

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 728**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007 E 07724432 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2007356**

54 Título: **Formulaciones de lipoplexo para la administración específica al endotelio vascular**

30 Prioridad:

20.04.2006 EP 06008209

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

02.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KAUFMANN, JÖRG;
KEIL, OLIVER y
SANTEL, ANSGAR**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 549 728 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

Formulaciones de lipoplexo para la administración específica al endotelio vascular

La presente invención se refiere a una composición de lípidos y al uso de la misma.

5 Aunque la administración de compuestos farmacéuticamente activos ya ha atraído considerable atención en el pasado, con la llegada de nuevos agentes terapéuticos tales como oligonucleótidos antisentido y moléculas de ARNsi que son activos dentro de la célula, la necesidad de la administración intracelular se ha convertido en más importantes y varias estrategias se han perseguido hasta ahora.

10 En un primer paso hacia el desarrollo de terapias de ARNsi, se incrementó la estabilidad de las moléculas de ARNsi mediante la incorporación de diferentes modificaciones del esqueleto químico lo que prevenía la degradación de estas moléculas por las nucleasas (Chiu y Rana, 2003; Czauderna et al, 2003; Morrissey et al, 2005; Soutschek et al, 2004). Por ejemplo, se desarrollaron moléculas de ARNsi de extremos romos con la alternancia de patrones de modificación 2'-O-metilo en ambas cadenas, que son significativamente más resistentes a las nucleasas derivadas de mamífero después de la transfección (Czauderna et al., 2003). Más allá de la cuestión de la estabilidad, la administración funcional de moléculas de ARNsi *in vivo* sigue siendo el principal obstáculo y un requisito previo para el desarrollo de terapias de ARNsi (Uprichard, 2005). Una aplicación sistémica efectiva, no tóxica de terapias basadas en ARNsi aún no ha sido desarrollada para la aplicación clínica debido a la falta de tecnologías de administración no víricas apropiadas.

20 Una tecnología de administración exitosa particularmente en el caso de agentes intracelularmente activos tales como ARNsi necesita abordar varios problemas, incluyendo la captación intracelular funcional de los ARNsis muy negativamente cargados, las propiedades farmacodinámicas para la administración específica *in vivo* a órganos y células, y finalmente los efectos secundarios tóxicos potenciales debidos a la formulación de ARNsi. Una estrategia ampliamente probada para la administración *in vivo* de oligonucleótidos antisentido para superar estos problemas, es la alteración química directa del ácido nucleico. Estas modificaciones químicas son o bien modificaciones del esqueleto (Morrissey et al., 2005) o conjugados con entidades que median la captación tales como péptidos transportadores (Muratovska y Eccles, 2004; Richard et al, 2003; Shadidi y Sioud, 2003; Turner et al, 2005) o residuos hidrófobos (por ejemplo, colesterol (Soutschek et al., 2004)). Varios reactivos se han empleado para la administración iv sistémica de ARNsis en ratones como una alternativa a las modificaciones covalentes de ARNsis. Vehículos cargados positivamente, tales como proteínas de fusión protamina-anticuerpo, nanopartículas, ciclodextrinas que contienen policationes, PEI y atelocolágeno se han probado para la formación de complejos con ARNsis para la administración *in vivo* (Chae et al., 2004; Hu-Lieskovan et al., 2005 ; Landen et al, 2005; Schifferlers et al, 2004; Song et al., 2005; Takeshita et al., 2005; Urban-Klein et al, 2005). Con el fin de lograr la administración de tipo celular más específica de ARNsis, algunos grupos han incorporado o conjugado ligandos de receptores (Hu-Lieskovan et al., 2005) o anticuerpos para la diana celular (Song et al., 2005).

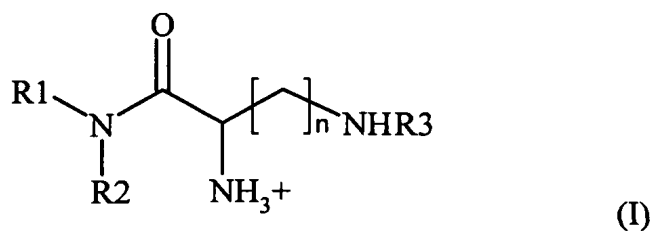
35 Los lípidos catiónicos se utilizan rutinariamente para la administración de ácidos nucleicos a las células de los mamíferos *in vitro* (Felgner et al., 1987), y la administración iv sistémica de lipoplexos (compuestos de un lípido catiónico, lípido neutral auxiliar y ácido nucleico) se ha aplicado en la administración de genes y ARNsi *in vivo* (Barron et al., 1999; Chae et al., 2004; Chien et al., 2005; Liu et al., 2004; Morrissey et al, 2005; Nogawa et al, 2005; Yano et al., 2004). Sin embargo, la mayoría de los estudios anteriores fueron diseñados para la prueba de concepto, pero no proporcionan información sobre el comportamiento farmacodinámico y posible toxicidad de la formulación de ARNsi aplicada. Esta información es un requisito previo para su posterior desarrollo clínico con respecto a una evaluación justa de beneficio-riesgo de la tecnología específica de administración. Por ejemplo, la biodisponibilidad, la administración específica de tipo celular y la farmacocinética *in vivo* (dependiendo de las rutas de administración, iv, subcutánea, oral) son parámetros importantes para su evaluación, además de la demostración de la eficacia *in vivo* del silenciamiento de los genes. Mientras que un gran número de estudios previos describen las propiedades *in vivo* de diversos oligonucleótidos antisentido modificados, solamente se sabe un poco sobre el comportamiento farmacodinámico del ARNsi no formulado o formulado y sus análogos químicamente modificados *in vivo*. La inyección intravenosa de ARNsis modificados químicamente produjo una amplia distribución en los tejido con la acumulación preferentemente en el hígado, el yeyuno y el riñón (Braasch et al, 2004; Soutschek et al., 2004). En otro estudio, ARNsi marcado radiactivamente se detectó predominantemente en el músculo y tejido tumoral de ratones xenoinjertados, y poco en hígado y riñón cuando se administró intraperitonealmente como un complejo PEI (Urban-Klein et al., 2005). Sin embargo, estos estudios no discriminan en cuanto a la administración a los muchos tipos de células diferentes presentes en cada órgano.

55 El problema subyacente de la presente invención es proporcionar un agente de administración para ácidos nucleicos funcionales tales como, pero no limitados a, ARNsi. Además, el problema subyacente de la presente invención es proporcionar un agente de administración para ácidos nucleicos funcionales, tales como, pero no limitados a, ARNsi, por medio del cual la administración es específica para el endotelio, y más particularmente específica para el endotelio vascular.

Estos y otros problemas se resuelven por la materia objeto de la presente invención. Más formas de realización preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes.

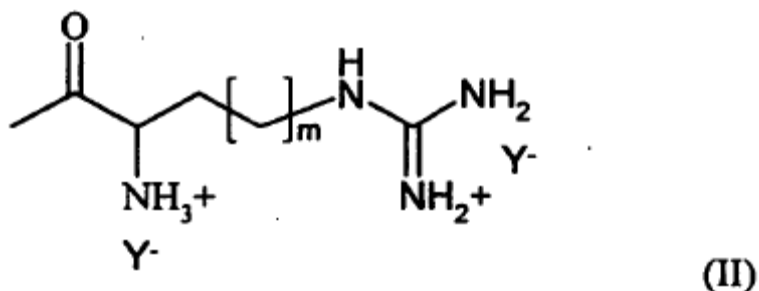
El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante una composición de lípidos contenida en y/o que contiene un vehículo que comprende

- 5 al menos un primer componente lípido,
al menos un primer lípido auxiliar, y
un compuesto protector que es opcionalmente desmontable de la composición de lípidos en condiciones in vivo,
en donde el vehículo que contiene la composición de lípidos tiene una osmolaridad de aproximadamente 50 a 600 mosmoles/kg, preferiblemente de aproximadamente 250 a 350 mosmoles/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 280 a 320 mosmoles/kg, y/o
- 10 en donde los liposomas formados por el primer componente lípido y/o uno o ambos de los lípidos auxiliares y el compuesto protector en el vehículo tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 20 a 200 nm, preferiblemente de aproximadamente 30 a 100 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 80 nm.
- 15 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector se selecciona del grupo que comprende PEG, HEG, almidón de polihidroxietilo (polyHES) y polipropileno.
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector es PEG2000 o PEG5000.
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende un componente adicional y/o un segundo lípido auxiliar.
- 20 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector es un conjugado de PEG y ceramida.
En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la ceramida comprende al menos un sustituyente de cadena de carbono corta de 6 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 8 átomos de carbono.
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, la ceramida es el primero lípido auxiliar.
- 25 En una forma de realización alternativa del primer aspecto de la presente invención, la ceramida es el segundo lípido auxiliar.
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector comprende un conector sensible al pH o un resto sensible al pH.
- 30 En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención el conector o resto es un conector aniónico o un resto aniónico.
En una forma de realización más preferida del primer aspecto de la presente invención el conector aniónico o resto aniónico es menos aniónico o neutro en un ambiente ácido, en donde preferiblemente tal ambiente ácido es un endosoma.
- 35 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención se selecciona el conector sensible al pH o el resto sensible al pH de entre el grupo que comprende oligo (ácido glutámico), oligofenolato(s) y ácido dietilentriamino penta acético.
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el primer componente lípido es un compuesto según la fórmula (I),



- 40 en donde R₁ y R₂ son cada uno e independientemente seleccionados de entre el grupo que comprende alquilo;
n es cualquier número entero entre 1 y 4;

R₃ es un acilo seleccionado entre el grupo que comprende lisilo, ornitilo, 2,4-diaminobutirilo, histidilo y un resto acilo según la fórmula (II),



en donde m es cualquier número entero de 1 a 3, en donde el NH₃⁺ está opcionalmente ausente, y

5 Y⁻ es un anión farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención R₁ y R₂ son cada uno e independientemente seleccionados del grupo que comprende laurilo, miristilo, palmitilo y oleilo.

