleico, más preferiblemente a través de un enlazante. En una realización más preferida, el enlazante está diseñado de tal manera que se escinde en condiciones fisiológicas, i.e. condiciones que prevalecen en un organismo animal o humano. En una realización preferida sólo un cierto porcentaje del ácido nucleico en realidad se provee con tal polímero a través de un enlazante. Sin desear estar ligado por ninguna teoría, parece que es suficiente que sólo un cierto número de moléculas de ácido nucleico que forma parte de la composición de lípidos tiene que tener una dicha fracción voluminosa con el fin de proporcionar el efecto de protección a dicha composición de lípidos. Preferiblemente, la porción de moléculas de ácido nucleico oscila desde aproximadamente 0 a 20%, más preferiblemente de 3 a 10%, e incluso más preferiblemente de 6 a 10%. Contenidos preferidos de los ácidos nucleicos que tienen el agente de protección (que también se denomina en este documento como el compuesto protector) son de aproximadamente 0 a 3%, de 3 a 6%, de 6 a 10% y de 10 a 20%, por lo cual % como se utiliza en este párrafo y en toda la presente solicitud, si no se indica lo contrario, es % mol.

35 Tal enlazante puede ser un enlazante de ARN monocatenario, que comprende más preferiblemente de 1 a 20 nucleótidos que serán escindidos por la actividad de endonucleasa de ARN existente en o bajo condiciones *in vivo*. En una realización adicional, el enlazante está formado por un enlazante de ADN monocatenario que se escinde por el enlazante que consiste en un ácido nucleico, por lo general es de la siguiente manera: ssARN <dsARN, <ssADN <<dsADN. Tal variedad de estabilidad permite un diseño específico del tiempo residual del ácido nucleico modificado así y la composición de lípidos, respectivamente, que comprende dicho enlazante.

40 En una realización adicional, el enlazante puede estar formado por un oligopéptido, polipéptido o proteína que se escinde por las proteasas presentes en o bajo condiciones *in vivo*. Una realización adicional provee un enlazante que comprende un enlace S-S que es sensible a las condiciones redox.

45 En incluso una realización adicional, el enlazante es un enlazante sensible al pH. El concepto de un enlazante sensible al pH reside en la observación de que en la internalización de una composición de lípidos que puede, en principio, ser o bien un lipoplexo o un liposoma, cualquier agente de protección que es claramente ventajoso cuando se trata con la protección de la composición de lípidos antes de la internalización puede imponer una limitación de la utilización adicional de los compuestos así transferidos en la célula. Tal como se usa en este documento, el agente de protección está acoplado al enlazante sensible al pH que es o comprende en una realización preferida una fracción no iónica. En un ambiente ácido tal como un endosoma, se cambia la carga de dicha fracción aniónica. Debido a esto, también se cambia la interacción del enlazante sensible al pH con el lípido catiónico contenido en la formulación de lípidos sobre la base de la electrostática, por lo general reducida lo que se traduce en una liberación más o menos gradual del enlazante sensible al pH del lípido catiónico que comprende la formulación lipídica. Por consiguiente, el liposoma se vuelve carente del agente de protección y por lo tanto puede ejercer su impacto en la célula. Este tipo de enlazante comprende ambos enlazantes que son, como tal, conocidos en la técnica y nuevos enlazantes de este tipo, i.e. que tiene este tipo de características. Preferiblemente, tal enlazante es cualquier enlazante que tiene una característica de carga que permite que el enlazante reaccione como se describe anteriormente. Representantes de tales enlazantes sensibles al pH comprenden oligo (ácido glutámico), oligofenolatos, y ácido dietilentriamina pentaacético. Tanto el acoplamiento de dicho enlazante con el agente de protección como la incorporación de tal enlazante en el agente de protección que luego se conoce comúnmente como una fracción del agente de protección es conocido para los expertos en el arte.



- El compuesto utilizado como el primer componente lipídico en la composición de lípidos de acuerdo con la presente invención que se hace referencia también en este documento como el o los compuestos de acuerdo con la presente invención, como se representa en la Fig. 1, puede ser considerado para abarcar un grupo lipófilo formado por el compuesto-N-R1 que presenta una carga positiva en el grupo enlazante es particularmente apropiado para transferir compuestos biológicamente activos en una membrana celular y preferiblemente en células, más preferiblemente células animales. También, el presente inventor ha encontrado sorprendentemente que la transferencia mediada por los compuestos de acuerdo con la presente invención será particularmente eficaz si el compuesto biológicamente activo es un ácido nucleico, más preferiblemente ARNs y siNA.
- Como se utiliza preferiblemente en este documento, el término alquilo se refiere a un radical alifático saturado que contiene de 8 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 18 átomos de carbono, o un radical hidrocarburo alifático mono- o poliinsaturado, que contiene de 8 a 30 átomos de carbono, que contiene al menos un enlace doble y triple, respectivamente. Por lo tanto, en una realización preferida, el término alquilo también comprende alqueno y alquino. Alquilo se refiere a ambos ramificados y no ramificados, i.e. grupos alquilo de cadena lineal o no lineal. Los grupos alquilo de cadena lineal preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono. Los grupos alquilo de cadena lineal más preferidos contienen de 12 a 18 átomos de carbono. Los grupos alquilo ramificados preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono, por lo cual el número de 8 a 30 átomos de carbono se refiere al número de átomos de carbono que forman el esqueleto de tal grupo alquilo ramificado. El esqueleto del grupo alquilo ramificado contiene al menos un grupo alquilo como se ramifican desde el esqueleto, con el grupo alquilo que se define como en este documento, más preferiblemente con el grupo alquilo que comprende grupos alquilo de cadena corta, que comprende más preferiblemente de 1 a 6, incluso más preferiblemente 1 a 3 y más preferido 1 átomo de C. Más preferidos son los grupos alquilo ramificados que contienen de 12 a 18 átomos de carbono en el esqueleto con los grupos alquilo ramificados que se definen como en lo que antecede. Un grupo alquilo particularmente preferido es el grupo fitanilo.
- En una realización alternativa, el alquilo es un grupo alquilo ramificado o no ramificado insaturado como se define anteriormente. Más preferiblemente, tal radical hidrocarburo alifático insaturado contiene 1, 2 o 3 o 4 dobles enlaces, por lo cual se prefiere particularmente un radical que tiene un doble enlace. El más preferido es oleil el cual es C18: 1delta9, i.e. un radical hidrocarburo alifático que tiene 18 átomos de C, por lo cual en la posición 9, un doble enlace cis configurado se presenta en lugar de un enlace sencillo que une un átomo de C número 9 con un átomo de C número 10.
- Tal como se usa en este documento, n es cualquier número entero entre 1 y 4, lo que significa que n puede ser 1, 2, 3 y 4. Como se usa en este documento, m es cualquier número entero entre 1 y 3, lo que significa que m puede ser 1, 2 y 3.
- Se debe entender que los compuestos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente lípidos catiónicos. Más preferiblemente, cualquiera de los grupos NH o NH<sub>2</sub> presentes en los compuestos de acuerdo con la presente invención están presentes en una forma protonada. Por lo general, cualquier carga positiva del compuesto de acuerdo con la presente invención se compensa por la presencia de un anión. Tal anión puede ser un anión monovalente o polivalente. Los aniones preferidos son haluros, acetato y trifluoroacetato. Los haluros como se utilizan en este documento son preferiblemente fluoruros, cloruros, yoduros y bromuros. Los más preferidos son los cloruros. Bajo asociación del lípido catiónico y el compuesto biológicamente activo que se transfiere a una célula, el anión haluro es reemplazado por el compuesto biológicamente activo que presenta preferiblemente una o varias cargas negativas, aunque hay que reconocer que la carga global del compuesto biológicamente activo no es necesariamente negativa.
- Es preciso reconocer que cualquier compuesto de acuerdo con la fórmula (I) comprende al menos dos átomos de C asimétricos. Está dentro de la presente invención que cualquier posible enantiómero de dicho compuesto se describe en este documento, i.e. en particular, el enantiómero R-R; S-S; R-S y S-R.
- Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden formar una composición o ser parte de una composición, por lo cual dicha composición comprende un portador. En tal composición, que también se denomina en este documento como composición de lípidos, los compuestos de acuerdo con la presente invención también se conocen como el o los componentes de lípidos. Tal portador es preferiblemente un portador líquido. Los portadores líquidos preferidos son portadores acuosos y portadores no acuosos. Los portadores acuosos preferidos son agua, sistemas de solución reguladora acuosos, más preferiblemente sistemas de solución reguladora que tienen una resistencia de solución reguladora fisiológica y concentración(es) de sal fisiológica. Los portadores no acuosos preferidos son solventes, solventes preferiblemente orgánicos tales como etanol, y tert-butanol. Sin estar ligado por ninguna teoría, cualquier solvente orgánico miscible en agua puede, en principio, ser utilizado. Es necesario reconocer que la composición, más particularmente la composición de lípidos puede así estar presente como o formar liposomas.
- La composición de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más lípidos auxiliares que se hace referencia también en este documento como componentes lipídicos auxiliares. Los componentes lipídicos auxiliares se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides. Los fosfolípidos son preferiblemente di-

y monoéster del ácido fosfórico. Los miembros preferidos de los fosfolípidos son fosfoglicéridos y esfingolípidos. Los esteroides, como se usa en este documento, son de origen natural y compuestos sintéticos basados en el ciclopenta [a] fenantreno parcialmente hidrogenado. Preferiblemente, los esteroides contienen 21 a 30 átomos de C. Un esteroide particularmente preferido es el colesterol.

- 5 Los lípidos auxiliares particularmente preferidos son 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

Las composiciones particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden cualquiera de ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diamino propiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato [#6], ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diamino propiónico-N-lauril-N-miristilamida triclorhidrato [#11] o  $\epsilon$ -arginil-lisina-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato [#15] en combinación con DPhyPE, por lo cual el contenido de DPhyPE es de aproximadamente 90 a 20 % mol, preferiblemente 80% mol, 65% mol, 50% mol y 35% mol, por lo cual el término % mol se refiere al porcentaje del contenido total de lípidos de la composición, i.e. el contenido de lípidos de la composición que incluye el lípido catiónico de acuerdo con la presente invención y cualquier lípido adicional, incluyendo, cualquier lípido auxiliar.

15 Está dentro de la presente invención que la composición de acuerdo con la presente invención preferiblemente comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención y/o uno o varios del lípido(s) auxiliar(es) como se revela en este documento, por lo cual cualquiera el compuesto de acuerdo con la presente invención, i.e. el lípido catiónico, y/o el componente lipídico auxiliar está presente como una dispersión en un medio acuoso. Alternativamente, el compuesto de acuerdo con la presente invención, i.e. el lípido catiónico, y/o el componente lipídico auxiliar está/están presente(s) como una solución en un solvente miscible en agua. Como un medio acuoso, preferiblemente se usa cualquiera de los portadores acuosos como se describe en este documento. Los solventes miscibles en agua preferidos son cualquier solvente que forme una fase homogénea con agua en cualquier proporción. Los solventes preferidos son etanol y tert-butanol. Es necesario reconocer que la composición, más particularmente la composición de lípidos puede así, estar presente como o formar liposomas.

25 Es preciso reconocer que la composición de acuerdo con la presente invención en sus diversas realizaciones es y puede por lo tanto también se puede utilizar como una composición farmacéutica. En este último caso, la composición farmacéutica comprende un compuesto farmacéuticamente activo y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Tal portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente, puede ser seleccionado del grupo de portadores definidos en este documento en relación con la composición de la presente invención, respectivamente, es para el tratamiento y la prevención de un paciente. Preferiblemente dicho paciente es un vertebrado, más preferiblemente un mamífero y aún más preferiblemente dicha composición para mamífero como se describe en este documento, en principio, también se puede utilizar como una composición farmacéutica a condición de que sus ingredientes y cualquier combinación de los mismos sea farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende un compuesto farmacéuticamente activo. Tal compuesto farmacéuticamente activo puede ser el mismo que el constituyente adicional de la composición de acuerdo con la presente invención, el cual es preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo, más preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo como se revela en este documento. El constituyente adicional, el compuesto farmacéuticamente activo y/o el compuesto biológicamente activo se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.

40 Preferiblemente, cualquier dicho compuesto biológicamente activo es una molécula cargada negativamente. El término molécula cargada negativamente tiene la intención de incluir moléculas que tienen al menos un grupo cargado negativamente que pueden formar un par iónico con el grupo cargado positivamente del lípido catiónico de acuerdo con la presente invención, aunque el presente inventor no desea estar ligado por ninguna teoría. En principio, la carga positiva en la fracción enlazante también podría tener algún efecto sobre la estructura general de ya sea el lípido, como tal, o cualquier complejo formado entre el lípido catiónico y la molécula cargada negativamente, i.e. el compuesto biológicamente activo. Aparte de eso, la carga positiva adicional introducida en el lípido de acuerdo con la presente invención en comparación con los lípidos catiónicos descritos en la Patente de los Estados Unidos 6,395,713, debería contribuir a un aumento de la toxicidad de este lípido según lo enseñado por Xu Y, Szoka FC Jr.; Biochemistry; 1996 May 07, 35 (18): 5616-23. En contraste con lo que un experto en el arte habría esperado de este documento de la técnica anterior los compuestos de acuerdo con la presente invención son particularmente apropiados para los diversos fines revelados en este documento y son en particular desprovistos de cualquier aumento de la toxicidad.

55 Un péptido tal como se usa en este documento preferiblemente es cualquier polímero que consta de al menos dos aminoácidos que están unidos covalentemente entre sí, preferiblemente a través de un enlace peptídico. Más preferiblemente, un péptido consta de dos a diez aminoácidos. Una realización particularmente preferida del péptido es un oligopéptido que comprende incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 aminoácidos. Las proteínas como preferiblemente se utilizan en este documento son polímeros que consisten en una pluralidad de aminoácidos que están unidos covalentemente entre sí. Preferiblemente, tales proteínas comprenden al menos aproximadamente 100 aminoácidos o residuos de aminoácidos.