En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención R₁ es laurilo y R₂ es miristilo; o

R₁ es palmitilo y R₂ es oleilo.

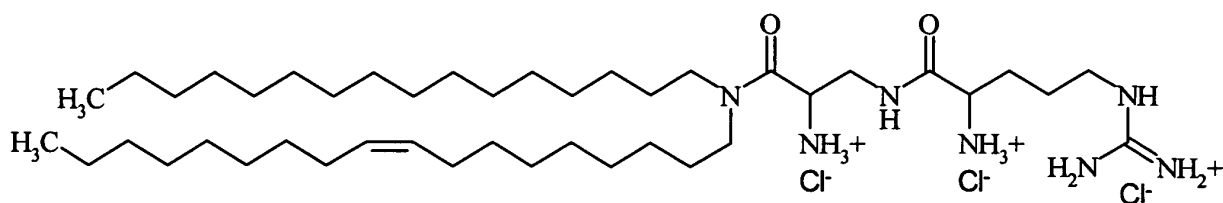
10 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención m es 1 o 2.

En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención el compuesto es un lípido catiónico, preferiblemente en asociación con un anión Y⁻.

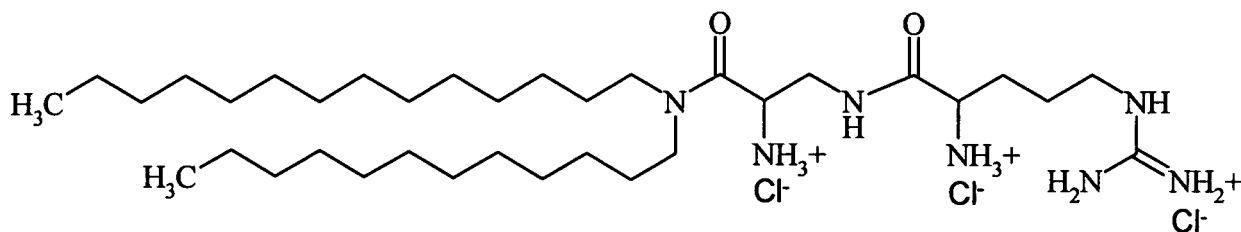
En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención Y⁻ se selecciona del grupo que comprende halogénidos, acetato y trifluoroacetato.

15 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención el compuesto se selecciona del grupo que comprende

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

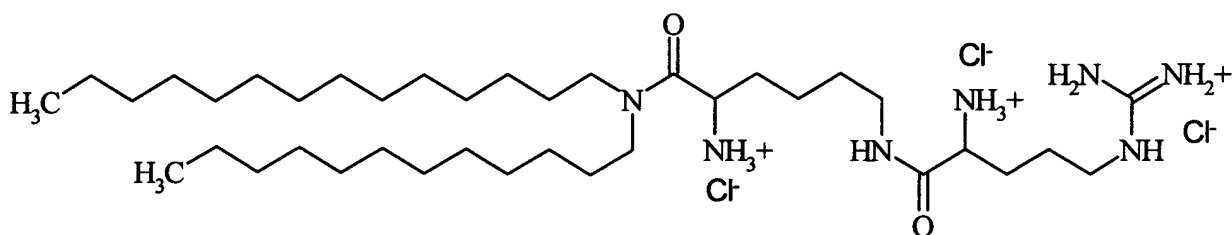


ácido β-arginil-2,3-diamino-propiónico-N-lauril-N-miristil-amida trihidrocloruro



20 y

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



- 5 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el primer aspecto de la presente invención, la osmolaridad se determina principalmente por un azúcar, en donde dicho azúcar se selecciona preferiblemente del grupo que comprende sacarosa, trehalosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa, lactulosa, inulina, rafinosa, y cualquier combinación de las mismas, más preferiblemente se selecciona del grupo que comprende sacarosa, trehalosa, inulina, rafinosa y cualquier combinación de las mismas.
- 10 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el primer aspecto de la presente invención, la composición contiene uno o varios compuestos básicos, en donde tales compuestos básicos se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende aminoácidos básicos y bases débiles.
- En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, se selecciona el aminoácido del grupo que comprende histidina, lisina y arginina.
- En una forma de realización alternativa del primer aspecto de la presente invención, la base débil se selecciona entre el grupo que comprende TRIS y etanolamina.
- 15 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto básico proporciona el ajuste del pH.
- En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, la composición de lípidos comprende un ácido nucleico, por lo que dicho ácido nucleico es preferiblemente el constituyente ulterior.
- En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención, se selecciona el ácido nucleico del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros.
- 20 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector está unido al ácido nucleico.
- En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el compuesto protector está unido al ácido nucleico por un resto conector preferiblemente unido covalentemente al ácido nucleico por un resto conector.
- 25 En una forma de realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el resto conector se selecciona del grupo que comprende ARNss, ADNss, ARNds, ADNds, péptidos, conectores S-S y conectores sensibles al pH.
- En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención se selecciona el ácido nucleico del grupo que comprende ARNi, ARNsi y ANsi y el conector está unido al extremo 3' de la hebra sentido.
- 30 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, la composición comprende un ácido nucleico y el ácido nucleico forma junto con un/el liposoma un lipoplexo.
- En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, la concentración de lípidos en el vehículo es aproximadamente de 0,01 a 100 mg/ml, preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 40 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 25 mg/ml, cada uno basado en la cantidad total de lípido proporcionada por el lipoplexo.
- 35 En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención, el ácido nucleico es un ARNsi y la concentración del ARNsi en la composición de lípidos es de aproximadamente de 0,2 a 0,4 mg/ml, preferiblemente 0,28 mg/ml, y la concentración total de lípidos es de aproximadamente 1,5 a 2,7 mg/ml, preferiblemente 2,17 mg/ml.
- 40 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende una composición según el primer aspecto de la presente invención y opcionalmente un compuesto farmacéuticamente activo y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En una forma de realización del segundo aspecto de la presente invención, el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente ulterior se seleccionan del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.

En una forma de realización del segundo aspecto de la presente invención, la proteína es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

En una forma de realización del segundo aspecto de la presente invención se selecciona el ácido nucleico del grupo que comprende ADN, ARN, APN y ALN.

- 5 En una forma de realización del segundo aspecto de la presente invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, por lo que preferiblemente el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espejélmeros.

10 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, el primero de los lípidos auxiliares y/o el segundo lípido auxiliar se selecciona entre el grupo que comprende fosfolípidos y esteroides, preferentemente con la condición de que el primer y/o el segundo lípido auxiliar sea diferente de una ceramida.

En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el primer y/o segundo lípido auxiliar y/o componente lípido auxiliar se selecciona del grupo que comprende 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

15 En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el contenido del componente lípido auxiliar es de aproximadamente 20 moles% a aproximadamente 80 moles% del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el contenido del componente lípido auxiliar es de aproximadamente 35 moles% a aproximadamente 65 moles%.

20 En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el lípido es el ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, y el lípido auxiliar es 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el lípido es 50 moles% y el lípido auxiliar es 50 moles% del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

25 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición comprende además un segundo lípido auxiliar.

30 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, el primer y/o el segundo lípido auxiliar comprende un grupo que se selecciona del grupo que comprende un resto PEG, un resto HEG, un resto de almidón de polihidroxietilo (polyHES) y un resto de polipropileno, en el que dicho resto proporciona preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 10.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2.000 a 5.000 Da.

En una forma de realización preferida de primer y segundo aspecto de la presente invención, se selecciona el lípido auxiliar que comprende el resto de PEG del grupo que comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dialquil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

35 En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el resto 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 forma de realización preferida del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición comprende como componente lípido el ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, como un primer lípido auxiliar 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y como un segundo lípido auxiliar 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000.

40 En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el contenido del segundo lípido auxiliar es de aproximadamente 0,05 moles% a 4,9 moles%, preferiblemente de aproximadamente 1 a 2 moles% del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

45 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición contiene de aproximadamente 1 a 10 moles%, más preferiblemente de 1 a 7,5 moles% y más preferiblemente de 1 a 5 moles% del conjugado de PEG y la ceramida del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

En una forma de realización preferida del primer y segundo aspecto de la presente invención, la ceramida es C8m y PEG es PEG 2.000 y en donde el contenido del conjugado de PEG y la ceramida es de aproximadamente 1 a 5 moles% del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

50 En una forma de realización preferida alternativa del primer y segundo aspecto de la presente invención, la ceramida es C8m y el PEG es PEG5.000 en donde el contenido del conjugado de PEG y la ceramida es de aproximadamente 1 a 5 moles% del contenido total de lípidos de la composición o del lipoplexo.

En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, el contenido del primer componente lípido es de aproximadamente 42,5 moles% a 50 moles%, y el contenido del primer lípido auxiliar es de aproximadamente 42,5 a 50 moles%, por lo que la suma del contenido del primer componente lípido, del primer lípido auxiliar y del conjugado de PEG y la ceramida es de 100 moles%.

- 5 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición comprende además un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional que es más preferiblemente un ácido ribonucleico de doble hebra y lo más preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido y ribozima, en donde preferiblemente la relación molar de ARNi a lípido catiónico es de aproximadamente 0 a 0,075, preferiblemente de aproximadamente 0,02 a 0,05 y aún más preferiblemente 0,037.

En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, el vehículo es un medio acuoso, preferiblemente un azúcar que contiene una solución acuosa isotónica, y en donde la composición de lípidos contenida en el vehículo está presente como una dispersión, preferiblemente en forma de una dispersión de liposomas y/o lipoplexos.

- 15 En una forma de realización de cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición lípida comprende aproximadamente 50 moles% del ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, aproximadamente de 48 a 49 moles% de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, y aproximadamente de 1 a 2 moles% de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol y el vehículo es una solución acuosa.

- 20 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto por un lipoplexo, que es preferiblemente una composición según cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención, o contenido en dicha composición, que comprende:

a) un liposoma cargado positivamente que consiste en

- 25 aa) aproximadamente 50 moles% del ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, preferiblemente el ácido (β -(L-arginil-2,3-L-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro)

ab) aproximadamente de 48 a 49 moles% de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE)

- 30 ac) aproximadamente de 1 a 2 moles% de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol, preferiblemente la sal de sodio de N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y

b) un ácido nucleico funcional, preferiblemente un ARNsi.

En una forma de realización del tercer aspecto de la presente invención, el potencial zeta del lipoplexo es de aproximadamente 40 a 55 mV, preferiblemente de aproximadamente 45 a 50 mV.

- 35 En una forma de realización del tercer aspecto de la presente invención, el lipoplexo tiene un tamaño de aproximadamente 80 a 200 nm, preferiblemente de aproximadamente 100 a 140 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 110 nm a 130 nm, según lo determinado por QELS.

En una forma de realización alternativa, el lipoplexo tiene un tamaño de aproximadamente 60 nm, según se determina preferiblemente por QELS.

- 40 En una forma de realización del primer y segundo aspecto de la presente invención, la composición comprende un lipoplexo según el tercer aspecto de la presente invención.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto mediante el uso de una composición según cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención o de un lipoplexo según el tercer aspecto de la presente invención, para la fabricación de un medicamento.

- 45 En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, el medicamento es para la administración de un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional, al endotelio, preferiblemente al endotelio vascular.

En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad dependiente de la angiogénesis.

En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad de cáncer, más preferiblemente un tumor sólido.

- 50 En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende enfermedades neoplásicas, más preferiblemente las enfermedades se seleccionan del grupo que

comprende cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del sistema digestivo, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urogenital, cáncer pancreático, cáncer pituitario, cáncer testicular, cáncer orbital, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central y cáncer del sistema respiratorio.

- 5 En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, el medicamento se utiliza en combinación con una o varias otras terapias.

En una forma de realización del cuarto aspecto de la presente invención, la terapia se selecciona del grupo que comprende quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia con anticuerpos y terapia de radiación.

- 10 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un quinto aspecto mediante el uso de una composición según cualquiera del primer y segundo aspecto o de un lipoplexo según el tercer aspecto de la presente invención, como un agente de transferencia.

En una forma de realización del quinto aspecto de la presente invención, el agente de transferencia transfiere un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es preferiblemente el ácido nucleico contenido en la composición o el ácido nucleico es preferiblemente el componente de ácido nucleico del lipoplexo.

- 15 En una forma de realización del quinto aspecto de la presente invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, preferiblemente un ARNsi.

En una forma de realización del quinto aspecto de la presente invención, el agente de transferencia es específico para el endotelio, preferiblemente el endotelio vascular.

- 20 En una forma de realización del quinto aspecto de la presente invención, el agente de transferencia transfiere un componente farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional a una célula, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula humana.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un sexto aspecto mediante un método para la transferencia de un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional a una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que comprende las siguientes etapas:

- 25 - proporcionar la célula o la membrana;
- proporcionar una composición según cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención o un lipoplexo según el tercer aspecto de la presente invención, en donde la composición comprende opcionalmente el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente ulterior; y
- 30 - poner en contacto la célula o la membrana con la composición según cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención o un lipoplexo según el tercer aspecto de la presente invención.

En una forma de realización del sexto aspecto de la presente invención, el método comprende, como etapa adicional:

- detectar el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente ulterior en la célula y/o más allá de la membrana.
- 35 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que en contraste con las moléculas desnudas o no formuladas de ARNsi, los lipoplexos de ARNsi fueron fuertemente captados por el endotelio vascular. La captación observada del lipoplexo de ARNsi in vivo se correlacionó con la eficacia de ARNi por medio de análisis de caída(knockdown). Una administración iv sistémica repetida de lipoplexos de ARNsi de diana específica dio como resultado una caída clara de mRNA así como de la proteína de los genes diana expresados específicamente en el
- 40 endotelio lo que demuestra la captación funcional y la actividad de silenciamiento mediada por ARNi. Por lo tanto, la composición de lípidos descrita en este documento es particularmente útil para la administración específica al o la dirección al endotelio/células endoteliales, más específicamente al endotelio vascular.

- 45 Además, los presentes inventores se han dado cuenta de que con respecto al primer componente lípido se requiere una menor cantidad de lípidos en comparación con composiciones de lípidos de la técnica anterior para complejar las moléculas de ARNsi debido a la composición de lípidos de la presente invención. También sorprendentemente usando la composición de lípidos de la presente invención, no se ha observado ni una respuesta de interferón inespecífica, indicada por un aumento en la expresión de los genes sensibles al interferón OAS-1 y OAS-2 en las células HeLa, ni ninguna inducción de citoquinas IFN-gamma e IL-12 usando la composición de lípidos según la presente invención.

- 50 Por último, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que usando la composición de lípidos de la presente invención, no sólo hay una absorción relativamente específica de dicha composición y de los lipoplexos formados de la misma, sino, lo más importante, una administración funcional y liberación del endosoma específicas

de la célula después de la absorción endocitótica por las células endoteliales. Esto último es crucial en la medida en que solamente después de la liberación de los agentes funcionalmente activos, tales como un ácido nucleico funcional y, en particular, un ARNsi, puede dicho agente funcionalmente activo ejercer sus efectos a nivel celular.

5 En vista de esto, la composición de lípidos y el lipoplexo como se describe en este documento, particularmente si se usa como una formulación farmacéutica para la administración de un ácido nucleico funcional, incluyendo, pero no limitado a, ARNsi, pueden ser utilizados para el tratamiento y prevención, respectivamente, de diversas enfermedades, incluyendo, pero no limitado a, la leucemia y cánceres sólidos dependientes de la neo-angiogénesis, incluyendo pero no limitado a las categorías de carcinoma, sarcoma y linfoma y otras neoplasias tales como cualquier tipo de cáncer y tumores, respectivamente, de, por ejemplo, hueso, mama, próstata, sistema digestivo, colorrectal, hígado, pulmón, riñón, urogenital, páncreas, hipófisis, testicular, orbital, cabeza y cuello, sistema nervioso central, y respiratorio. Otras enfermedades para las que se pueden utilizar dicho medicamento y formulación farmacéutica son los accidentes cerebrovasculares, úlceras, aterosclerosis y artritis reumatoide, todas las cuales se caracterizan por una angiogénesis ya sea excesiva o insuficiente. En otras palabras, la composición de lípidos y el lipoplexo, respectivamente, de la presente invención pueden ser utilizados para terapias tanto pro- como anti-angiogénicas y por lo tanto para la fabricación de un medicamento para mejorar o aumentar la angiogénesis, o un medicamento para disminuir la angiogénesis.

Además, este tipo de medicamento y la formulación farmacéutica, respectivamente, podrían ser utilizados en combinación con otros tratamientos, tales como la quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia de anticuerpos tales como la terapia de anticuerpos monoclonales y la terapia de anticuerpos VEGF-monoclonales, en particular, la terapia de radiación, y similares.

Enfermedades específicas adicionales que, en principio, pueden ser tratadas mediante este tipo de formulación farmacéutica y el medicamento que comprende dicha composición de lípidos y lipoplexo, respectivamente, se pueden tomar de la siguiente lista: leucemia linfoblástica aguda (Adultos), leucemia linfoblástica aguda (Infancia), leucemia mieloide aguda (Adultos), leucemia mieloide aguda (Infancia), carcinoma adrenocortical, carcinoma adrenocortical (Infancia), los cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, el cáncer anal, astrocitoma (Infancia), astrocitoma cerebral (Infancia), cáncer del conducto biliar, extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga (Infancia), cáncer de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico (Infancia), tumor cerebral (Adultos), tumor cerebral, glioma del tallo cerebral (Infancia), tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (Infancia), tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno (Infancia), tumor cerebral, ependimoma (Infancia), tumor cerebral, meduloblastoma (Infancia), tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (Infancia), tumor cerebral, glioma de las vías ópticas y del hipotálamo (Infancia), tumor cerebral (Infancia), cáncer de mama, cáncer de mama (Infancia), cáncer de mama, Hombre, adenomas/carcinoides bronquiales (Infancia), linfoma de Burkitt, tumor carcinoide (Infancia), tumor carcinoide, gastrointestinal, carcinoma primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, primario, astrocitoma cerebeloso (Infancia), astrocitoma cerebral/glioma maligno (Infancia), cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal (Infancia), linfoma de células T cutáneas, cáncer endometrial, ependimoma (Infancia), cáncer de esófago, cáncer de esófago (Infancia), familia de tumores de Ewing, tumores de células germinales extracraneales (Infancia), tumores de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, Cáncer de ojo, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), cáncer gástrico (de estómago) (Infancia), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de células germinales, extracraneal, (Infancia), tumores de células germinales, extragonadales, tumor de células germinales, de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma (Adultos), glioma (Infancia) tallo cerebral, glioma (Infancia) astrocitoma cerebral, glioma (Infancia) de las vías ópticas y del hipotálamo, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado) (Adultos) (primario), cáncer hepatocelular (hígado) (Infancia) (primario), linfoma de Hodgkin (Adultos), linfoma de Hodgkin (Infancia), cáncer de la hipofaringe, hipotalámica y glioma de las vías visuales (Infancia), melanoma intraocular, carcinoma de células Islet (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de riñón (Infancia), cáncer de laringe, cáncer de laringe (Infancia), leucemia linfoblástica aguda, (Adultos), leucemia linfoblástica aguda (Infancia), leucemia mieloide aguda (Adultos), leucemia mieloide aguda (Infancia), leucemia, leucemia linfocítica crónica, mielógena crónica, leucemia, células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado (Adultos) (primario), cáncer de hígado (Infancia) (primario), cáncer de pulmón de células grandes, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma, relacionado con el SIDA, linfoma, de Burkitt, linfoma, de células T cutáneas, linfoma, de Hodgkin (Adultos), linfoma, de Hodgkin (Infancia), linfoma, no Hodgkin (Adultos), linfoma, no Hodgkin (Infancia), linfoma, sistema nervioso central primario, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno de Waldenstrom de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma (Infancia), melanoma, melanoma, intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma (Adultos) maligno, mesotelioma (Infancia), cáncer del cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, síndrome de neoplasia endocrina múltiple (Infancia), mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, crónica, leucemia mieloide (Adultos) aguda, leucemia mieloide (Infancia) aguda, mieloma, múltiple, trastornos mieloproliferativos, crónicos, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, cáncer nasofaríngeo (Infancia), neuroblastoma, linfoma no Hodgkin (Adultos), linfoma no Hodgkin (Infancia), cáncer de pulmón de células grandes, cáncer oral (Infancia), cáncer oral de la cavidad, de labios y de la orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de los huesos, cáncer de ovario, (Infancia), cáncer ovárico epitelial, tumor