Una proteína preferida que puede ser utilizada en conexión con el lípido catiónico y la composición de acuerdo con la presente invención, es cualquier anticuerpo, preferiblemente cualquier anticuerpo monoclonal.

5 Los compuestos biológicamente activos particularmente preferidos, i.e. compuestos farmacéuticamente activos y dicho constituyente adicional como se utiliza en relación con la composición de acuerdo con la presente invención son ácidos nucleicos. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, PNA o cualquier mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional. Un ácido nucleico funcional, como se utiliza preferiblemente en este documento es un ácido nucleico que no es un ácido nucleico que codifica un péptido y proteína, respectivamente. Los ácidos nucleicos funcionales preferidos son ARNsi, siNA, ARNi, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegémeros que son todos conocidos en la técnica.

10 Los ARNsi son ARN interferentes pequeños, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/EP03/08666. Estas moléculas suelen consistir en una estructura de ARN bicatenario que comprende entre 15 a 25, preferiblemente 18 a 23 pares de nucleótidos que tienen apareamiento de bases entre sí, i.e. son esencialmente complementarias entre sí, por lo general mediado por apareamiento de bases Watson-Crick. Una hebra de esta molécula de ARN bicatenario es esencialmente complementaria a un ácido nucleico diana, preferiblemente un ARNm, mientras que la segunda hebra de dicha molécula de ARN bicatenario es esencialmente idéntica a un tramo de dicho ácido nucleico diana. La molécula de ARNsi puede estar flanqueada en cada lado y cada estiramiento, respectivamente, por un número de oligonucleótidos adicionales que, sin embargo, no necesariamente tienen apareamiento de bases entre sí.

20 ARNi tiene esencialmente el mismo diseño que ARNsi, sin embargo, las moléculas son significativamente más largas en comparación con ARNsi. Las moléculas de ARNi comprenden por lo general 50 o más nucleótidos y pares de bases, respectivamente.

Una clase adicional de ácidos nucleicos funcionales que son activos basándose en el mismo modo de acción que ARNsi y ARNi es siNA. siNA por ejemplo, se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/EP03/074654. Más particularmente, siNA se corresponde con ARNsi, por lo cual la molécula de siNA no comprende ningún ribonucleótido.

25 Los ácidos nucleicos antisentido, como se usan en este documento preferiblemente, son oligonucleótidos que se hibridan basándose en la complementariedad de base con un ARN diana, preferiblemente ARNm, activando de este modo RNasaH. RNasaH se activa por medio de tanto fosfodiéster como el ADN acoplado a fosfotioato. El ADN acoplado a fosfodiéster, sin embargo, se degrada rápidamente por nucleasas celulares con excepción del ADN acoplado a fosfotioato. Los polinucleótidos antisentido son por lo tanto eficaces sólo como complejos de ADN-ARN híbridos. Las longitudes preferidas de los ácidos nucleicos antisentido se extienden de 16 a 23 nucleótidos. Ejemplos de este tipo de oligonucleótidos antisentido se describen, entre otros, en la Patente de los Estados Unidos 5,849,902 y Patente de los Estados Unidos 5,989,912.

35 Un grupo adicional de ácidos nucleicos funcionales son los ribozimas que son ácidos nucleicos catalíticamente activos preferiblemente que consisten en ARN que comprende básicamente dos fracciones. La primera fracción muestra una actividad catalítica, mientras que la segunda fracción es responsable de una interacción específica con el ácido nucleico diana. Después de la interacción entre el ácido nucleico diana y dicha fracción del ribozima, por lo general por hibridación y apareamiento de bases Watson-Crick de tramos esencialmente complementarios de bases en las dos hebras de hibridación, la fracción catalíticamente activa puede llegar a ser activa lo cual significa que se escinde, ya sea intramolecularmente o intermolecularmente, el ácido nucleico diana en el caso de la actividad catalítica del ribozima es una actividad fosfodiesterasa. Las ribozimas, el uso y principios de diseño de los mismos son conocidos para los expertos en el arte y, por ejemplo, se describen en Doherty and Doudna (Annu. Ref. Biophys. Biomolstruct. 2000; 30: 457-75).

45 Un grupo todavía adicional de ácidos nucleicos funcionales son los aptámeros. Los aptámeros son ácidos D-nucleicos que son ya sea monocatenarios o bicatenarios y que interactúan específicamente con una molécula diana. La fabricación o selección de aptámeros por ejemplo, se describe en la Patente Europea EP 0 533 838. En contraste con ARNi, ARNsi, siNA, nucleótidos antisentido y ribozimas, aptámeros no degradan ningún ARNm diana sino que interactúan específicamente con la estructura secundaria y terciaria de un compuesto diana, tal como una proteína. Después de la interacción con la diana, la diana por lo general muestra un cambio - en su actividad biológica. La longitud de aptámeros por lo general varía desde tan solo 15 a tanto como 80 nucleótidos, y preferiblemente varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos.

55 Otro grupo de ácidos nucleicos funcionales son espiegémeros como, por ejemplo, se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO 98/08856. Los espiegémeros son moléculas similares a aptámeros. Sin embargo, los espiegémeros consisten ya sea completamente o mayormente de L-nucleótidos en lugar de D-nucleótidos en contraste con los aptámeros. Por otra parte, en particular con respecto a las posibles longitudes de espiegémeros, lo mismo se aplica a espiegémeros como se describe en conexión con los aptámeros.

Como se mencionó anteriormente, el presente inventor ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de acuerdo con la presente invención y las composiciones respectivas que comprenden tal compuesto, pueden ser particularmente eficaces en la transferencia de ARNi, y más particularmente ARNsi y siNA en una célula. Se debe observar que, aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría, debido a los porcentajes molares particulares de lípido(s) auxiliar(es) contenido(s) en las composiciones lipídicas de acuerdo con la presente invención, cuyo lípido auxiliar puede ser un lípido auxiliar libre de PEG o, en particular, un lípido auxiliar que contiene PEG, efectos sorprendentes se pueden realizar, más particularmente si el contenido de cualquiera de este tipo de lípido auxiliar está contenido dentro del rango de concentración especificado en este documento. En relación con la misma, es particularmente digno de mención que si la composición de acuerdo con la presente invención contiene un lípido auxiliar que comprende una fracción PEG, cualquier acción de administración o transfección usando tales lípidos auxiliar derivados de PEG que contienen la composición es particularmente eficaz en el suministro del ácido nucleico, particularmente moléculas de ARNi, muy especialmente ARNsi, siNA, nucleótidos antisentido y ribozimas.

La razón para esto es que los presentes inventores han encontrado, sorprendentemente, que los liposomas que contienen más de aproximadamente el 4% de lípido(s) auxiliar(es) que contienen PEG no están activos, mientras que los liposomas con menos de 4% (preferiblemente menos de 3%, pero más de 0%) median en la administración funcional. Básicamente, los presentes inventores han descubierto que la cantidad específica de PEG en las composiciones de lípidos de acuerdo con la presente invención es apropiada para proporcionar una transfección y administración efectiva, respectivamente.

En un aspecto adicional, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las composiciones de lípidos de acuerdo con la presente invención que preferiblemente están presentes como lipoplexos o liposomas, muestran preferiblemente una carga catiónica global y por lo tanto un exceso de al menos una carga positiva. Más preferiblemente, las composiciones lipídicas muestran una relación de carga negativa:positiva de aproximadamente 1:1.3 a 1:5. Por lo tanto, la presente invención se relaciona de esta manera en un aspecto adicional a cualquier composición de lípidos que comprende al menos un lípido catiónico y un ácido nucleico, preferiblemente un ARNi, ARNsi o siNA o cualquier otro de los ácidos nucleicos funcionales definidos en este documento, que tienen una relación de carga negativa:positiva de aproximadamente 1:1.3 a 1:5. El lípido catiónico es preferiblemente cualquier lípido catiónico descrito en este documento. La composición de lípidos comprende en una realización preferida cualquier lípido auxiliar o combinación de lípido auxiliar tal como se describe en este documento.

Los presentes inventores también han encontrado que, en particular, la relación molar de ARNsi y el lípido catiónico puede ser crucial para la aplicación con éxito de la composición de lípidos de acuerdo con la presente invención, especialmente en vista de lo que se ha dicho anteriormente en relación con la carga total catiónica del ácido nucleico que contiene formulaciones lipídicas. Sin desear estar ligado por ninguna teoría, parece que 1 mol de lípido catiónico, particularmente como se revela en este documento, puede proporcionar un máximo de tres cargas positivas por molécula, mientras que el ácido nucleico y más particularmente las moléculas de ARNsi como se revela en este documento, provee un máximo de 40 cargas negativas por molécula. Con el fin de alcanzar una carga positiva global del ARNsi que contiene las formulaciones lipídicas de acuerdo con la presente invención, la relación molar puede variar de 0 hasta un máximo de 0.075. Un intervalo preferido de relación molar es de aproximadamente 0.02 a 0.05 y aún más preferido es un intervalo de relación molar de aproximadamente 0.037.

Está dentro de la presente invención que la composición y más particularmente la composición farmacéutica puede comprender uno o más de los compuestos biológicamente activos mencionados anteriormente, que pueden estar contenidos en una composición de acuerdo con la presente invención como compuesto farmacéuticamente activo y como constituyente adicional, respectivamente. Será reconocido por los expertos en el arte que ninguno de estos compuestos puede, en principio, ser utilizado como un compuesto farmacéuticamente activo. Tal compuesto farmacéuticamente activo por lo general está dirigido contra una molécula diana que está implicada en el mecanismo patógeno de una enfermedad. Debido al principio de diseño general y modo de acción que subyace a los diversos compuestos biológicamente activos y por lo tanto los compuestos farmacéuticamente activos tal como se utiliza en conexión con cualquier aspecto de la presente invención, prácticamente cualquier objetivo puede ser dirigido. De acuerdo con lo anterior, el compuesto de acuerdo con la presente invención y las respectivas composiciones que contienen el mismo se pueden utilizar para el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o condición de enfermedad que se puede abordar, prevenir y/o tratar utilizando este tipo de compuestos biológicamente activos. Es preciso reconocer que aparte de estos compuestos biológicamente activos también cualquier otro compuesto biológicamente activo puede ser parte de una composición de acuerdo con cualquier realización de la presente invención. Preferiblemente, tal otro compuesto biológicamente activo comprende al menos una carga negativa, preferiblemente bajo condiciones en las que tal otro compuesto biológicamente activo está interactuando o formando complejo con el compuesto de acuerdo con la presente invención, más preferiblemente el compuesto de acuerdo con la presente invención que está presente como un lípido catiónico.

Tal como se usa en este documento, un compuesto biológicamente activo es, preferiblemente, cualquier compuesto que sea biológicamente activo, que preferiblemente muestre cualquier efecto biológico, químico y/o físico en un sistema

5 biológico. Tal sistema biológico es preferiblemente cualquier reacción bioquímica, cualquier célula, preferiblemente cualquier célula animal, más preferiblemente cualquier célula de vertebrado y más preferiblemente cualquier célula de mamífero, incluyendo cualquier célula humana, cualquier tejido, cualquier órgano y cualquier organismo. Cualquier organismo se selecciona preferiblemente del grupo que comprende ratones, ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, ovejas, cerdos, cabras, vacas, caballos, aves de corral, monos y seres humanos.

También está dentro de la presente invención que cualquiera de las composiciones de acuerdo con la presente invención, más particularmente cualquier composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención pueda comprender cualquier compuesto(s) farmacéuticamente activo(s) adicional(es).

10 La composición, en particular la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede usar para diversas formas de administración, por lo cual se prefieren particularmente la administración local y la administración sistémica. Aún más preferida es una vía de administración que se selecciona del grupo que comprende administración intramascular, percutánea, subcutánea, intravenosa y pulmonar. Como se usa en este documento preferiblemente, la administración local significa que la composición respectiva se administra en estrecha relación espacial a la célula, tejido y órgano, respectivamente, a la que la composición y el compuesto biológicamente activo, respectivamente, se tienen que administrar. Como se usa en este documento, la administración sistémica significa una administración que es diferente, a partir de una administración local y más preferiblemente es la administración en un fluido corporal tal como la sangre y el licor, respectivamente, por lo cual el líquido corporal transporta la composición a la célula, tejido y órgano, respectivamente, a la que la composición y el compuesto biológicamente activo, respectivamente, va a ser administrado.

20 Como se usa en este documento, la célula a través de la membrana celular de la cual un compuesto biológicamente activo va a ser transferido por medio del compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, respectivamente, es preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula de vertebrado e incluso más preferiblemente una célula de mamífero. Más preferiblemente, la célula es una célula humana.

25 Cualquier medicamento que puede ser fabricado utilizando el compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, respectivamente es para el tratamiento y la prevención de un paciente. Preferiblemente, dicho paciente es un vertebrado, más preferiblemente un mamífero y aún más preferiblemente dicho mamífero se selecciona del grupo que comprende ratones, ratas, perros, gatos, cobayas, conejos, ovejas, cerdos, cabras, vacas, caballos, monos, aves de corral y los seres humanos. En un aspecto adicional del compuesto y composición de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar como un agente de transferencia, más preferiblemente como un agente de transfección.

30 Como se utiliza preferiblemente en este documento un agente de transferencia es cualquier agente que es apropiado para transferir un compuesto, más preferiblemente un compuesto biológicamente activo tal como un compuesto farmacéuticamente activo a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular y una transferencia más preferiblemente de tal compuesto en una célula como se describió anteriormente en este documento. Incluso más preferiblemente, dicha transferencia también comprende la liberación de cualquier endosoma/liposoma.

35 En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la transferencia, más particularmente para transfectar, una célula con un compuesto biológicamente activo. En una primera etapa, por la cual la secuencia de las etapas no se limita necesariamente y, en particular, no se limita a la secuencia de etapas delineadas a continuación, la célula y la membrana y la célula, respectivamente, se provee. En una segunda etapa, se provee un compuesto de acuerdo con la presente invención, así como un compuesto biológicamente activo tal como un compuesto farmacéuticamente activo. Esta reacción se puede poner en contacto con la célula y la membrana, respectivamente, y debido a las características biofísicas del compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, el compuesto biológicamente activo será transferido de un lado de la membrana a la otra, o en caso de que la membrana forme una célula, desde fuera de la célula a dentro de la célula. Está dentro de la presente invención que, antes de poner en contacto la célula y la membrana, respectivamente, el compuesto biológicamente activo y el compuesto de acuerdo con la presente invención, i.e. el lípido catiónico, se pongan en contacto, con lo cual preferiblemente se forma un complejo y dicho complejo se pone en contacto con la célula y la membrana, respectivamente.

45 En un aspecto adicional de la presente invención, el método *in vitro* para la transferencia de un compuesto biológicamente activo y un compuesto farmacéuticamente activo, respectivamente, comprende las etapas de proporcionar la célula y la membrana, respectivamente, proporcionando una composición de acuerdo con la presente invención y poner en contacto tanto la composición como la célula y la membrana, respectivamente. Está dentro de la presente invención que la composición se puede formar antes o

En una realización de cualquier método para transferir un compuesto biológicamente activo como se revela en este documento, el método puede comprender etapas adicionales, preferiblemente la etapa de detectar si el compuesto biológicamente activo se ha transferido. Tal reacción de detección depende fuertemente de la clase de compuestos biológicamente activos transferidos de acuerdo con el método y será fácilmente evidente para los expertos en el arte.

Está dentro de la presente invención que tal método se realiza en cualquier célula, tejido, órgano y organismo tal como se describe en este documento.

5 Es preciso reconocer que en una realización adicional el agente de protección está unido, como se describe en este documento, con el componente lipídico de la composición de lípidos de acuerdo con la presente invención, preferiblemente al lípido catiónico.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante referencia a las siguientes figuras y ejemplos de los que pueden tomarse otras características, realizaciones y ventajas de la presente invención. Más particularmente,

La figura 1 muestra el diseño básico del lípido catiónico de acuerdo con la presente invención;

10 La figura 2 muestra la síntesis de N-oleil-palmitilamina que es un posible material inicial para la síntesis de los compuestos de acuerdo con la presente invención, por lo cual dicha síntesis es la que de acuerdo con la técnica anterior como se describe en el documento US 6,395,713;

La figura 3 representa la síntesis de N-oleil-palmitilamina que es un material inicial importante de acuerdo con la presente invención;

15 Las figuras 4-9 representan la síntesis del ácido  $\beta$ -arginil-2,3-amino propiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato, ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diamino propiónico-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato y  $\epsilon$ -arginillisina-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato;

La figura 10 representa la síntesis de un grupo de cabeza catiónico alternativo que es un componente alternativo para la síntesis de los lípidos catiónicos de acuerdo con la presente invención;

20 La figura 11 representa una ruta de síntesis alternativa para la síntesis del ácido beta-arginil-2,3-diaminopropiónico - N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato;

Las figuras 12A y 12B representan la distribución del tamaño de las formulaciones lipídicas de acuerdo con la presente invención y el impacto de extrusión y homogeneización de alta presión, respectivamente; y

Las figuras 13A y 13B representan el resultado de un análisis de Western Blot y el impacto de las diferentes concentraciones de lípidos sustituidos por PEG.

25 Ejemplo 1: Síntesis de la N-oleil-palmitil amina de acuerdo con la técnica anterior

30 La N-oleil-palmitil amina es un material inicial importante para los compuestos de acuerdo con la presente invención. La N-oleil-palmitil amina, en principio, puede ser sintetizada como se describe en el documento US 6,395,713. El esquema de reacción respectivo se representa en la figura 2. Sin embargo, el material inicial es oleil amina de grado técnico tal como es provisto, por ejemplo, por Fluka. Un análisis de este material inicial por cromatografía de gases muestra una pureza del  $\geq 70\%$ , por lo cual 30% del material consiste en amina que tiene diferentes longitudes de cadena. La razón de esto podría ser que el material como tal se obtiene de fuentes vegetales. La combinación de ambos oleilamina y 1-bromohexadecano (palmitil bromuro) produce la N-oleil-palmitil amina, después de hacer reaccionar ambos materiales de partida de 100 a 120 °C, durante 30 minutos. El rendimiento es de aproximadamente 83%.

Ejemplo 2: Síntesis de la N-palmitil-oleil amina de acuerdo con la presente invención

35 Se ha observado una nueva síntesis por el presente inventor en relación con los compuestos de acuerdo con la presente invención (Figura 3). Este nuevo esquema de reacción se basa en el hallazgo del presente inventor de que la gran cantidad de impurezas está afectando a la calidad del agente de transferencia preparado a base de este material inicial. De acuerdo con lo anterior, la reacción comienza utilizando ácido oleico con una pureza de  $\geq 99\%$ , como se evidencia por cromatografía de gases y poner en contacto dicho ácido oleico con cloroformiato de etilo, TEA y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y hacer reaccionar el anhídrido carbónico-carboxílico mixto, así obtenido con hexadecilamina (palmitilamina) que tiene de nuevo una pureza de  $\geq 99\%$ , como se muestra por cromatografía de gases. El producto de reacción N-palmitil-oleoil amida [# 1] se hace reaccionar posteriormente con  $\text{LiAlH}_4$  (en THF) dando como resultado 85% de N-palmitil-oleoil amina [# 2] que está presente como un sólido cristalino incoloro.

Las condiciones de reacción más detalladas se describen a continuación.

45

## Síntesis de la N-palmitil-oleoil amida [# 1]

Se adicionaron 2.62 ml (27.5 mmol) de éster etílico del ácido clorofórmico en 30 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 250 ml de nitrógeno de acuerdo con Schlenk bajo gas inerte de argón y se enfrió a 0 °C. Una solución de 7.93 ml (25 mmol) de ácido oleico y 4.16 ml (30 mmol) de trietilamina en 40 ml de diclorometano anhidro se adicionaron gota a gota bajo agitación durante 20 minutos. Después de agitar en el baño de hielo durante 30 minutos, se adicionó rápidamente gota a gota una solución de 6.64 g (27.5 mmol) de palmitilamina en 50 ml de CHCl<sub>3</sub> y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, la solución se lavó tres veces con 40 ml de agua, cada una, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. El residuo se volvió a cristalizar a partir de 100 ml de acetona. Se obtuvieron 11.25 g (22.3 mmol) que corresponden a un rendimiento del 89% de un sólido incoloro.

## Síntesis de N-palmitil-oleil amina [#2]

Se suministraron 20 ml de LiAlH<sub>4</sub> 1M en éter, bajo gas inerte de argón en un matraz de tres bocas de 250 ml que tiene un embudo de goteo y un condensador de reflujo y posteriormente, se adicionó gota a gota en 20 minutos una solución de 7.59 g (15 mmol) de palmitiloleoilamida en 80 ml de THF. La mezcla se calentó a reflujo durante 2.5 horas, a continuación, se adicionaron otros 5 ml de LiAlH<sub>4</sub> 1 M en éter y se sometió a reflujo durante otras 2.5 horas. El exceso de hidruro se descompone utilizando NaOH 6 M, bajo enfriamiento en baño de hielo y el precipitado se separó por filtración. El precipitado se extrajo dos veces con 40 ml de MtBE caliente, cada una, las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. El residuo se cristalizó a partir de 100 ml de MtBE a -20°C. Se obtuvieron 6.23 g (12.7 mmol) que corresponden a un rendimiento del 85% de un sólido cristalino incoloro.

## Ejemplo 3: Síntesis de Boc-Dap(Fmoc)-N-palmitil-N-oleil-amida [#3]

Se disolvieron 521 mg (1.06 mmol) de N-oleil-palmitilamina en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se adicionaron 289 mg (1.17 mmol) de EEDQ. Posteriormente, se adicionaron 500 mg (1.17 mmol) de Boc-Dap (Fmoc)-OH bajo agitación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La solución se transfirió con 80 ml de diclorometano en un embudo de separación y se lavó tres veces con 0.1 ml de HCl 20 N, cada una y una vez con 20 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Después de secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se elimina el solvente, utilizando un evaporador rotatorio (Figura 4). Se obtuvo un aceite viscoso amarillento que no se purificó adicionalmente. En cromatografía de capa delgada utilizando hexano/acetato de etilo de 1: 1 se observó un R<sub>f</sub> de 0.70.

## Ejemplo 4: Síntesis de Boc-Dap-N-palmitil-N-oleil-amida [# 4]

Se disolvió 1 g del producto en bruto Boc-Dap (Fmoc) -N-palmitil-N-oleil-amida en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 50 ml de fondo redondo. Se adicionaron 3 ml de dietilamina y se agitó a temperatura ambiente (Figura 4). El control de cromatografía de capa delgada de la reacción mostró que después de 4.5 horas se completó la reacción del producto inicial. Los componentes volátiles se eliminaron mediante un evaporador rotatorio y el residuo se purificó utilizando cromatografía en 40 g de sílica gel 60 (Merck) utilizando hexano/acetato de etilo 5: 1. El producto se eluyó utilizando un gradiente escalonado que consiste en acetato de etilo, acetato de etilo/metanol 4:1 y diclorometano/metanol 4:1. Se obtuvieron 576 mg (0.85 mmol) de Boc-Dap-N-palmitil-N-oleilamida, como un aceite viscoso de color amarillo.

## Ejemplo 5: Síntesis de tetra-Boc-[ácido β-arginil-2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida] [#5]

Se disolvieron 576 mg (0.85 mmol) de Boc-Dap-N-palmitil-N-oleil-amida en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 100 ml de fondo redondo y 210 mg (0.85 mmol) de EEDQ y se adicionaron bajo agitación 403 mg (0.85 mmol) de Boc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH (Figura 5). La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, el diclorometano se retiró mediante un evaporador rotatorio y el residuo en 100 ml de MtBE se transfirió a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó a fondo con HCl 0.1N, NaOH 1N y solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se purificó posteriormente por cromatografía instantánea (CombiFlash Retrieve; Isco Inc.) utilizando hexano/acetato de etilo como eluyente. Se obtuvieron 694 mg (0.61 mmol) correspondiente a un rendimiento de 72% de un aceite viscoso incoloro.

## Ejemplo 6: Síntesis del ácido β-arginil-2,3-diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato [#6]

Se suministraron 694 mg (0.61 mmol) tetra-Boc-[ácido β-arginil-2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida] bien seca en atmósfera de argón en un matraz de nitrógeno de 25 ml de acuerdo con Schlenk y se adicionaron 8 ml de HCl 4N en dioxano (Figura 5). La mezcla se agitó bajo gas inerte de argón a temperatura ambiente, durante 24 horas, con lo cual el producto se precipitó en forma amorfa y parcialmente como sólido similar a la cera, a partir de la solución

después de aproximadamente 6 a 8 horas. Después de terminar la reacción (control de capa delgada utilizando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  65:25:4) se eliminó bajo alto vacío, cualquier componente volátil. Se obtuvieron 489 mg (0.58 mmol) del ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida como triclorhidrato.

#### Ejemplo 7: Síntesis de N-lauril-miristil amina [# 7]

- 5 Se suspendieron 18.54 g (100 mmol) de dodecilamina (laurilamina), 6.36 g (60 mmol) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 50 mg de yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) en 100 ml de DMF anhidro en un matraz de 3 bocas de 500 que tiene un condensador de reflujo y un embudo de goteo. Una solución de 16.4 ml (60 mmol) de 1-bromo tetradecano en 100 ml de dioxano anhidro se
- 10 adicionaron gota a gota a 100 °C, durante un período de 110 minutos y la mezcla se agitó durante otras 3.5 horas a 100 °C (Figura 6). Se filtró la solución a una temperatura lo más caliente posible. El sólido cristalino que precipitó a 4 °C, durante la noche, se retiró y se lavó con un poco de metanol frío. Posteriormente, el sólido se recrystalizó a partir de 200 ml de metanol. Se obtuvieron 9 g de cristales como hojas, incoloros que son volvieron a cristalizar en 100 ml de MTBE. Los cristales que precipitaron a -18 °C, se aspiraron a partir de una frita de enfriado y se lavaron con MTBE frío. Se obtuvieron 7.94 g (21 mmol) de un sólido cristalino incoloro, correspondiente a un rendimiento de 35%.

#### Ejemplo 8: Síntesis de Boc-Dap (Fmoc) -N-lauril-N-miristil amida [# 8]

- 15 Se disolvieron 715 mg (1.68 mmol) de Boc-Dap (Fmoc)-OH en 15 ml de diclorometano anhidro en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se adicionaron 420 mg (1.7 mmol) de EEDQ. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y posteriormente una solución de 641 mg (1.68 mmol) N-lauril-miristil amina en 25 ml de diclorometano anhidro se adicionó lentamente gota a gota dentro de los 60 minutos (Figura 6). Después de un tiempo de reacción de 20 horas se eliminó el solvente mediante un evaporador rotatorio y el residuo fue transferido con 100 ml de MTBE a un embudo
- 20 de separación. La solución se lavó a fondo con HCl 0.1 N y solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el solvente se eliminó mediante un evaporador rotatorio. Se obtuvieron 1.02 g de un producto en bruto que se purificó por cromatografía instantánea (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) utilizando hexano/acetato de etilo como eluyente. Se obtuvieron 607 mg del producto puro como aceite incoloro, muy viscoso. La cromatografía en capa delgada utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 provee un  $R_f$  de 0.58.

#### 25 Ejemplo 9 Síntesis de Boc-Dap-N-lauril-N-miristil amida [#9]

- 607 mg de Boc-Dap(Fmoc)-N-lauril-N-miristil amida se disolvieron en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 50 ml de fondo redondo (Figura 6). Se adicionaron 3 ml de dietilamina y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4.5 horas. Los constituyentes volátiles se eliminaron utilizando un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía utilizando 40 g de sílica gel 60 (Merck) con hexano/acetato de etilo 5:1. El producto se eluyó mediante
- 30 un gradiente escalonado que consiste en acetato de etilo, diclorometano y diclorometano/metanol 3:1. Se obtuvieron 372 mg (0.655 mmol) de Boc-Dap-N-lauril-N-miristil amida como un aceite amarillento, viscoso.