de células germinales del ovario, tumor de bajo potencial maligno del ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático (Infancia), cáncer pancreático, células de los islotes, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, pineoblastoma y Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (Infancia), tumor de la hipófisis, Neoplasia/mieloma múltiple de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, embarazo y cáncer de mama, embarazo y linfoma de Hodgkin, embarazo y linfoma no-Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer del recto, cáncer de células renales (riñón), cáncer de células renales (riñón) (Infancia), pelvis renal y del uréter, cáncer de células de transición, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, (Infancia), cáncer de glándula salival, cáncer de glándula salival, (Infancia), sarcoma, de Ewing, sarcoma, de Kaposi, sarcoma, tejido blando (Adultos), sarcoma, tejido blando (Infancia), sarcoma, uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (Infancia), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel, de células de Merkel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, (Adultos), sarcoma de tejidos blandos, (Infancia), carcinoma de células escamosas, cáncer del cuello escamoso con tumor primario oculto, cáncer de estómago metastásico (gástrico), cáncer de estómago (gástrico) (Infancia), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (Infancia), linfoma de células T, cutáneas, cáncer testicular, timoma (Infancia), timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides (Infancia), cáncer de células de transición de la pelvis renal y del uréter, tumor trofoblástico, gestacional, uréter y pelvis renal, cáncer de células de transición, cáncer de la uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, endometrial, cáncer vaginal, glioma de las vías ópticas y del hipotálamo, (Infancia), cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms.

La composición de lípidos y lipoplexos que muestran este tipo de especificidad se caracterizan a continuación.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que se puede lograr una administración muy eficaz en aplicaciones *in vivo* de ácidos nucleicos, en particular de los ácidos nucleicos pequeños tales como ARNi, ARNsi y ANsi, mediante el uso de una composición de lípidos que comprende al menos un primer componente lípido, al menos un primer lípido auxiliar y un compuesto protector. Preferiblemente, el primero de los lípidos es un lípido auxiliar neutral, es decir, de carga neutra o libre de carga. Tal composición de lípidos suelen encontrarse en un vehículo, sin embargo, también puede estar presente en una forma liofilizada. La composición de lípidos contenida en un vehículo suele formar una dispersión. Más preferiblemente, el vehículo es un medio acuoso o una solución acuosa como también se caracteriza adicionalmente en este documento. La composición de lípidos forma típicamente un liposoma en el vehículo, por lo que dicho liposoma contiene también preferiblemente el vehículo dentro.

La composición de lípidos contenida en el vehículo y el vehículo, respectivamente, preferiblemente tienen una osmolaridad de aproximadamente 50 a 600 mosmoles/kg, preferiblemente de aproximadamente 250 a 350 mosmoles/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 280 a 320 mosmoles/kg.

Los liposomas formados preferiblemente por el primer componente lípido y opcionalmente también por el primer auxiliar lípido, preferiblemente en combinación con el primer componente lípido, presentan preferentemente un tamaño de partícula de aproximadamente 20 a 200 nm, preferiblemente de aproximadamente 30 a 100 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 80 nm.

Además, se reconocerá que el tamaño de partícula sigue una cierta distribución. Una distribución de tamaño de partícula en la medida representativa se representa en la Fig. 1c que como tal es, en principio, aplicable también a otros tamaños promedio de partículas, es decir, liposomas y lipoplexos, respectivamente.

Una característica opcional adicional de la composición de lípidos según la presente invención es que el pH del vehículo es preferiblemente de aproximadamente 4,0 a 6,0. Sin embargo, también otros intervalos de pH tales como de 4,5 a 8,0, preferiblemente de aproximadamente 5,5 a 7,5 y más preferiblemente de aproximadamente 6,0 a 7,0 están dentro de la presente invención.

Para la realización de estas características particulares pueden tomarse diversas medidas como, como tales, conocidas por la persona experta en la técnica. Para ajustar la osmolaridad, por ejemplo, un azúcar o una combinación de azúcares es particularmente útil. En la medida, la composición de lípidos de la presente invención puede comprender uno o varios de los siguientes azúcares: sacarosa, trehalosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa, lactulosa, rafinosa, e inulina en donde la sacarosa, trehalosa, inulina y rafinosa son particularmente preferidas. En una forma de realización particularmente preferida, la osmolaridad principalmente ajustada con la adición de azúcar es de aproximadamente 300 mosmoles/kg lo que corresponde a una solución de sacarosa 270 mM o a una solución de glucosa 280 mM. Preferiblemente, el vehículo es isotónico con el fluido corporal en el que dicha composición de lípidos se va a administrar. Tal como se utiliza en este documento, el término que la osmolaridad se ajusta sobre todo con la adición de azúcar significa que al menos aproximadamente 80%, preferiblemente al menos aproximadamente 90% de la osmolaridad es proporcionada por dicho azúcar o una combinación de dichos azúcares.

Si se ajusta el pH de la composición de lípidos de la presente invención, esto se hace mediante el uso de sustancias tampón que, como tales, son básicamente conocidas por el experto en la técnica. Preferentemente, se utilizan sustancias básicas que son adecuadas para compensar las características básicas de los lípidos catiónicos y más específicamente del grupo de amonio del grupo de cabeza catiónico. Cuando se añaden sustancias básicas, tales

como aminoácidos básicos y bases débiles, respectivamente, la osmolaridad anterior debe ser tomada en consideración. El tamaño de partícula de dicha composición de lípidos y los liposomas formados por tal composición de lípidos se determina preferiblemente por dispersión dinámica de la luz (QELS), tal como, por ejemplo, mediante el uso de un analizador de tamaño de partícula submicrónico Beckman Coulter N5 según las recomendaciones del fabricante.

Si la composición de lípidos contiene uno o varios ácido(s) nucleico(s), tal composición de lípidos generalmente forma un complejo de lipoplexo, es decir, un complejo que consta de un liposoma y un ácido nucleico. La concentración más preferida del contenido total de lípidos en el lipoplexo es preferiblemente sacarosa isotónica 270 mM, o glucosa 280 mM es de aproximadamente 0,01 a 100 mg/ml, preferiblemente de 0,01 a 40 mg/ml y más preferiblemente de 0,01 a 25 mg/ml. Es preciso reconocer que esta concentración se puede aumentar a fin de preparar una solución madre razonable, típicamente dicho incremento es por un factor de 2 a 3. Está también dentro de la presente invención que en base a esto, se prepare una dilución, por lo cual tales diluciones se hacen típicamente de tal manera que la osmolaridad esté dentro del intervalo especificado anteriormente. Más preferiblemente, la dilución se prepara en un vehículo que es idéntico o en términos de función y más específicamente en términos de osmolaridad similar al vehículo utilizado en relación con la composición de lípidos o en el que la composición de lípidos está contenido. En la forma de realización de la composición de lípidos de la presente invención en donde la composición de lípidos también comprende un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional, tal como, pero no limitado a, un ARNsi, la concentración del ARNsi en la composición de lípidos es de aproximadamente 0,2 a 0,4 mg/ml, preferiblemente 0,28 mg/ml, y la concentración total de lípidos es de aproximadamente 1,5 a 2,7 mg/ml, preferiblemente 2,17 mg/ml. Es preciso reconocer que esta relación en masa entre la fracción de ácido nucleico y la fracción de lípidos es particularmente preferida, también con respecto a la relación de carga así realizada. En relación con cualquier concentración o dilución adicional de la composición de lípidos de la presente invención, se prefiere que la relación de masa y la relación de carga, respectivamente, realizada en esta forma de realización particular se mantenga preferiblemente a pesar de dicha concentración o dilución.