#### Ejemplo 10: Síntesis tetra-Boc-[ácido $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico -N-lauril-N-miristil amida] [#10]

- 372 mg (0.655 mmol) de amida Boc-Dap-N-lauril-N-miristil se disolvieron en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 50 ml de fondo redondo y 162 mg (0.655 mmol) de EEDQ y 311 mg (0.655 mmol) de Boc-Arg (Boc) $_2$ -OH se
- 35 adicionaron bajo agitación (Figura 7). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, se eliminó el diclorometano utilizando un evaporador rotatorio y el residuo se transfirió con 80 ml de MTBE a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó a fondo con HCl 0.1 N, NaOH 1 N y solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el solvente se eliminó mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se purificó posteriormente por cromatografía instantánea (Combiflash Retrieve; Isco Inc.), utilizando un gradiente escalonado de hexano/acetato de
- 40 etilo. Se obtuvieron 500 mg (0.5 mmol) de un aceite viscoso incoloro, que corresponde a un rendimiento del 76%.

#### Ejemplo 11: Síntesis de ácido $\beta$ -arginil-2,3- diamino propiónico-N-lauril-N-miristil amida triclorhidrato [#11]

- Se suministraron 511 mg (0.5 mmol) de tetra-Boc-[ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico-N-lauril-N-miristil amida] bien seca, en atmósfera de argón en un matraz de 25 ml de argón de acuerdo con Schlenk y se adicionaron 10 ml de HCl 4 N en dioxano (Figura 7). La mezcla se agitó bajo gas inerte de argón a temperatura ambiente, durante 24 horas, con lo
- 45 cual el producto se precipitó en forma parcialmente amorfa, sólida parcialmente similar a la cera a partir de la solución después de 6 a 8 horas. Después de la finalización de la reacción (control por cromatografía en capa delgada, utilizando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  65:25:4), se eliminaron bajo alto vacío todos los componentes volátiles. Se obtuvieron 323 mg (0,5 mmol) de ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico -N-lauril-N-miristil amida en la forma del triclorhidrato.

#### Ejemplo 12: Síntesis de Boc-Lys (Fmoc) -N-lauril-N-miristil amida [# 12]

- 50 937 mg (2 mmol) de Boc-Lys(Fmoc)-OH se disolvieron en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se adicionaron 495 mg (2 mmol) de EEDQ (Figura 8). La mezcla se agitó a temperatura ambiente



5 durante 60 minutos y posteriormente se adicionó una solución de 764 mg (2 mmol) de amina N-lauril-miristil en 30 ml de diclorometano anhidro, lentamente gota a gota en 120 minutos. Después de un tiempo de reacción de 20 horas se eliminó el solvente utilizando un evaporador rotatorio y el residuo fue transferido con 100 ml de MTBE a un embudo de separación. La solución se lavó a fondo con HCl 0.1 N y NaHCO<sub>3</sub> saturado, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. Se obtuvieron 1.757 g de un producto en bruto que se purificó utilizando cromatografía instantánea con hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente. Se obtuvieron 1.377 g del producto puro como un aceite incoloro, muy viscoso. La cromatografía en capa delgada utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 dio un R<sub>f</sub> de 0.57.

Ejemplo 13: Síntesis de Boc-Lys-N-lauril-N-miristil amida [# 13]

10 1.377 g de Boc-Lys (Fmoc) -N-lauril-N-miristil-amida se disolvieron en 16 ml de diclorometano anhidro en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se adicionaron 6 ml de dietilamina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas (Figura 8). Los componentes volátiles se eliminaron utilizando un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía utilizando 40 g de sílica gel 60 (Merck) con hexano/acetato de etilo 5:1. El producto se eluyó utilizando un gradiente escalonado que consiste en acetato de etilo, diclorometano y diclorometano/metanol 3:1. Se obtuvieron 556 mg (0.911 mmol) de Boc-Lys-N-lauril-N-miristil amida como aceite viscoso amarillento, así como 119 mg de una fracción mixta.

Ejemplo 14: Síntesis de tetra-Boc-[ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil amida] [#14]

20 556 mg (0.911 mmol) de Boc-Lys-N-lauril-N-miristil-amida se disolvieron en 40 ml de diclorometano anhidro y se adicionaron 226 mg (0.911 mmol) de EEDQ y 433 mg (0,911 mmol) de Boc-Arg (Boc) 2-OH bajo agitación (Figura 9). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, se eliminó el diclorometano utilizando un evaporador rotatorio y el residuo se transfirió con 80 ml de MTBE a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó a fondo con HCl 0.1 N y solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. El producto en bruto se purificó posteriormente por cromatografía instantánea (Combiflash Retrieve; Isco Inc.), utilizando un gradiente escalonado de hexano/acetato de etilo. Se obtuvo un aceite viscoso incoloro con una producción de 730 mg (0.684 mmol) correspondiente al 75%.

Ejemplo 15: Síntesis de ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil amida triclorhidrato [#15]

30 Se suministraron 730 mg (0.684 mmol) tetra-Boc- [ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil amida] bien seca en atmósfera de argón en un matraz de 25 ml de argón de acuerdo con Schlenk y se adicionaron 10 ml de HCl 4 N en dioxano (Figura 9). La mezcla se agitó bajo gas inerte de argón a temperatura ambiente durante 24 horas, después de lo cual el producto precipitó desde la solución como un sólido amorfo, parcialmente similar a la cera después de aproximadamente 8 horas: Al finalizar la reacción, según se controló por cromatografía en capa delgada utilizando CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 65:25:4, todos los componentes volátiles se eliminaron a alto vacío. Se obtuvieron 491 mg (0.633 mmol) de ε- arginil-lisina-N-lauril-N-miristil amida como triclorhidrato.

Ejemplo 16: Síntesis de ácido Tri-Boc-γ-carbamidino-α,γ-diaminobutírico [#16]

35 Se suministraron 1.31 g (6 mmol) de Boc-Dab-OH 15 ml de acetonitrilo en un matraz de 100 ml de fondo redondo y se adicionaron 12 mmol de diisopropiltilamina (DIPEA) (Figura 10). Posteriormente se adicionó agua gota a gota hasta que una parte de la Boc- Dab-OH se disolvió y, posteriormente, se adicionaron 1.96 g (5 mmol) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil) guanidina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, después de lo cual se eliminó el acetonitrilo utilizando un evaporador rotatorio. El residuo acuoso se diluyó con 5 ml de agua y se adicionaron 40 50 ml de diclorometano. La reacción se acidificó hasta un pH 2 mediante la adición de HCl 2 N bajo agitación y la posterior separación de la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con 50 ml de diclorometano y las fases orgánicas combinadas se lavaron posteriormente con un poco de solución de HCl diluido y NaCl saturado. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. El residuo se purificó utilizando cromatografía sobre sílica gel 60 utilizando hexano/acetato de etilo 2:1. Se obtuvieron 1.138 g (2.47 mmol), correspondientes a un rendimiento del 50%, de un sólido amorfo, incoloro.

Ejemplo 17: Síntesis de ácido beta-arginil-2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato [# 61]

50 1.225 g (6 mmol) de BOC-Dap-OH en 15 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> absoluto, se suspenden en un matraz Schlenk de 250 ml que comprende un embudo de goteo bajo una atmósfera de argón y se adicionaron 1.72 ml trimetilamina. Se adicionó una solución de 1.52 ml (12 mmol) de TMSCl en 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> absoluto, gota a gota dentro de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación vigorosa. Mientras tanto 941 mg (5.8 mmol) de carbonil diimidazol se disolvieron en 8 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> absoluto, en un matraz Schlenk de 100 ml bajo atmósfera de argón. Se adicionó una solución de 2.66 g (5.6 mmol) de Boc-Arg (Boc)2-OH en 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> absoluto gota a gota dentro de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación. Ambas soluciones de reacción se agitaron a temperatura ambiente, durante 4 h.

Posteriormente, se adicionaron 832  $\mu$ l ( 6 mmol) de trietilamina a la primera solución y se adicionó la segunda solución gota a gota, dentro de 15 a 20 minutos a través del embudo de goteo a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 15 a 20 minutos, se adicionaron 30 ml de agua, se agitó vigorosamente durante 45 minutos y la solución se ajusta a un pH de 2. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo varias veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fases orgánicas combinadas se secan con una solución saturada de NaCl y sulfato de sodio y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. El residuo similar al vidrio se purifica mediante cromatografía instantánea en sílica gel utilizando diclorometano como eluyente. Se obtuvieron 2.74 g (4.15 mmol; 74%) de un sólido amorfo incoloro [compuesto 17].

Este sólido se hace reaccionar con oleil palmitil amina [# 2] en condiciones que son esencialmente análogas a las del Ejemplo 10, por lo cual la temperatura se ajusta de 35 a 40 °C (rendimiento 72%). Se obtiene el producto final previsto ácido  $\beta$ -arginil-2,3- diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato [# 6], después de la escisión de los grupos de protección con Boc como se describe en el Ejemplo 11. El producto así obtenido se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía instantánea sobre RP-18 sílica gel utilizando MeOH/agua como eluyente.

Ejemplo 18: Fabricación de complejos que consisten en liposomas catiónicos y ARNsi (lipoplexos)

Los lipoplexos consistentes en liposomas catiónicos y ARNsi fueron fabricados utilizando tecnologías estándar conocidas en la técnica tales como torta/película de lípido, procedimiento de inyección de etanol, evaporación de fase reversa y el procedimiento de diálisis de detergente [c.f. Liposomes as Tools in Basic Research and Industry; Jean R. Philippot and Francis Schuber; CRC Press January 1995 und Liposome Technology: Preparation of Liposomes:001 Gregory Gregoriadis CRC Press I L1c. April 1984].

Los liposomas obtenidos de este modo que también se hace referencia en este documento como lipoplexos comprenden como el lípido ácido beta-arginil- 2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato y, además, ya sea 1,2-difitanoi-sn-glicero- 3-fosfoetanolamina o 1,2-di-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, por lo cual se prefiere el uso de 1,2-difitanoi-sn-glicero- 3-fosfoetanolamina. La fracción lipídica de tales liposomas y lipoplexos, respectivamente, fue 50% mol de ácido beta-arginil-2,3-diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato y, ya sea 50% mol de 1,2-difitanoi-sn- glicero-3-fosfoetanolamina o 50 % mol de 1,2-di-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

La combinación de 50% mol del ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato y 50 % mol de 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina también se conoce en este documento como atuFect.

Se debe entender que, en principio, cualquier otro lípido y composición de lípidos según se revela en este documento, puede ser fabricado utilizando las técnicas mencionadas anteriormente, así como las etapas de procesamiento adicionales.

Los liposomas y lipoplexos, respectivamente, son sometidos a etapas adicionales de procesamiento con el fin de recortarlos en lo que respecta al tamaño, polidispersividad y diseño de la capa. Estas características se pueden ajustar mediante sonicación, extrusión tal como a través de membranas porosas, y homogeneización, preferiblemente homogeneización de alta presión.

Los liposomas formados de este modo se caracterizaron por espectroscopia de correlación de fotones con analizador de partículas submicras Beckman-Coulter N 5 y los resultados de tales liposomas, ya sea clasificados por extrusión o por homogeneización de alta presión se representan en la figura 12A y 12B, respectivamente.

A partir de la figura 12A se puede tomar que la distribución del tamaño de los liposomas se puede modificar utilizando diferentes membranas que tienen diferentes exclusiones de tamaño, en el presente caso 1,000 nm y 400 nm, respectivamente. En ambos casos, la etapa de extrusión se repitió 21 veces. Sin embargo, está dentro de la presente invención que la exclusión de tamaño puede ser de aproximadamente 50 hasta 5000 nm, y que las etapas de extrusión se pueden repetir de 10 a 50 veces.

Como se puede tomar de la figura 12B, la homogeneización de alta presión también es un medio apropiado para modificar la distribución del tamaño de los liposomas, por lo cual al aplicar tal homogeneización a alta presión el tamaño de los liposomas depende del número de ciclos de homogeneización al que fueron sometidos los liposomas. Los rangos de presión típicas son 100-2500 bar, por lo cual en el presente caso la presión aplicada fue de 1,500 bar.

Ejemplo 19: Composición de lípidos y contenido de PEG

Con el fin de probar el impacto de PEG sobre la eficacia de transfección y de administración de composiciones lipídicas que comprenden como el primer componente lipídico el ácido  $\beta$ -arginil-2,3-diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato (lípido catiónico), como el primer lípido auxiliar la 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) y ceramida conjugado con PEG2000 (C8mPEG2000) y PEG5000 (C8mPEG5000), respectivamente, las siguientes formulaciones se generaron de acuerdo con los métodos revelados en este documento:

Formulaciones A<sub>1</sub> – A<sub>5</sub>:

	Lípido catiónico [% mol]	DPhyPE [% mol]	C8mPEG2000 [% mol]
A <sub>1</sub>	50% mol	49	1
A <sub>2</sub>	50 % mol	47.5	2.5
A <sub>3</sub>	50 % mol	45.0	5.0
A <sub>4</sub>	50 % mol	42.5	7.5
A <sub>5</sub>	50 % mol	40.0	10

Formulaciones B<sub>1</sub> - B<sub>5</sub>:

	Lípido catiónico [% mol]	DPhyPE [% mol]	C8mPEG2000 [% mol]
B <sub>1</sub>	49	50 % mol	1
B <sub>2</sub>	47.5	50 % mol	2.5
B <sub>3</sub>	45.0	50 % mol	5.0
B <sub>4</sub>	42.5	50 % mol	7.5
B <sub>5</sub>	40	50 % mol	10.0

5 Para cualquiera de las formulaciones mencionadas anteriormente, la concentración de lípidos fue de 1.445 mg/ml, la concentración de ARNs<sub>i</sub> fue 15 μM en sacarosa 300 mM. La dilución de los complejos-reserva concentrados formados, produjeron una concentración final de 20, 10, 5 nM de ARNs<sub>i</sub> en el medio de cultivo celular.

10 Las moléculas de ARNi contenidas en dichas formulaciones se dirigieron contra PTEN y las secuencias fueron las siguientes: Primera hebra que tiene la siguiente secuencia: uaaguucuagcuguggugg-P; segunda hebra que tiene la secuencia ccaccacagcuagaacuaa-P, por lo cual el patrón de modificación es tal que los nucleótidos que se imprimen en negrita y, son 2'-O-metil nucleótidos; en cualquiera de las hebras, el extremo 3' comienza con un fosfato representado por P en las secuencias mencionadas anteriormente.

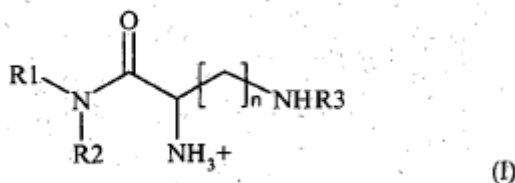
15 Las formulaciones lipídicas se administraron a las células HeLa contenidas en una placa de 6 pozos que contienen cada una 40,000 células/pozo. En las células, se realizó el análisis de la expresión de PTEN y los resultados se representaron en la figura 13, como transferencias Western. La expresión de p110a se utilizó como control de carga y se detectó por medio de un anticuerpo. Desde cualquiera de las transferencias Western representadas en la figura 13A y 13B se puede tomar que el contenido del compuesto de PEG, es decir, el compuesto protector se puede aumentar hasta 5 y 7.5% mol, por lo cual la concentración puede ser mayor o estar en el extremo superior de este rango en el caso de PEG2000 en comparación con el PEG5000 utilizado.

20 Esta es una clara ventaja en comparación con aquellas composiciones que contienen PEG, donde el PEG no es extraíble de la composición de lípidos. Las formulaciones lipídicas de composiciones similares que comprenden 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina- polietilen-glicol-(DSPE-PEG2000) en el intervalo de 1 a 5% mol en lugar de el conjugado PEG-ceramida sólo permiten la introducción de 1 a 2 % mol con el fin de proporcionar una reducción eficiente.

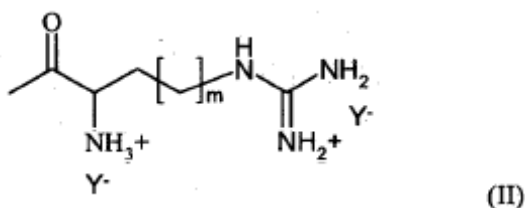
25

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de lípidos que comprende  
al menos un primer componente lipídico,  
al menos un primer lípido auxiliar, y
- 5 un compuesto protector que es extraíble de la composición de lípidos en condiciones in vivo, por lo cual el primer componente lipídico es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I),



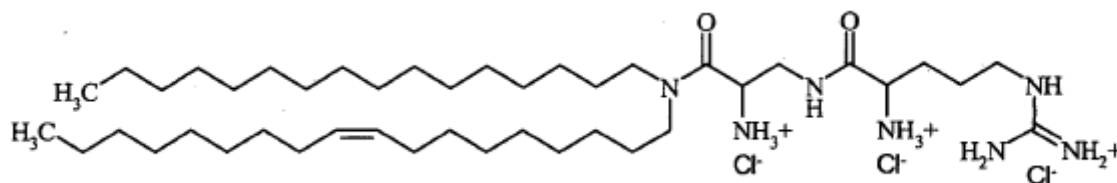
- en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo y alquenilo que contiene de 8 a 30 átomos de carbono;
- 10  $n$  es cualquier número entero entre 1 y 4;
- $R_3$  es un grupo acilo seleccionado entre el grupo que consiste en lisil, ornitilo, 2,4-diaminobutirilo, histidilo y una fracción acilo de acuerdo con la fórmula (II),



- 15 en donde  $m$  es cualquier número entero de 1 a 3, en donde el  $NH_3^+$  es opcionalmente ausente, y
- $Y^-$  es un anión farmacéuticamente aceptable,
- en donde el compuesto protector se selecciona del grupo que consiste en PEG, HEG, almidón polihidroxietilo (polyHES) y un polipropileno y en donde el compuesto protector está unido a una ceramida, en donde la ceramida comprende, como el sustituyente, una cadena de carbono corta de 6 a 10 átomos de carbono y en donde la ceramida se une covalentemente al compuesto protector.
- 20
2. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena de carbono corta es una cadena de hidrocarburo, preferiblemente una cadena de hidrocarburo de 8 átomos de carbono.
3. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto protector es PEG2000 o PEG5000.
- 25 4. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición comprende un constituyente adicional y/o un segundo lípido auxiliar.
5. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición de lípidos comprende un ácido nucleico, por lo cual dicho ácido nucleico es preferiblemente el constituyente adicional.
- 30 6. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste de  $ARN_i$ ,  $ARN_{si}$ , siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegémeros.

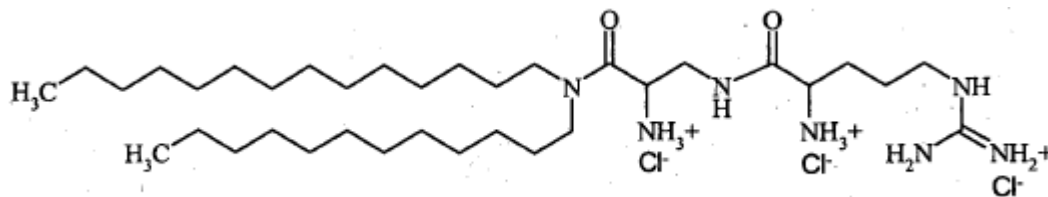
7. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto protector es un conjugado de PEG y ceramida.
8. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el sustituyente de la ceramida consiste de una cadena de carbono corta de 8 átomos de carbono.
- 5 9. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la ceramida es el primer lípido auxiliar.
10. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la ceramida es el segundo lípido auxiliar.
- 10 11. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto protector comprende un enlazante sensible al pH o una fracción sensible al pH.
12. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el enlazante o fracción es un enlazante aniónico o una fracción aniónica
13. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el enlazante aniónico o fracción aniónica es menos aniónica o neutra en un ambiente ácido, por lo cual preferiblemente tal ambiente ácido es un endosoma.
- 15 14. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el enlazante sensible al pH o la fracción sensible al pH se selecciona del grupo que consta de oligo (ácido glutámico), oligofenolato(s) y ácido dietilentriamina pentaacético.
15. La composición de lípidos de acuerdo con la reivindicación 1-14, en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno y se seleccionan independientemente del grupo que consiste de laurilo, miristilo, palmitilo y oleilo.
- 20 16. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de 1-15, en donde R<sub>1</sub> es laurilo y R<sub>2</sub> es miristilo; o R<sub>1</sub> es palmitilo y R<sub>2</sub> es oleilo.
17. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde m es 1 o 2.
18. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el compuesto es un lípido catiónico, preferiblemente en asociación con un anión Y<sup>-</sup>.
- 25 19. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde Y<sup>-</sup> se selecciona del grupo que consiste en halogenuros, acetato y trifluoroacetato.
20. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

- ácido β-arginil-2,3-diamino propiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato



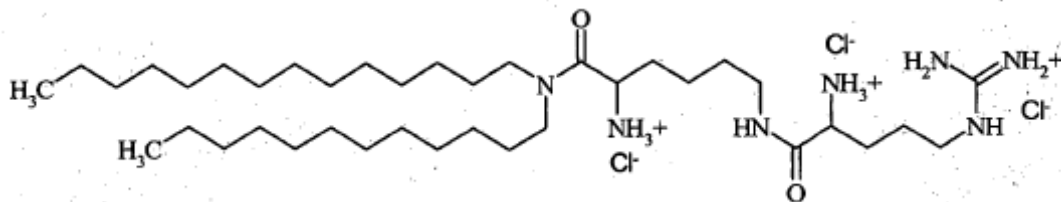
30

- ácido β-arginil-2,3-diamino propiónico -N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato



y

- ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil-amida triclorhidrato



21. La composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la composición comprende un portador.
22. Una composición farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un compuesto farmacéuticamente activo y preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable.
23. La composición de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional se selecciona del grupo que consiste en péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.
24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la proteína es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.
25. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN, PNA y LNA.
26. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 25, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, por lo cual preferiblemente el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que consiste en ARNi, ARNsi, siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiéglmeros.
27. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el primer lípido auxiliar y/o el segundo lípido auxiliar se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y esteroides, preferiblemente bajo la condición de que el primer y/o el segundo lípido auxiliar sea diferente de una ceramida.
28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el primer y/o segundo lípido auxiliar o componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que consiste de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
29. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 28, en donde el contenido del componente lipídico auxiliar es de aproximadamente 20% mol a aproximadamente 80% mol del contenido total de lípidos de la composición.
30. La composición de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el contenido del componente lipídico auxiliar es de aproximadamente 35 % mol a aproximadamente 65% mol.
31. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en donde el lípido es β-arginil-2,3-diamino ácido propiónico-N-palmitil- N-oleil-amidtriclorhidrato, y el lípido auxiliar es 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
32. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el lípido es 50% mol y el lípido auxiliar es 50% mol del contenido total de lípidos de la composición.
33. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 32, en donde la composición comprende además un segundo lípido auxiliar.
34. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en donde el primer y/o el segundo lípido auxiliar comprende un grupo que se selecciona del grupo que consiste en una fracción de PEG, una fracción HEG, una fracción de almidón polihidroxietilo (polyHES) y una fracción de polipropileno, por el cual dicha fracción provee preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 10000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2000 a 5000 Da.

35. La composición de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el lípido auxiliar que comprende la fracción de PEG se selecciona del grupo que consiste de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dialquil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- 5 36. La composición de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la fracción de PEG del lípido auxiliar tiene un peso molecular de 2,000 a 5,000 Da, preferiblemente un peso molecular de 2,000 Da.
37. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la composición comprende como el componente lipídico  $\beta$ -arginil-2,3- diamino ácido propiónico -N-palmitil-N-oleil-amida triclorhidrato, como un primer lípido auxiliar 1,2-difitanoi-sn-glicero- 3-fosfoetanolamina y como un segundo lípido auxiliar 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000.
- 10 38. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, en donde el contenido del segundo lípido auxiliar es de aproximadamente 0,05% mol a 4,9 % mol, preferiblemente de aproximadamente 1 a 2% mol.
39. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 38, en donde la composición contiene de aproximadamente 1 a 10% mol, más preferiblemente 1 a 7.5% mol y más preferiblemente de 1 a 5% mol del conjugado de PEG y la ceramida.
- 15 40. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39, en donde el contenido del primer componente lipídico es de aproximadamente 42.5% mol a 50% mol, el contenido del primer lípido auxiliar es de aproximadamente 42.5% mol a 50% mol, por lo cual la suma del contenido del primer componente lipídico, del primer lípido auxiliar y del conjugado de PEG y la ceramida es 100% mol.
- 20 41. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico de doble hebra, en donde la composición comprende además un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional que es más preferiblemente un ácido ribonucleico de doble hebra y más preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de ARNi, ARNsi, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, por lo cual preferiblemente la relación molar de ARNi con el lípido catiónico es de aproximadamente 0 a 0.075, preferiblemente de aproximadamente 0.02 a 0.05 y aún más preferiblemente 0.037.
- 25 42. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde el primer componente lipídico y/o al menos uno de los lípidos auxiliares y/o el compuesto protector está/están presentes como una dispersión en un medio acuoso.
- 30 43. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde el primer componente lipídico y/o al menos uno de los lípidos auxiliares y/o el compuesto protector está/están presentes como una solución en un solvente miscible en agua, por lo cual preferiblemente el solvente se selecciona del grupo que consiste de etanol y tert-butanol.
44. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, para la fabricación de un medicamento.
45. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, como un agente de transferencia.
- 35 46. Uso de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el agente de transferencia transfiere un componente farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional en una célula, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula humana.
- 40 47. Un método *in vitro* para la transferencia de un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional en una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que comprende las siguientes etapas:
- proporcionar la célula o la membrana;
  - proporcionar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, por lo cual la composición comprende el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional; y
  - poner en contacto la célula o la membrana con la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43.
- 45 48. El método de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el método comprende como etapa adicional:

- detectar el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional en la célula y/o más allá de la membrana.