Dicha concentración tal como se utiliza, por ejemplo, en una composición farmacéutica, puede ser obtenida o mediante la dispersión del lípido en una cantidad adecuada de medio, preferentemente un tampón fisiológicamente aceptable o cualquier vehículo descrito en este documento, o se puede concentrar por medios apropiados. Tales medios apropiados son, por ejemplo, métodos de ultrafiltración, incluyendo la ultrafiltración de flujo cruzado. La membrana de filtro puede presentar una anchura de poros de 1,000 a 300,000 Da de peso molecular de corte (MWCO) o 5 nm a 1 μ m. Se prefiere particularmente una anchura de poro de aproximadamente 10,000 a 100,000 Da MWCO. También será reconocido por los expertos en la técnica que la composición de lípidos más específicamente, los lipoplexos según la presente invención pueden estar presentes en una forma liofilizada. Tal forma liofilizada es típicamente adecuada para aumentar el tiempo de almacenaje de un lipoplexo. El azúcar añadido, entre otros, para proporcionar la osmolaridad adecuada, se utiliza en esta conexión como un crioprotector. En relación con ello es necesario reconocer que las características antes mencionadas de osmolaridad, pH y concentración de lipoplexo se refieren a la forma disuelta, suspendida o dispersada de la composición de lípidos en un vehículo, en el que dicho vehículo es, en principio, cualquier vehículo descrito en este documento y por lo general un vehículo acuoso tal como agua o un tampón fisiológicamente aceptable, preferiblemente un tampón isotónico o solución isotónica.

El compuesto protector proporciona un tiempo de circulación in vivo más largo y por lo tanto permite una mejor biodistribución del ácido nucleico que contiene la composición de lípidos. Con este mecanismo, es posible dirigirlo a los sitios diana dentro de un cuerpo humano o animal, más específicamente en un cuerpo de un mamífero, que esté comparativamente a distancia del sitio de administración de tal composición de lípidos ya que la composición de lípidos no es absorbida inmediatamente por el tejido que rodea el lugar de la inyección, que es por lo general el revestimiento endotelial de la vasculatura cuando se realiza una administración intravenosa. El compuesto protector tal como se usa en el presente documento es preferiblemente un compuesto que evita la interacción inmediata de la composición de lípidos con compuestos del suero o compuestos de otros fluidos corporales o membranas citoplasmáticas, preferiblemente membranas citoplasmáticas del revestimiento endotelial de la vasculatura en la que la composición de lípidos se administra preferiblemente. El término protector también significa que los elementos del sistema inmunológico u otros mecanismos de defensa o de eliminación del cuerpo al que se administra dicha composición de lípidos, no interactúan inmediatamente con la composición de lípidos, de nuevo aumentando su tiempo de circulación en el organismo vivo. En la medida, el compuesto protector actúa como un compuesto anti-opsonizante. Sin pretender estar ligados 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 entorno que de otro modo daría lugar a la composición de lípidos fusionándose con otros lípidos o uniéndose a factores del cuerpo humano y animal, respectivamente, en un momento que es demasiado temprano para dicha interacción aunque hay que reconocer que en una etapa posterior, es decir, después de un tiempo prolongado tras la administración de la composición de lípidos, tal interacción por lo general se prefiere o se desea, al menos en cierta medida a fin de proporcionar la administración de la carga útil de los liposomas y lipoplexos, respectivamente. Otro mecanismo en el que la eficacia observada del compuesto protector parece basarse es la protección de la carga global 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 el presente documento y más

preferiblemente un ARNsi, ANsi y ARNi. Una vez más, la interacción de la composición de lípidos parece ser afectada, con lo cual surge el efecto de la protección de las cargas en lugar de los blindajes de los componentes lípidos. En relación con la presente descripción, es necesario reconocer que una composición puede comprender tan poco como un lípido.

5 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. Compuestos protectores particularmente preferidos son, pues, polietilenglicoles, polímeros basados en hidroxietilglucosa, almidón de polihidroxietilo (polyHES) y polipropileno, en donde cualquiera de dichos compuestos tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 10.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2,000 a 5.000 Da.

10 Es una característica importante de la presente invención que el compuesto protector sea preferiblemente desmontable de la composición de lípidos en condiciones in vivo. Tal eliminación puede, en una forma de realización, comprender la eliminación del compuesto protector per se, pero también puede comprender en una forma de realización diferente, la eliminación del compuesto protector junto con el compuesto al que el compuesto protector está unido covalentemente preferiblemente. Tal eliminación expone los otros componentes de la
15 composición de lípidos o parte de la misma al medio ambiente tal como el cuerpo del animal y el cuerpo humano, y en última instancia permite la liberación y entrega, respectivamente, de un compuesto tal como un ácido nucleico contenido en la composición de lípidos. El término condiciones in vivo significa preferentemente las condiciones existentes en un animal, más preferiblemente un cuerpo de mamífero, o cuerpo humano, preferiblemente en cualquier fluido corporal tal como sangre, fluido, líquidos intersticiales e intracelulares, y/o los existentes en un
20 endosoma y/o lisosoma. Dependiendo del diseño del compuesto protector, la eliminación puede ser afectada de varias maneras, como se describirá con más detalle a continuación.

Un efecto adicional que surge de la pérdida del agente protector, particularmente si el agente protector 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 entrega funcional disminuida de las moléculas de ácido nucleico a administrar por dicha
25 formulación de lípidos en el citoplasma. La presencia voluminosa del PEG en la formulación de lípidos disminuye la captación endosómica de los liposomas típicamente formados por la formulación de lípidos o interfiere con el escape endosómico necesario del ácido nucleico contenido o asociado con la composición de lípidos.

En una forma de realización, el compuesto protector se selecciona del grupo que comprende PEG, HEG, almidón de polihidroxietilo (poliHES) y polipropileno, que se une, preferiblemente se une covalentemente, a una ceramida. La
30 ceramida interactúa con el compuesto lípido y, si está presente, con un lípido auxiliar. En la medida, la ceramida puede ser el primero de lípidos auxiliares o un segundo lípido auxiliar. Se prefiere que la ceramida conjugada con PEG sea diferente del primer lípido auxiliar. La ceramida está típicamente embebida en la fracción de lípidos de la composición de lípidos preferiblemente formada por el primer componente lípido y el primer auxiliar lípido y se liberará debido a la cadena de hidrocarburo relativamente corta a una cierta velocidad. Cuando la ceramida es así
35 liberada de la composición de lípidos, también lo es el agente protector. Por lo tanto, en esta forma de realización, las condiciones in vitro permiten la desintegración de la formulación de lípidos y por lo tanto proporcionan un tiempo de vida o tiempo de circulación prolongado in vivo de la composición de lípidos.

En una forma de realización adicional, el agente protector está unido a un ácido nucleico contenido en la
40 composición de lípidos o asociado con el mismo. Preferiblemente, el agente protector está unido covalentemente al ácido nucleico, más preferiblemente a través de un conector. En una forma de realización más preferida, el conector está diseñado de tal manera que se escinde en condiciones fisiológicas, es decir las condiciones que prevalecen, en un organismo animal o humano. En una forma de realización preferida sólo un cierto porcentaje del ácido nucleico está en realidad provisto de tal polímero a través de un conector. Sin desear estar ligado por ninguna teoría, parece que es suficiente que sólo un cierto número de moléculas del ácido nucleico que forma parte de la composición de
45 lípidos tiene que tener un resto tan voluminosos con el fin de proporcionar el efecto de apantallamiento 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%. Los contenidos preferidos de ácidos nucleicos que tienen el agente de blindaje (que también se denomina en el presente documento como el compuesto de blindaje) son de aproximadamente de 0 a 3%, 3 a 6%, 6 a 10% y 10 a 20%, cuyo % tal como se utiliza
50 en este párrafo y en toda la presente solicitud, si no se indica lo contrario, es moles%.

Tal conector puede ser un conector de ARN monocatenario, que comprende más preferiblemente de 1 a 20 nucleótidos que serán escindidos por la actividad endonucleasa de ARN existente en o bajo condiciones in vivo. En una forma de realización adicional, el conector está formado por un engarce de ADN monocatenario que se escinde por endonucleasas de ADN también presentes en o bajo condiciones in vivo. En otras formas de realización, el
55 conector puede estar formado por un ARN de doble cadena o por un ADN bicatenario. La estabilidad del conector que consiste en un ácido nucleico es típicamente como sigue: ARNss <ARNds, <ADNss <<ADNds. Tal variedad de estabilidad permite un diseño específico del tiempo residual del ácido nucleico así modificado y por lo tanto de la composición de lípidos, respectivamente, que comprende dicho conector.

En una forma de realización adicional, el conector puede estar formado por un oligopéptido, polipéptido o proteína que se escinde por proteasas presentes en o bajo condiciones in vivo. Una forma de realización proporciona además un conector que comprende una vinculación S-S- que es sensible a las condiciones redox.

5 En una forma de realización adicional el conector es un conector sensible al pH. El concepto de un conector sensible al pH reside en la observación de que después de la internalización de una composición de lípidos que puede, en principio, ser o bien un lipoplexo o un liposoma, cualquier agente protector que es claramente ventajoso cuando se trata de la protección de la composición de lípidos antes de la internalización puede imponer una limitación de la utilización adicional de los compuestos así transferidos al interior de la célula. Tal como se usa en el presente documento, el agente de protección está acoplado al conector sensible al pH, que es o comprende en una forma de realización preferida un resto aniónico. En un entorno ácido tal como un endosoma, se cambia la carga de tal resto aniónico. Debido a esto, también se cambia la interacción del conector 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 conector sensible al pH del lípido catiónico que comprende la formulación de lípidos. En consecuencia, el liposoma o lipoplexo carece ahora del agente protector y por lo tanto puede ejercer su impacto sobre y/o en la célula. Este tipo de conector comprende ambos conectores que son, como tal, conocidos en la técnica y nuevos conectores de este tipo, es decir, que tienen este tipo de características. Preferiblemente, tal conector es cualquier conector que tiene una característica de carga que permite que el conector reaccione como se describe anteriormente. Representantes de tales conectores sensibles al pH comprenden, pero no se limitan a, oligo(ácido glutámico), oligofenolatos, y ácido dietilentriamino penta acético. Tanto el acoplamiento de dicho conector al agente protector como la incorporación de tal conector al agente protector que es entonces conocido comúnmente como un resto del agente protector, son conocidos por los expertos en la técnica.