49. Un lipoplexo que comprende una composición de lípidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43; y ARNsi.



**Figura 1**

estructura general de los compuestos de acuerdo con la presente invención:

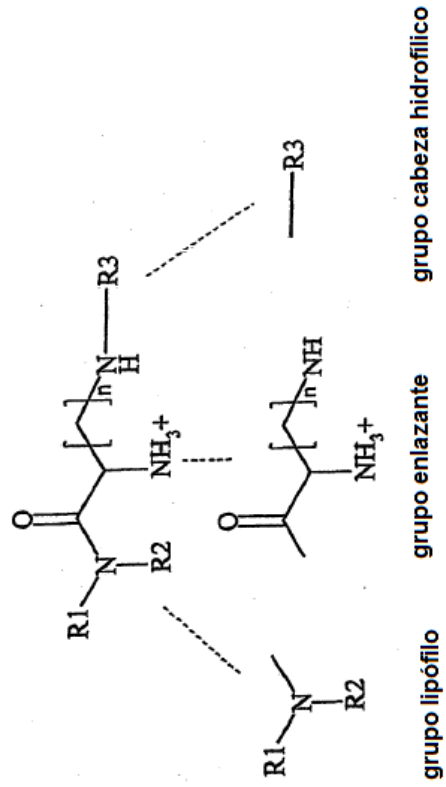


Figura 2

material inicial: oleil amina  
 grado técnico Fluka  $\geq 70\%$ (GC)  
 ~30% de aminas con diferentes cadenas alquilo

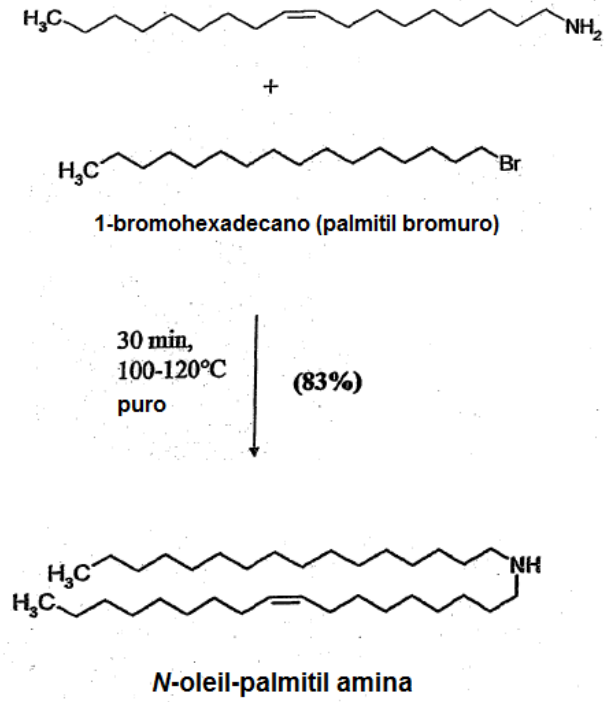


Figura 3

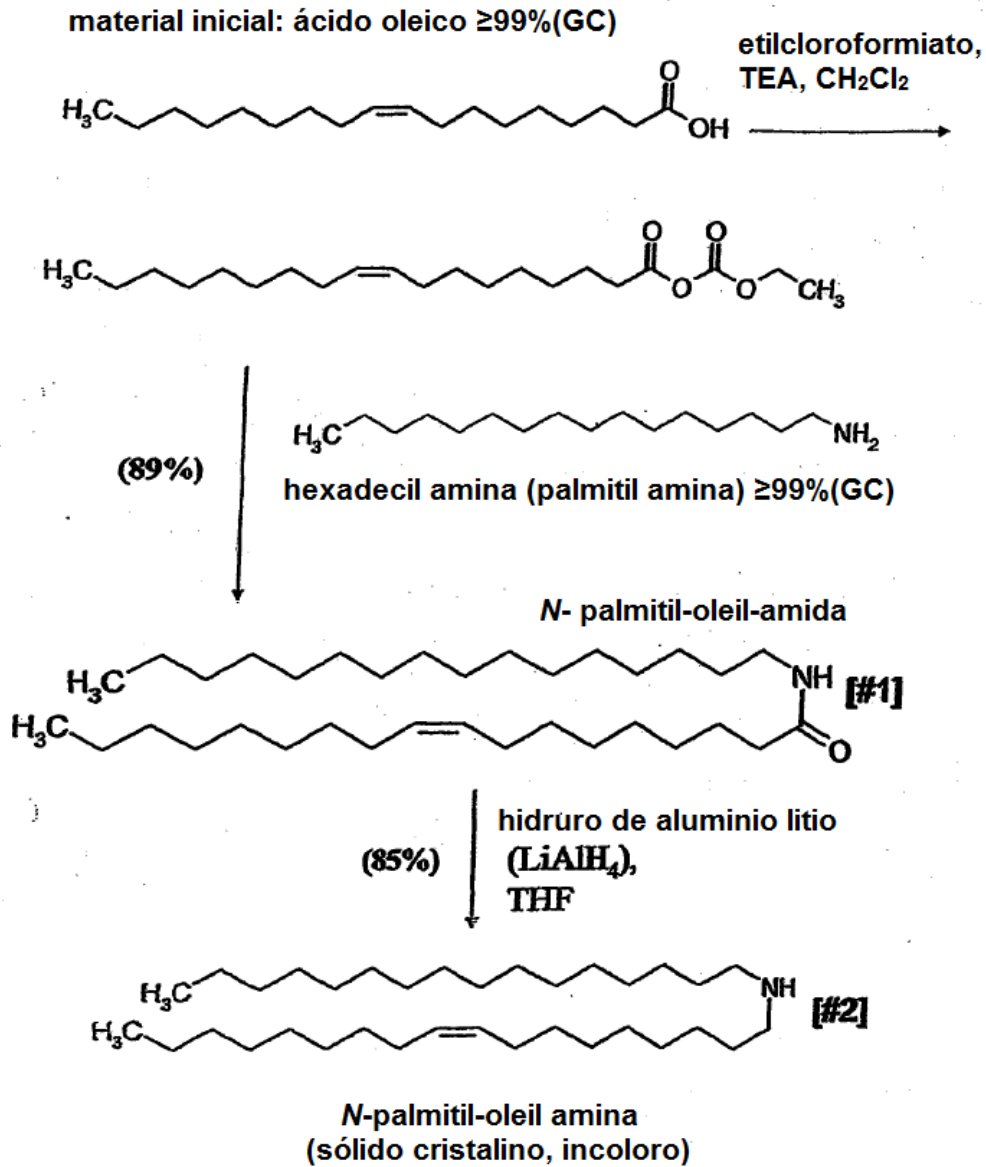


Figura 4

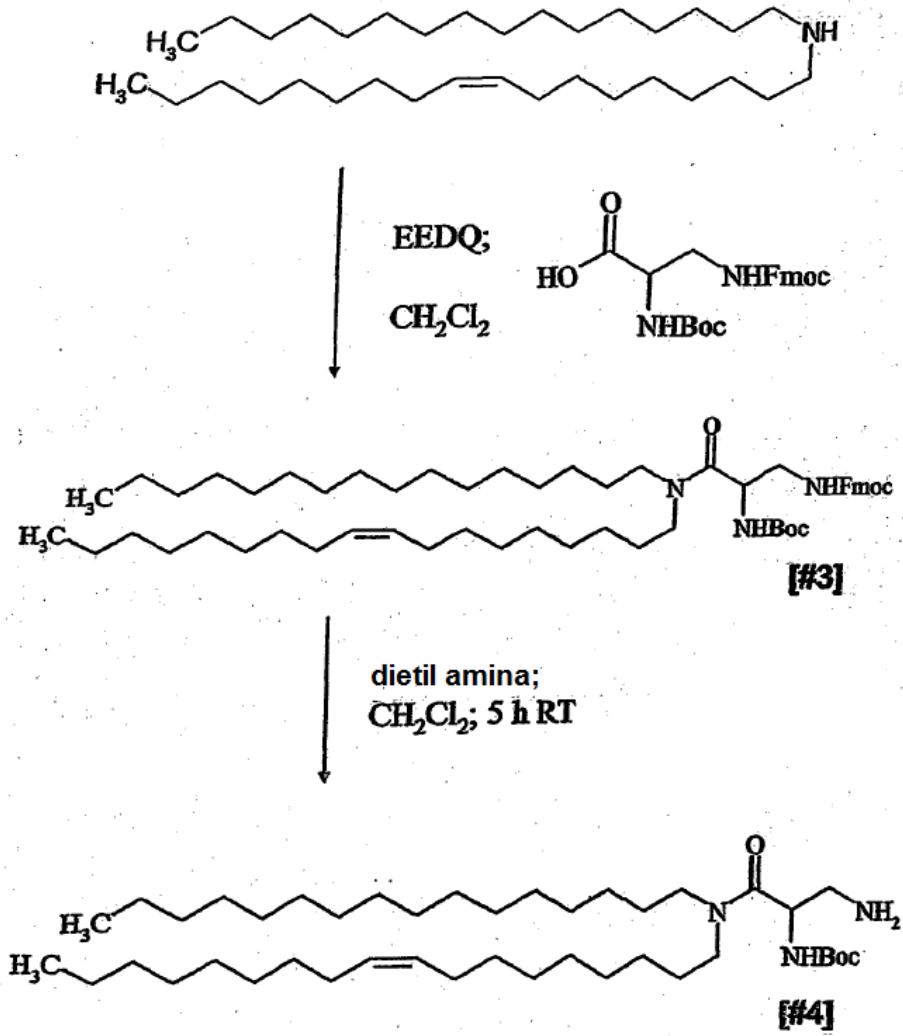


Figura 5

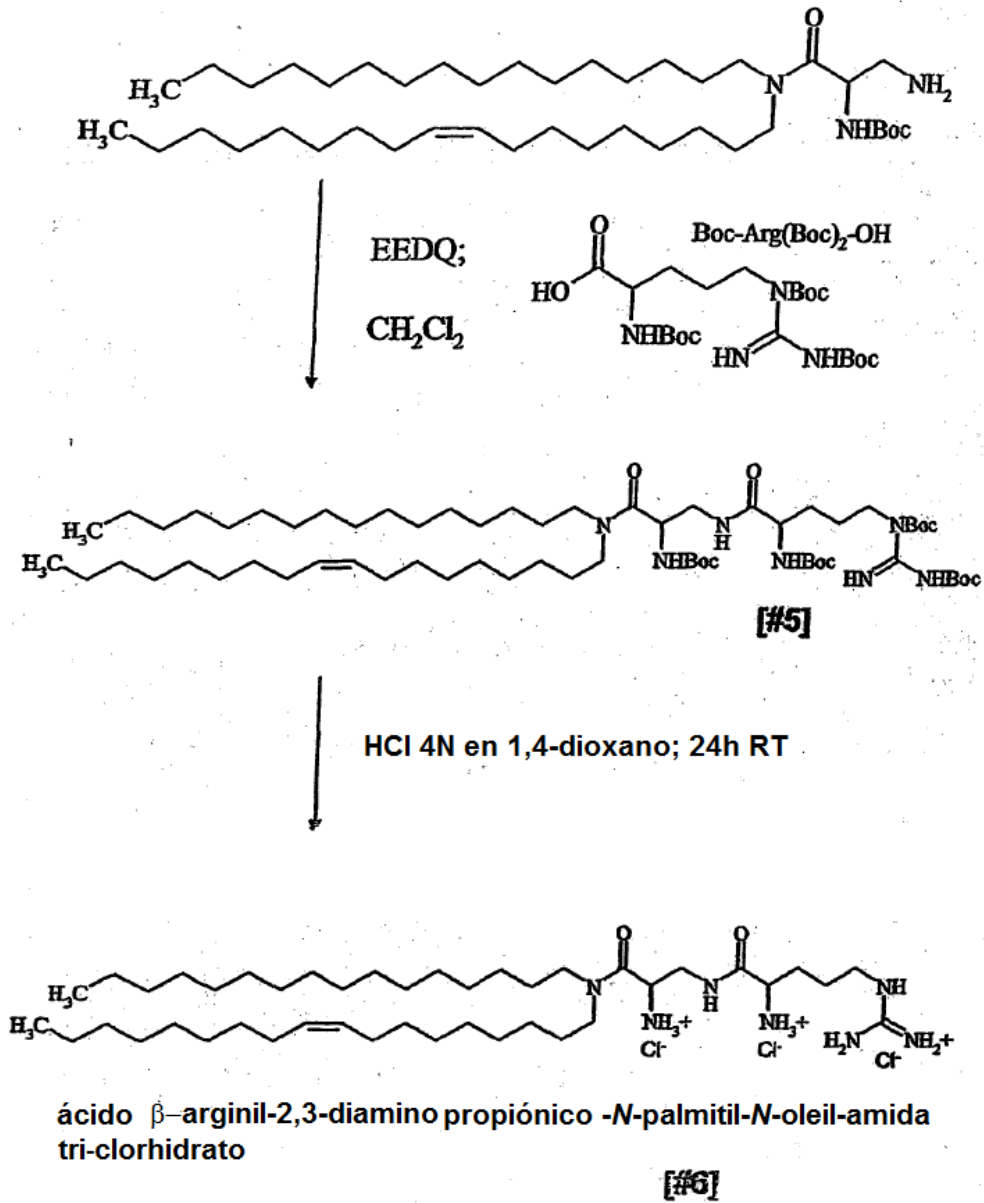


Figura 6

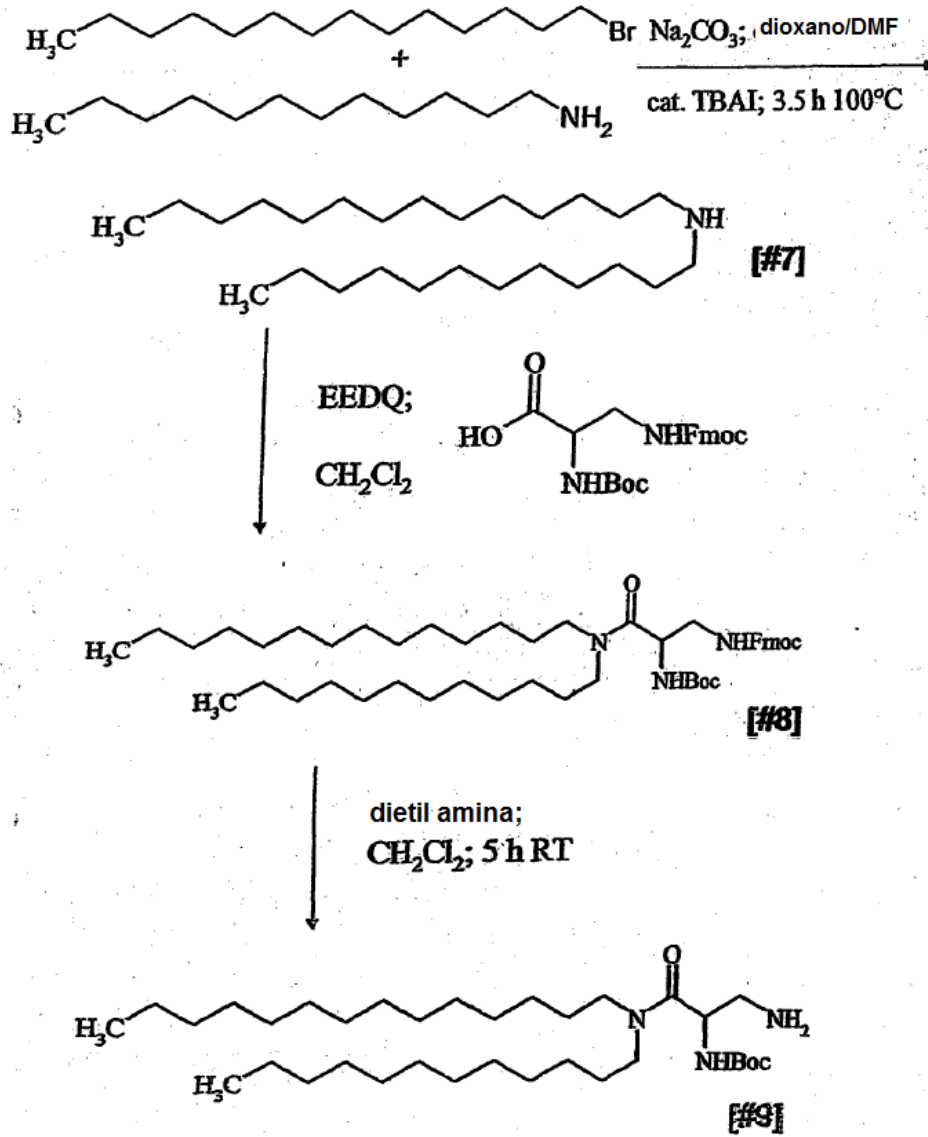


Figura 7

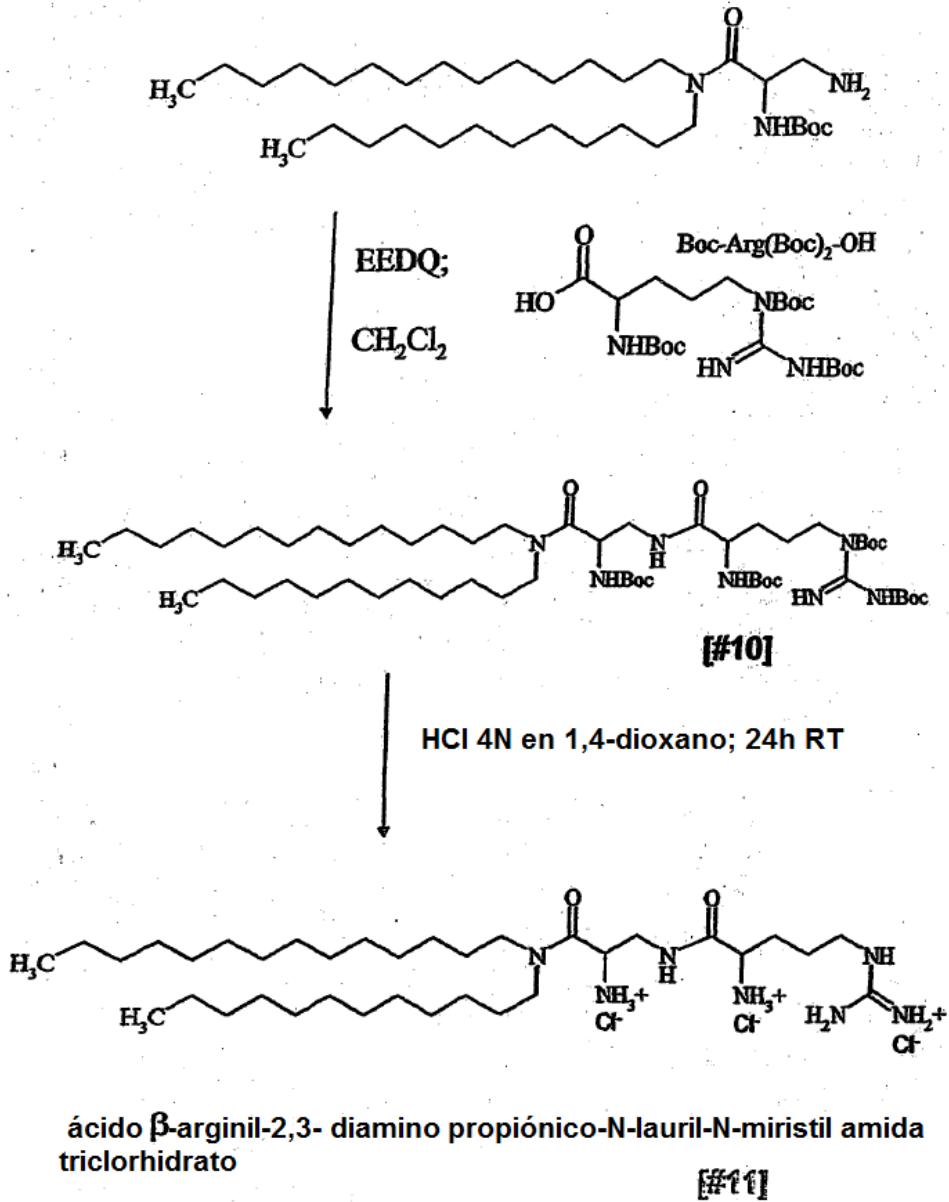


Figura 8

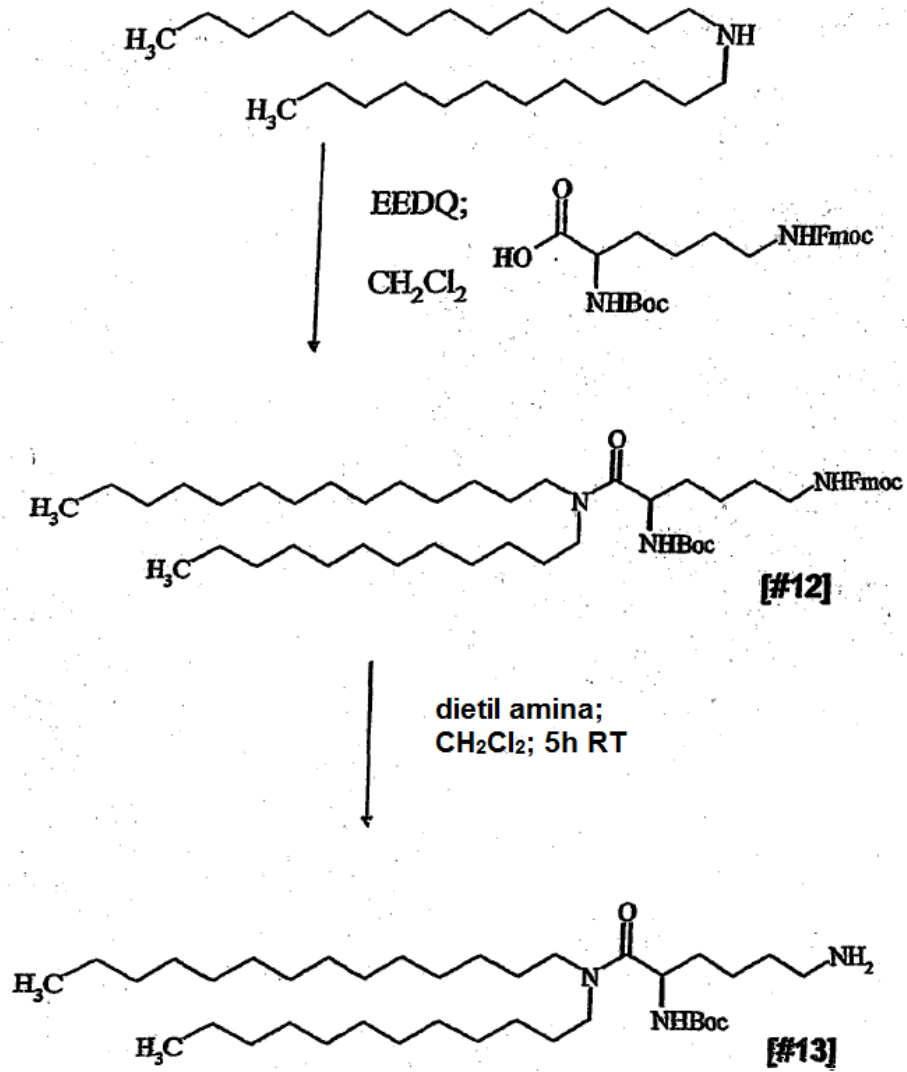




Figura 9

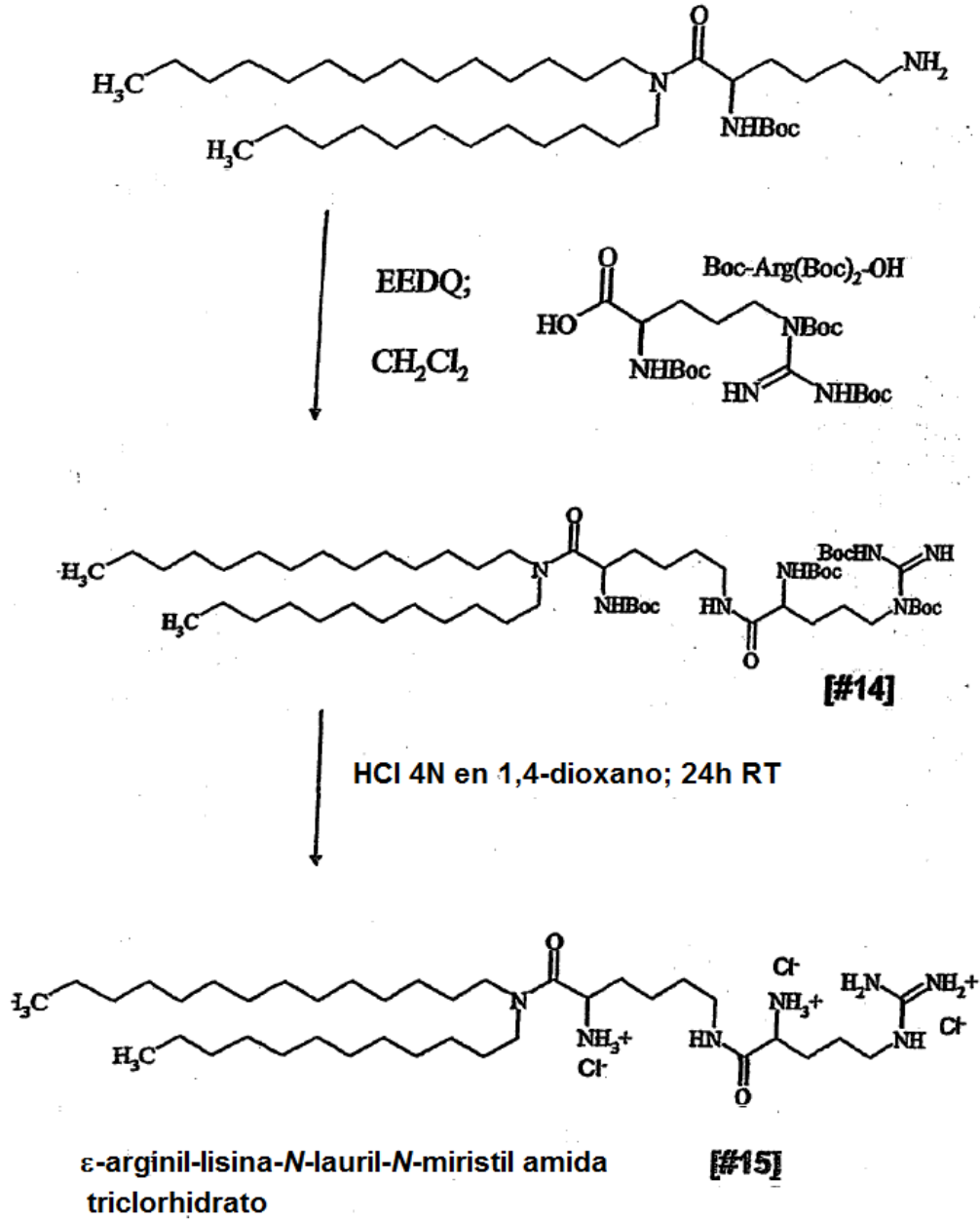
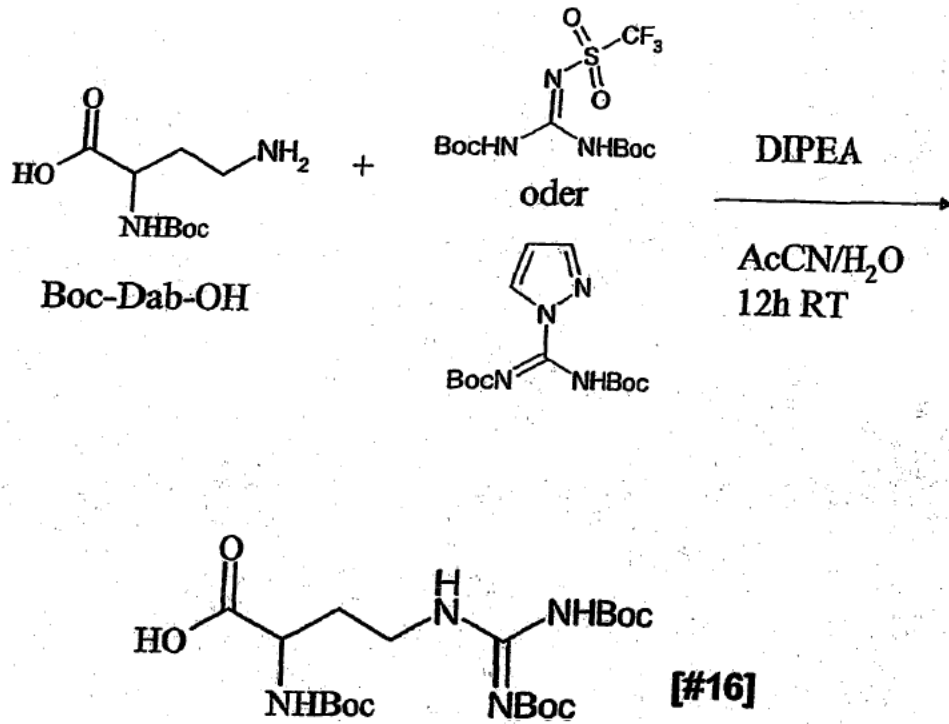


Figura 10



ácido Tri-Boc- $\gamma$ -carbamidino- $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico

Fig: 11- Parte 1

Ruta de síntesis alternativa

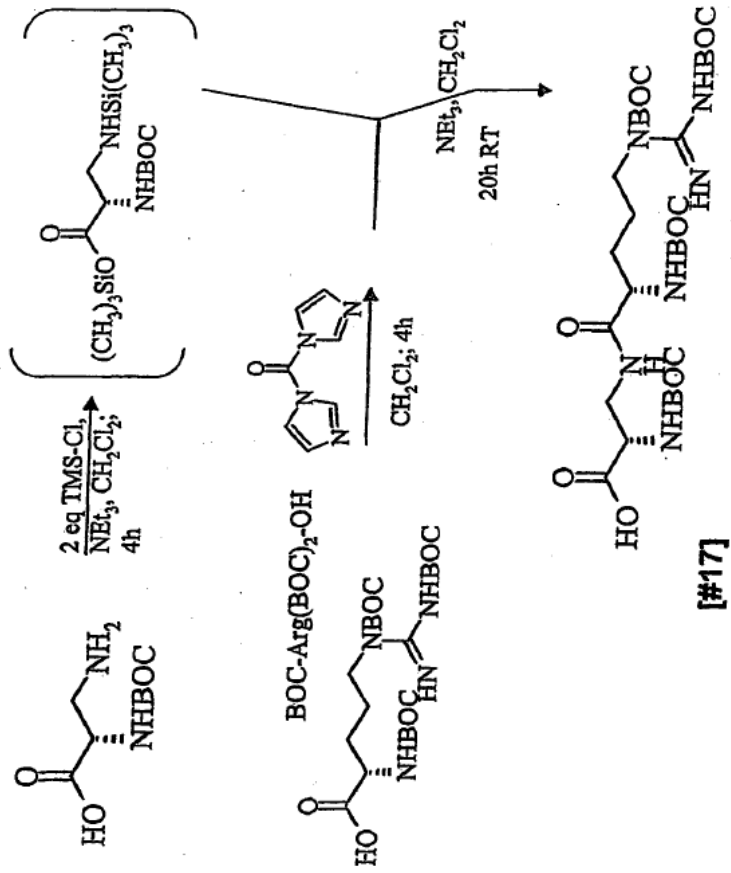
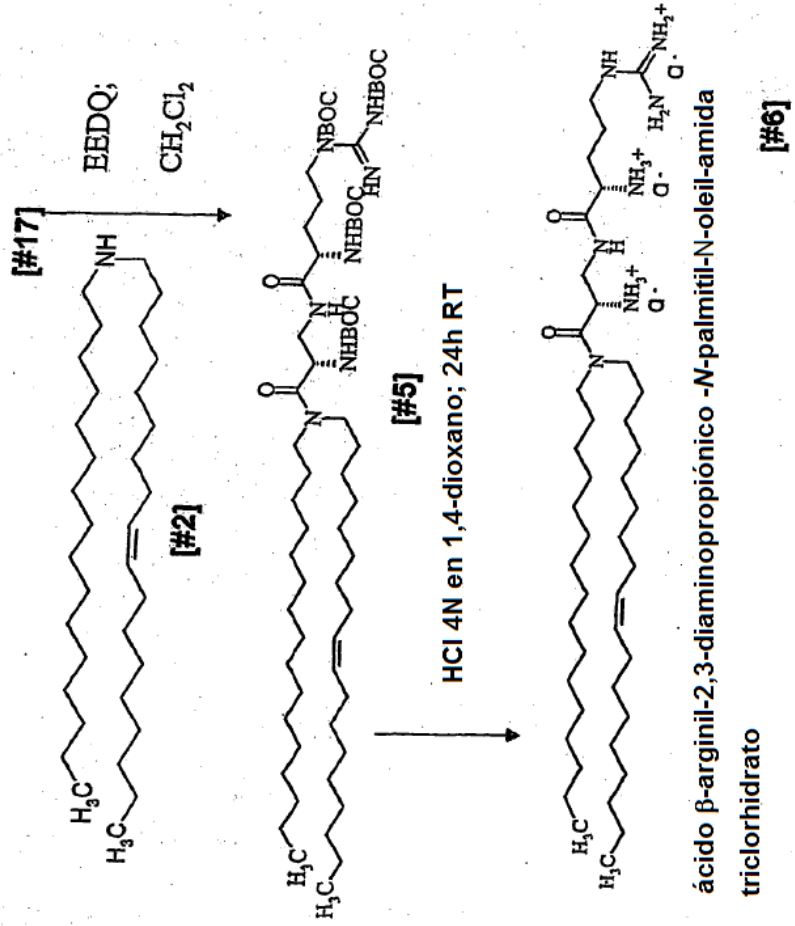
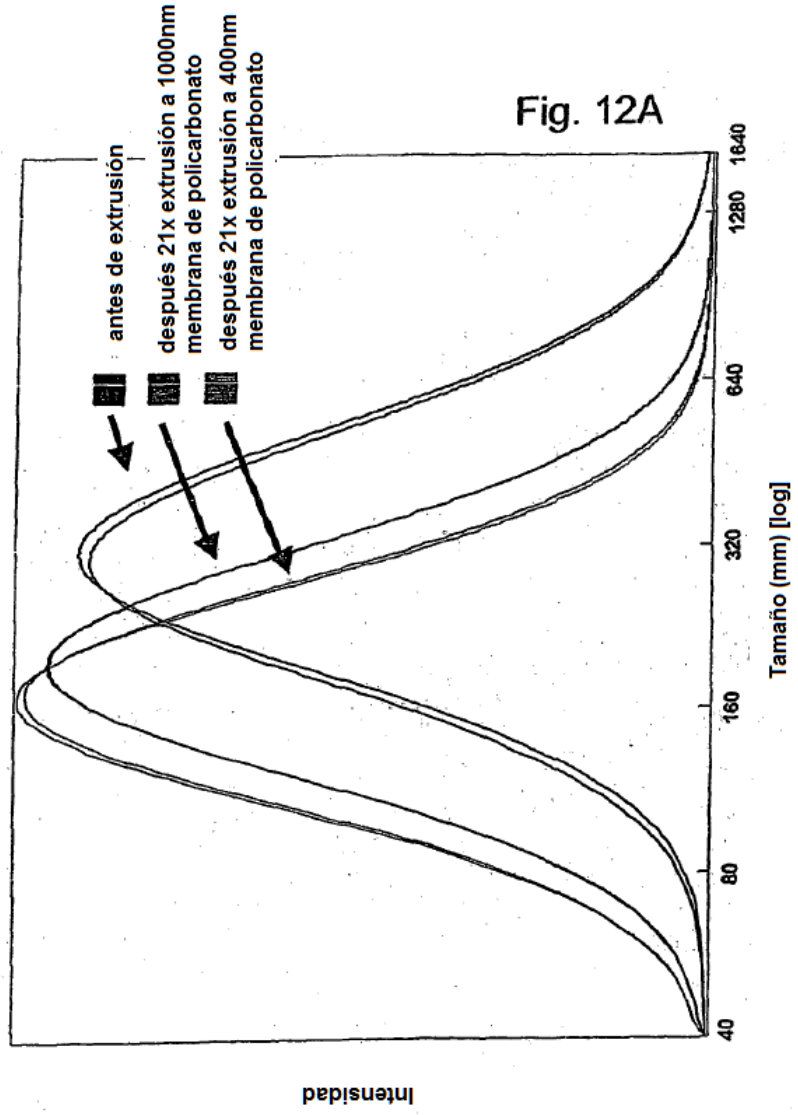


Fig. 11- Parte 2



**Clasificación del tamaño por extrusión de atufect-liposomas**  
como se determina por espectroscopia de correlación de fotones  
con analizador de partículas submicras Beckman-Coulter N5

superposición de distribución unimodal para 90.0°



### Clasificación del tamaño por homogeneización de alta presión de atufect-liposomas

como se determina por espectroscopia de correlación de fotones con analizador de partículas submicras Beckman-Coulter N5

superposición de distribución unimodal para 90.0°

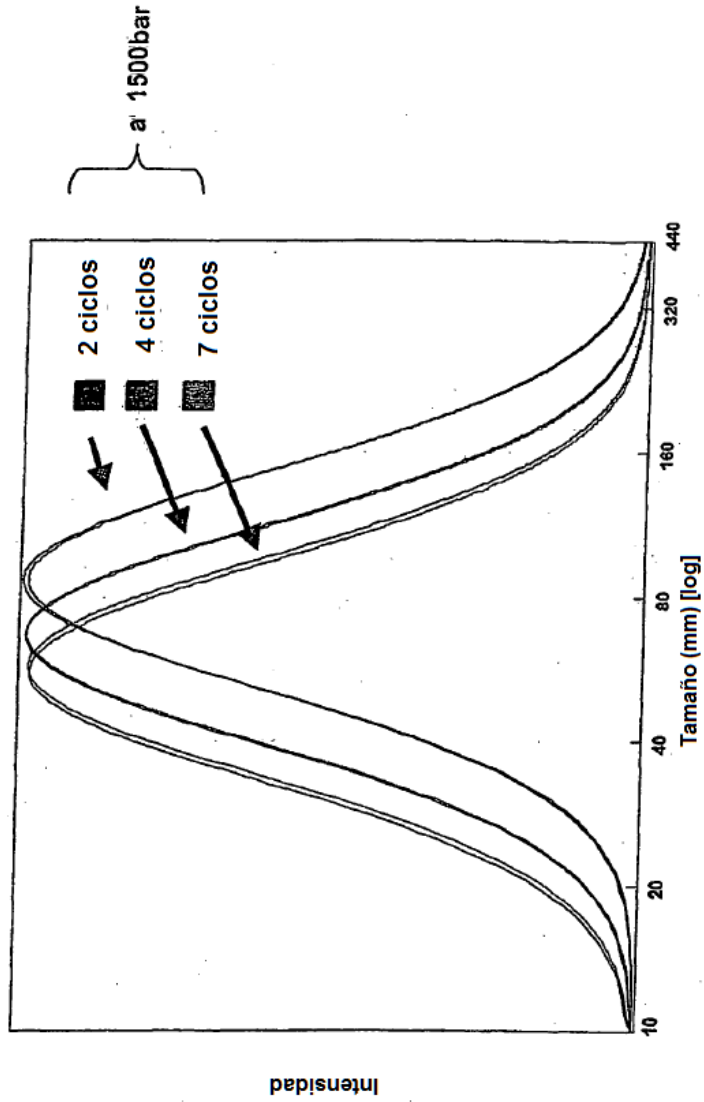


Fig. 12B

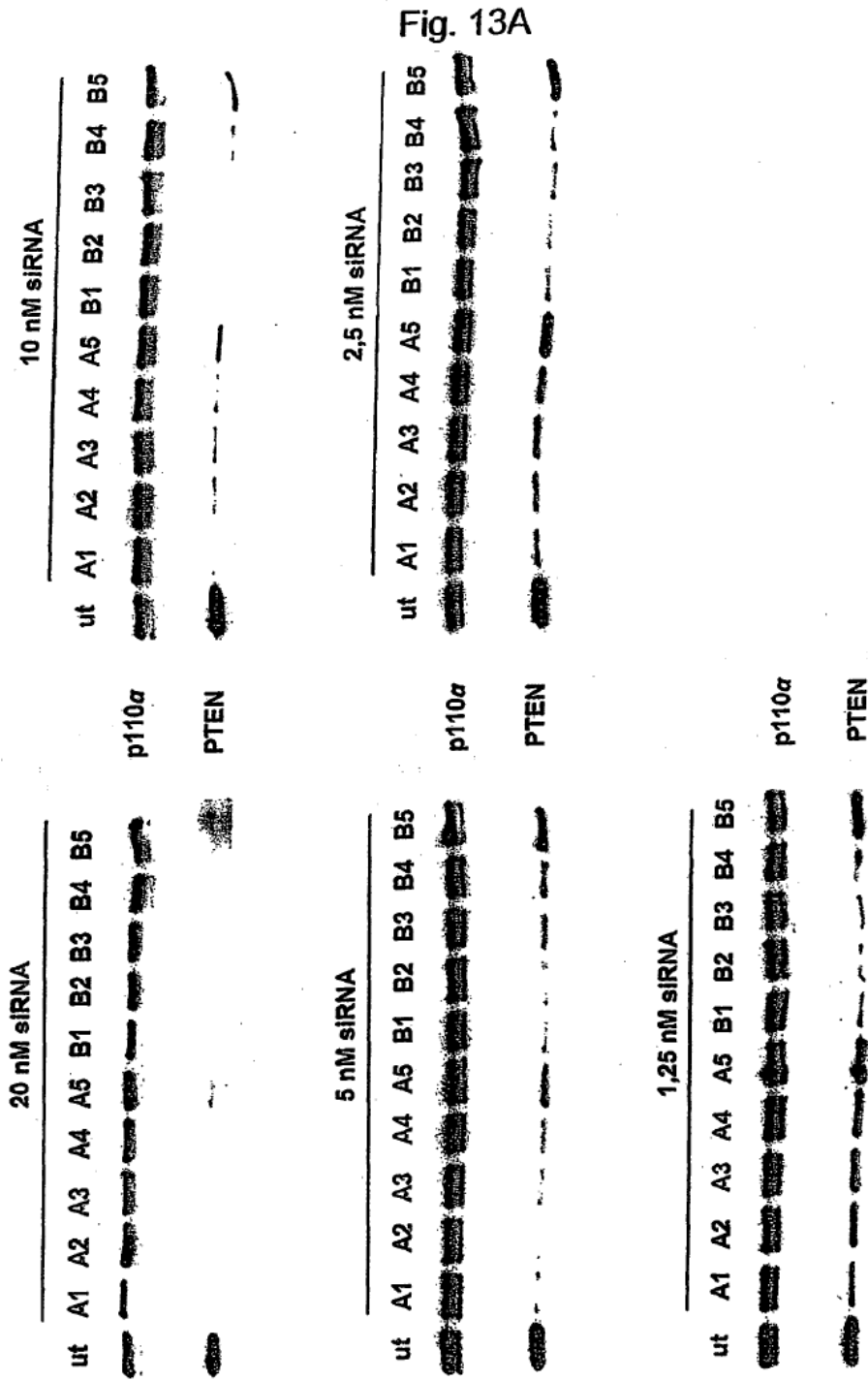


Fig. 13B