El compuesto utilizado como el primer componente lípido en la composición de lípidos según la presente invención al que se hace referencia también en esta memoria como el(los) compuesto(s) según la presente invención puede, como se representa en la Figura 1, considerarse como que comprende un grupo lipófilo formado por el resto R1-N-R2, un grupo conector formado por el resto C(O)-CH(NH₃⁺)(CH₂)_n-NH y un grupo de cabeza formada por el resto R3. El presente inventor ha encontrado sorprendentemente que este tipo de compuesto que presenta una carga positiva en el grupo conector es particularmente adecuado para transferir compuestos biológicamente activos a través de una membrana celular y preferiblemente dentro de las células, más preferiblemente células animales. Además, el presente inventor ha sorprendentemente encontrado que la transferencia mediada por los compuestos según la presente invención será particularmente eficaz si el compuesto biológicamente activo es un ácido nucleico, más preferiblemente ARNs y ANS.

Tal como se utiliza preferiblemente en el presente documento, el término alquilo se refiere a un radical saturado alifático que contiene de 8 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 18 átomos de carbono, o un radical mono- o poliinsaturado de hidrocarburo alifático que contiene de 8 a 30 átomos de carbono, que contiene al menos un enlace doble y triple, respectivamente. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el término alquilo también comprende alqueno y alquino. Aquí se refiere tanto a grupos alquilo ramificados como no ramificados, es decir, no lineales o de cadena lineal. Grupos alquilo de cadena lineal preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono. Grupos alquilo de cadena lineal más preferidos contienen de 12 a 18 átomos de carbono. Grupos alquilo ramificados preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono, en donde 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 que como que se ramifica desde la columna vertebral, con el grupo alquilo definiéndose como en la presente memoria, más preferentemente con el grupo alquilo que comprende grupos alquilo de cadena corta, más preferiblemente que comprende de 1 a 6, incluso más preferiblemente de 1 a 3 y lo más preferido 1 átomo de C. Más preferidos son los grupos alquilo ramificados que contienen de 12 a 18 átomos de carbono en la cadena principal con los grupos alquilo ramificados definiéndose como en lo que antecede. Un grupo alquilo particularmente preferido es el grupo fitanilo.

En una forma de realización alternativa, el alquilo es un grupo alquilo insaturado ramificado o no ramificado como se define anteriormente. Más preferiblemente, tales radicales de hidrocarburo alifáticos insaturados contienen 1, 2, 3 o 4 dobles enlaces, por lo que se prefiere particularmente un radical que tiene un doble enlace. El más preferido es el oleilo que es C18: 1delta9, es decir, un radical hidrocarburo alifático de C que tiene 18 átomos, en donde en la posición 9 hay un doble enlace de configuración cis en lugar de un enlace sencillo que une el átomo de C número 9 al átomo de C número 10.

Tal como se usa en el presente 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.

Debe entenderse que los compuestos según la presente invención son preferentemente lípidos catiónicos. Más preferiblemente, cualquiera de los grupos NH o NH₂ presentes en los compuestos según la presente invención están presentes en una forma protonada. Típicamente, cualquier carga positiva del compuesto según 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 trifluoroacetatos. Haluros como se utilizan en el presente documento son

preferentemente fluoruros, cloruros, yoduros y bromuros. Los más preferidos son los cloruros. Al asociarse con el 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.

- 5 Es necesario reconocer que cualquier compuesto según 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 el presente documento, es decir, en particular, los enantiómeros RR; SS; RS y SR.

Los compuestos según la presente invención pueden formar una composición o ser parte de una composición, en donde dicha composición comprende un vehículo. En tal composición, que también se denomina en la presente memoria como composición de lípidos los compuestos según la presente invención también se conocen como el(los) componente(s) lípido(s). Dicho vehículo es preferiblemente un vehículo líquido. Vehículos líquidos preferidos son vehículos acuosos y vehículos no acuosos. Vehículos acuosos preferidos son el agua, y sistemas de tampón acuosos, más preferiblemente sistemas de tampón que tienen una resistencia de tampón fisiológica y concentración(es) de sal fisiológica(s). Los vehículos no acuosos preferidos son disolventes, preferentemente disolventes orgánicos tales como etanol, y terc-butanol. Sin desear estar ligado por ninguna teoría, cualquier disolvente orgánico miscible en agua puede, en principio, ser utilizado. Es necesario reconocer que la composición, más particularmente la composición de lípidos puede estar presente como o formar liposomas. Está dentro de la presente invención que la osmolaridad y el pH tal como se especifica en relación con la composición de lípidos de la presente invención, así como la concentración del lipoplexo se refiere a un sistema que comprende la composición de lípidos y el lipoplexo, respectivamente, y dicho vehículo.

La composición según la presente invención puede comprender uno o más lípidos auxiliares a los que también se hace referencia en esta memoria como componentes lípidos auxiliares. Los componentes lípidos auxiliares se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides. Los fosfolípidos son preferentemente di- y monoésteres 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 de 21 a 30 átomos de C. Un esteroide particularmente preferido es el colesterol.

Lípidos auxiliares particularmente preferidos son 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

30 Las composiciones particularmente preferidas según la presente invención comprenden cualquiera del ácido β-arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro [# 6], ácido β-arginil-2,3-diamino-propiónico-N-lauril-N-miristil-amida trihidrocloruro [# 11] o ε-arginil-lisina-N-lauril-N-miristil-amida trihidrocloruro [# 15] en combinación con DPhyPE, con lo que el contenido de DPhyPE es de aproximadamente 90 a 20 moles%, preferiblemente 80 moles%, 65 moles%, 50 moles% y 35 moles%, por lo que el término moles% se refiere al porcentaje del contenido total de lípidos de la composición, es decir, el contenido de lípidos de la composición que incluye el lípido catiónico según la presente invención y cualquier lípido adicional, incluyendo, pero no limitado a, cualquier lípido auxiliar.

Está dentro de la presente invención que la composición según la presente invención comprende preferiblemente el compuesto según la presente invención y/o uno o varios de los lípido(s) auxiliar(es) como se describe en el presente documento, por lo que o bien el compuesto según la presente invención, es decir, el lípido catiónico, y/o el componente lípido auxiliar están presentes como una dispersión en un medio acuoso. Alternativamente, el compuesto según la presente invención, es decir, el lípido catiónico, y/o el componente lípido auxiliar es/están presentes como una solución en un disolvente miscible en agua. Como un medio acuoso, preferiblemente se usa cualquiera de los vehículos acuosos que se han descrito en el presente documento. Disolventes miscibles en agua preferidos son cualquier disolvente que forma una fase homogénea con el agua en cualquier proporción. Los disolventes preferidos son etanol y terc-butanol. Es necesario reconocer que la composición, más particularmente la composición de lípidos puede estar presente como o formar liposomas.

Es necesario reconocer que la composición según la presente invención en sus diversas formas de realización es y puede por lo tanto también ser usada como una composición farmacéutica. En este último caso, la composición farmacéutica comprende un compuesto farmacéuticamente activo y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo farmacéuticamente aceptable puede, preferiblemente, seleccionarse de entre el grupo de vehículos tal como se define en el presente documento en relación con la composición según la presente invención. Se entenderá por los expertos en la técnica que cualquier composición tal como se describe en el presente documento puede, en principio, ser utilizada también como una composición farmacéutica a condición de que sus ingredientes y cualquier combinación de los mismos sean farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica comprende un compuesto farmacéuticamente activo. Tal compuesto farmacéuticamente activo puede ser el mismo que el constituyente ulterior de la composición según la presente invención, que es preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo, más preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo como se describe en el presente documento. El constituyente ulterior, compuesto farmacéuticamente activo y/o compuesto

biológicamente activo se selecciona preferiblemente del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.

Preferiblemente, cualquier dicho compuesto biológicamente activo es una molécula cargada negativamente. El término molécula cargada negativamente significa que se incluyen moléculas que tienen al menos un grupo con carga negativa que puede formar un par iónico con el grupo cargado positivamente del lípido catiónico según la presente invención, aunque el presente inventor no desea estar ligado por ninguna teoría. En principio, la carga positiva en el resto conector también podría tener algún efecto sobre la estructura general de cualquiera de los lípidos, como tal, o cualquier complejo formado entre el lípido catiónico y la molécula cargada negativamente, es decir, el compuesto biológicamente activo. Aparte de eso, la carga positiva adicional introducida en el lípido según la presente invención en comparación con los lípidos catiónicos descritos en el documento de patente de Estados Unidos US 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 07 de mayo, 35 (18): 5616-23. En contraste con lo que los expertos en la materia habrían esperado de este documento de la técnica anterior, los compuestos según la presente invención son particularmente adecuados para los diversos fines descritos en este documento y, en particular, carecen de ninguna toxicidad o de cualquier aumento de la toxicidad.

Un péptido tal como se usa preferiblemente en este documento 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 consiste en de dos a diez aminoácidos. Una forma de 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 usan 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 según la presente invención, es cualquier anticuerpo, preferiblemente cualquier anticuerpo monoclonal.

Compuestos biológicamente activos particularmente preferidos, es decir, compuestos farmacéuticamente activos y dicho constituyente ulterior tal como se utiliza en relación con la composición según la presente invención son los ácidos nucleicos. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, APN o cualquier mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional. Un ácido nucleico funcional, como preferiblemente se usa en este documento, es un ácido nucleico que no es un ácido nucleico que codifica un péptido y proteína, respectivamente. Ácidos nucleicos funcionales preferidos son ARNsi, ANsi, ARNi, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros que son todos conocidos en la técnica.

ARNsi son pequeños ARN de interferencia como, por ejemplo, se describe en el documento de patente internacional PCT/EP03/08666. Estas moléculas suelen consistir en una estructura de doble cadena de ARN que comprende entre 15 a 25, preferiblemente 18 a 23 pares de nucleótidos que hacen apareamiento de bases entre sí, es decir, son esencialmente complementarios entre sí, típicamente mediado por un apareamiento de bases de Watson-Crick. Una hebra de esta molécula de doble cadena de ARN es esencialmente complementaria a un ácido nucleico diana, preferiblemente un ARNm, mientras que la segunda hebra de dicha molécula de ARN bicatenaria es esencialmente idéntica a un tramo de dicho ácido nucleico diana. La molécula de ARNsi puede estar flanqueada en cada lado y cada tramo, respectivamente, por una serie de oligonucleótidos adicionales que, sin embargo, no tienen necesariamente que estar apareados entre sí.

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 típicamente 50 o más nucleótidos y pares de bases, respectivamente.

Una clase adicional de ácidos nucleicos funcionales que son activos basado en el mismo modo de acción de ARNsi y ARNi es ANsi. ANsi se describe, por ejemplo, en el documento de patente internacional PCT/EP03/074654. Más particularmente, ANsi se corresponde con ARNsi, por lo que la molécula de ANsi no comprende ningún ribonucleótido.

Los ácidos nucleicos antisentido, tal como se utiliza preferentemente en el presente documento, son oligonucleótidos que hibridan basados en la complementariedad de base con un ARN diana, preferiblemente ARNm, activando así la RNasaH. La RNasaH es activada por ambos, ADN acoplado con fosfodiéster y ADN acoplado con fosfotioato. El ADN acoplado con fosfodiéster, sin embargo, es degradado rápidamente por nucleasas celulares con la 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 están en el intervalo de 16 a 23 nucleótidos. Ejemplos de este tipo de oligonucleótidos antisentido se describen, entre otros, en el documento de patente de Estados Unidos 5.849.902 y el documento de patente de Estados Unidos 5.989.912.

Un grupo adicional de ácidos nucleicos funcionales son las ribozimas que son ácidos nucleicos catalíticamente activos preferiblemente que consisten en ARN que comprenden básicamente dos restos. El primer resto muestra una actividad catalítica, mientras que el segundo resto es responsable de una interacción específica con el ácido

nucleico diana. Tras la interacción entre el ácido nucleico diana y el segundo resto de la ribozima, típicamente por hibridación y apareamiento de bases de Watson-Crick de tramos esencialmente complementarios de bases en las dos hebras de hibridación, el resto catalíticamente activo puede llegar a ser activo lo que significa que escinde, o bien intramolecularmente o intermolecularmente, el ácido nucleico diana en caso de que la actividad catalítica de la ribozima sea una actividad de fosfodiesterasa. Las ribozimas, y el uso y diseño de las mismas son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, se describen en Doherty y Doudna (Annu Ref Biophys Biomolstruct 2000; 30: 457-75).

Todavía un grupo adicional de ácidos nucleicos funcionales son los aptámeros. Los aptámeros son ácidos D-nucleicos que son o bien de una sola hebra o de doble hebra y que interactúan específicamente con una molécula diana. La fabricación o selección de aptámeros se describe, por ejemplo, en el documento de patente europea EP 0 533 838. En contraste con ARNi, ARNsi, ANsi, nucleótidos antisentido y ribozimas, los aptámeros no degradan ningún ARNm diana sino que interactúan específicamente con la estructura secundaria y terciaria de un compuesto diana tal como una proteína. Tras la interacción con la diana, la diana típicamente muestra un cambio en su actividad biológica. La longitud de los aptámeros varía típicamente desde tan poco como 15 a tanto como 80 nucleótidos, y preferiblemente varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos.

Otro grupo de ácidos nucleicos funcionales son los espejémeros como, por ejemplo, se describen en el documento de patente internacional WO 98/08856. Los espejémeros son moléculas similares a los aptámeros. Sin embargo, los espejémeros consisten ya sea totalmente o en gran parte de nucleótidos L en lugar de nucleótidos D en contraste con los aptámeros. De cualquier modo, en particular con respecto a las posibles longitudes de espejémeros, lo mismo se aplica a los espejémeros como se ha descrito en conexión con los aptámeros.

Como se mencionó anteriormente, el presente inventor ha encontrado sorprendentemente que el compuesto según la presente invención y las composiciones respectivas que comprenden dicho compuesto pueden ser particularmente eficaces en la transferencia de ARNi, y más particularmente ARNsi y ANsi a una célula endotelial. Es de notar que, aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría, debido a los porcentajes molares particulares del lípido(s) auxiliar(es) contenido(s) en las composiciones de lípidos según la presente invención, dichos lípidos auxiliares pueden ser un lípido auxiliar libre de PEG o en una forma de realización particular un lípido auxiliar que contiene PEG, pueden realizarse efectos sorprendentes, más particularmente si el contenido de cualquiera de este tipo de lípido auxiliar está contenido dentro de la gama de concentraciones especificadas en este documento. En relación con la misma, es particularmente digno de mención que si la composición según la presente invención contiene un lípido auxiliar que comprende un resto de PEG, cualquier entrega o acción de transfección usando tales lípidos auxiliares derivados de PEG que contiene la composición es particularmente eficaz en el suministro de ácido nucleico, particularmente moléculas de ARNi, muy especialmente ARNsi, ANsi, nucleótidos antisentido y ribozimas.

La razón de esto es que los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los liposomas formados por al menos el primer componente lípido y al menos un primer lípido auxiliar y que contienen más de aproximadamente el 4% de lípido(s) auxiliar(es) que contiene(n) PEG, no son activos, mientras que los liposomas con menos de 4% (preferiblemente menos de 3% pero más del 0%) median la entrega funcional aunque una cierta cantidad de entrega es, en principio, también observable más allá de esos límites. Básicamente, los presentes inventores han descubierto que la cantidad específica de PEG en las composiciones de lípidos según la presente invención es adecuada para proporcionar una transfección eficaz de y entrega a, respectivamente, las células endoteliales.

En un aspecto adicional, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las composiciones de lípidos según la presente invención que están preferiblemente 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 de lípidos exhiben una relación de carga negativa: positiva de aproximadamente 1:1,3 a 1:5. Por lo tanto, la presente invención está por tanto relacionada 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 ANsi 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 forma de realización preferida cualquier lípido auxiliar o combinación de lípido auxiliar tal como se describe en el presente 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 según la presente invención, especialmente en vista de lo que se ha dicho anteriormente en relación con la carga catiónica global del ácido nucleico que contiene las formulaciones de lípidos. Sin desear estar ligados por ninguna teoría, parece que 1 mol de lípido catiónico, particularmente como se describe en el presente 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 describen en este documento, proporcionan un máximo de 40 cargas negativas por molécula. Con el fin de llegar a una carga positiva global de las formulaciones de lípidos que contienen ARNsi según la presente invención, la relación molar puede variar preferiblemente de 0 a 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. En una forma de realización adicional de la composición y el lipoplexo, respectivamente, de la invención, la relación

de la masa de lípido total a la masa de ARNs es típicamente de 2:1 a 1000:1 (m/m), en donde se prefiere una proporción de 5:1 a 15:1 (m/m) y una relación de 6:1 a 9:1 (m/m) es aún más preferida.

5 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 antes mencionados que pueden estar contenidos en una composición según la presente invención como compuesto farmacéuticamente activo y como constituyente adicional, respectivamente. Será reconocido por los expertos en la técnica que cualquiera de estos compuestos puede, en principio, ser utilizado como un compuesto farmacéuticamente activo. Tal compuesto farmacéuticamente activo está típicamente 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, se pueden dirigir prácticamente a cualquier diana. Por consiguiente, el compuesto según 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 pueda tratar, prevenir y/o tratar usando este tipo de compuestos biológicamente activos. Es preciso reconocer que aparte de estos compuestos biológicamente activos cualquier otro compuesto biológicamente activo también puede ser parte de una composición según cualquier forma de realización de la presente invención. Preferiblemente, dicho otro compuesto biológicamente activo comprende al menos una carga negativa, preferiblemente bajo condiciones en las que el dicho otro compuesto biológicamente activo está interactuando o formando un complejo con el compuesto según la presente invención, más preferiblemente el compuesto según la presente invención que está presente como un lípido catiónico.

20 Tal como se usa en el presente documento, un compuesto biológicamente activo es, preferiblemente, cualquier compuesto que sea biológicamente activo, preferiblemente que exhibe cualquier efecto biológico, químico y/o físico en un sistema 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, pero no limitado a, cualquier célula humana, cualquier tejido, cualquier órgano y cualquier organismo. Dicho 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.

25 Está también dentro de la presente invención que cualquiera de las composiciones según la presente invención, más particularmente cualquier composición farmacéutica según la presente invención puede comprender cualquier compuesto(s) farmacéuticamente activo(s) adicional(es).

30 La composición, en particular la composición farmacéutica según la presente invención se puede utilizar para diversas formas de administración, en donde se prefieren particularmente la administración local y la administración sistémica. Incluso más preferida es una vía de administración que se selecciona del grupo que comprende la administración intramuscular, percutánea, subcutánea, intravenosa y pulmonar. Tal como se usa preferiblemente en el presente documento, 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. Tal como se usa en el presente documento, la administración sistémica significa una administración que es diferente de una administración local y más preferiblemente es la administración en un fluido corporal tal como la sangre y el fluido, respectivamente, mediante la cual el líquido corporal transporta la composición a la célula, tejido y órgano, respectivamente, a los que la composición y el compuesto biológicamente activo, respectivamente, van a ser entregados. Sin embargo, una administración ex vivo tal como en el caso de trasplante de órganos, también está comprendida en la presente invención.

35 Como se usa en el presente documento, la célula a través de cuya membrana celular se va a transferir un compuesto biológicamente activo por medio del compuesto y composición según la presente invención, respectivamente, es preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula de vertebrado e incluso más preferiblemente una célula de mamífero. Lo más preferiblemente, la célula es una célula humana. En cualquier caso, dicha célula es una célula endotelial.

40 Cualquier medicamento que puede ser fabricado utilizando el compuesto y la composición según la presente invención, respectivamente, es para el tratamiento y la prevención de una enfermedad en 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 seres humanos. En un aspecto adicional el compuesto y composición según la presente invención se pueden utilizar como un agente de transferencia, más preferiblemente como un agente de transfección.

45 Tal como se utiliza preferiblemente en el presente documento un agente de transferencia es cualquier agente que es adecuado 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 más preferiblemente transferir tal compuesto a una célula como se describió anteriormente en el presente documento.

Incluso más preferiblemente, dicha transferencia comprende también la liberación desde cualquier endosoma y/o lisosoma. En una forma de realización preferida el término membrana celular comprenderá también membranas dentro de la célula, tales como la membrana vesicular, membranas de endosoma y de lisosoma.

5 En todavía un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para transferir, más particularmente transfectar, una célula con un compuesto biológicamente activo. En una primera etapa, en donde la secuencia de pasos no está necesariamente limitada y, en particular, no se limita a la secuencia de pasos descritos a continuación, se proporcionan la célula y la membrana y célula, respectivamente. En una segunda etapa, se proporciona un compuesto o composición según 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 según la presente invención, el compuesto biológicamente activo se transferirá de un lado de la membrana al otro, 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 o composición según la presente invención, se ponen en contacto, con lo cual preferiblemente se forma un complejo y dicho complejo se pone en contacto con la célula y la membrana, respectivamente.

10 En un aspecto adicional de la presente invención el método 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, proporcionar una composición según 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 durante el contacto con la célula y la membrana, respectivamente.

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

20 Es preciso reconocer que en una forma de realización adicional el agente protector está unido, como se describe en el presente documento, al componente lípido de la composición de lípidos según la presente invención, preferiblemente al lípido catiónico.

25 Como se usa en este documento, el término tratamiento de una enfermedad también comprende la prevención de dicha enfermedad.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos de los que pueden tomarse otras características, formas de realización y ventajas.

La figura 1a muestra las estructuras de los constituyentes de la composición de lípidos según la presente invención.

30 La figura 1b muestra una representación esquemática de un liposoma formado por la composición de lípidos según la presente invención y el lipoplexo de ARNsi según la presente invención formado por la composición de lípidos junto a moléculas de ARNsi que indican que las moléculas de ARNsi están formando un complejo predominantemente con la superficie exterior del liposoma en lugar de estar contenidas en el liposoma, con lo que los ARNsis cargados negativamente se complejan por interacción electrostática con las cargas positivas de los lípidos catiónicos.

La figura 1c muestra un diagrama que representa el tamaño de un liposoma formado por la composición de lípidos según la presente invención y el lipoplexo de ARNsi según la presente invención.

La figura 1d muestra un diagrama que representa el potencial zeta de un liposoma formado por la composición de lípidos según la presente invención y el lipoplexo de ARNsi según la presente invención.

40 La figura 2a muestra el resultado de un análisis de transferencia Western de la inhibición dependiente de la concentración de la expresión de la proteína PKN3 con ARNsi lipoplejado y ARNsi desnudo, respectivamente, en células HeLa, mediante el cual PTEN sirve como control de carga.

La figura 2b muestra las imágenes tomadas por microscopía confocal de células HeLa tratadas con ARNsis marcados con Cy3 y administrados ya sea desnudos o como un lipoplexo según la presente invención.

45 La figura 3a muestra el resultado de un análisis de transferencia de Western usando formulaciones liposómicas que contienen diferentes moles% de PEG.

La figura 3b muestra imágenes de microscopía confocal de la captación celular de lipoplejos de ARNsi-Cy3 con 0, 1, 2 y 5 moles% de PEG; Células EOMA fueron transfectadas con lipoplejos de ARNsi de etiqueta fluorescente; nota: con 5 moles% de PEG, la mayor parte del lipoplexo decora la superficie de la célula (flechas).

- 5 La figura 3c muestra el resultado de un análisis de transferencia Western y más específicamente de inmunotransferencia con extractos de células HUVEC transfectadas con diferentes cantidades de lipoplexos de ARNsi^{PKN3} PEGilado (1 mol%) y no PEGilado (panel superior) y lipoplexo de ARNsi^{PTEN} PEGilado (1 mol%) y no PEGilado (panel inferior); la concentración final de ARNsi se indica (1-20 nM; ut: no tratado); las inmunotransferencias se sondaron con anti-PTEN y anti-PKN3.
- 10 La figura 3d muestra varios diagramas que indican el desarrollo del peso corporal de ratones desnudos tratados con diferentes formulaciones durante un período de cinco días, por lo cual se trataron los ratones (inyecciones iv individuales en días 1-5) con lipoplexos de ARNsi^{LUC}, ARNsi^{PKN3}, ARNsi^{CD31} y ARNsi^{PTEN} PEGilados (triángulo) o no PEGilados (cuadrados) durante un período de 5 días; se muestran los cambios relativos en el peso corporal como media \pm s.e.m. de 7 ratones por grupo de tratamiento.
- 15 La figura 3e muestra un diagrama que indica el resultado de un ELISA de IL-12 de muestras de sangre de los ratones C57/BL6 (2 ratones por grupo) después de un solo tratamiento con poli (I:C) o los lipoplexos de siARN indicados para 2 (gris oscuro) o 24 (gris claro) horas.
- 20 La figura 4a muestra imágenes de microscopía de epifluorescencia de secciones embebidas en parafina que visualizan la distribución de ARNsi-Cy3 desnudo (fila central) o lipoplexado (fila inferior) (1,88 mg/kg) en diferentes tejidos 20 minutos después de la inyección en la vena de la cola.
- La figura 4b muestra imágenes de microscopía de epifluorescencia de corazón, pulmón, bazo e hígado analizadas en diferentes puntos de tiempo después de la administración iv sistémica única del lipoplexado de ARNsi-Cy3; muestras de tejido se registraron en configuración del microscopio idéntica (para cada órgano); tamaño de las barras: 100 μ m; en el caso del hígado y el bazo: 200 μ m.
- 25 La figura 4c muestra imágenes de microscopía confocal de la distribución de las células endoteliales en el corazón como se revelado por IHC usando un anticuerpo anti-CD31 (imagen de la izquierda) que decoran secciones transversales y longitudinales de los capilares (flecha); tinción de fluorescencia de Cy-3 de las células endoteliales de los vasos (imagen de la derecha, flecha).
- 30 La figura 4d muestra imágenes de microscopía confocal que ilustran la distribución de células endoteliales en el pulmón como se revela por IHC usando un anticuerpo anti-CD31 (imagen de la izquierda) que decoran los capilares pulmonares en el pulmón (flecha, vaso; doble flecha, macrófagos alveolares); tinción de fluorescencia Cy3 de las células endoteliales de los vasos (imagen de la derecha, flecha); los macrófagos alveolares también muestran fluorescencia fuerte (imagen de la derecha, las pequeñas flechas).
- 35 La figura 5a muestra un diagrama que ilustra la caída de los niveles de ARNm para Tie2 (diagrama de la derecha) o CD31 (diagrama de la izquierda) en el tejido de pulmón, el tejido del corazón y el tejido del hígado de animales tratados diariamente en cuatro días consecutivos con sacarosa, lipoplexos de ARNsi^{CD31}, lipoplexos de ARNsi^{PTEN}, o lipoplexos de ARNsi^{Tie2} como se cuantificó por TaqMan RT-PCR; los niveles de ARNm indicados se muestran con respecto al grupo de sacarosa y se normaliza para el nivel de ARNm de CD34; los valores son medias \pm s.e.m. de las proporciones de todos los animales por grupo.
- La figura 5b muestra inmunotransferencias de extractos de proteína de pulmón, corazón, e hígado de 6-7 ratones individuales tratados con lipoplexado de ARNsi^{CD31} o con lipoplexado de ARNsi^{Tie2} que se sondaron con anti-Tie2, o anti-CD31 y anti-PTEN (control de carga); nota: los niveles de expresión de la proteína cambian sólo para Tie-2 o CD31 según el lipoplexado aplicado, mientras que no se produjeron cambios en los niveles de expresión de PTEN.
- 40 La figura 5c muestra un diagrama que ilustra s-Tie2 como una función de diversas formulaciones y más específicamente la disminución de Tie2 soluble (s-Tie2) después de cuatro tratamientos diarios con lipoplexos de ARNsi^{Tie2} (día 5, diagrama de la derecha), pero no con lipoplexos de control (ARNsi^{PTEN}, ARNsi^{CD31}) y sacarosa; los niveles de s-Tie2 medidos de ratones individuales por grupo de tratamiento se indican como rombos; niveles de Tie2 soluble de los ratones antes del tratamiento (día 0) se muestran en el diagrama de la izquierda, después del tratamiento en el diagrama de la derecha; el valor medio de s-Tie2 para cada grupo de tratamiento se muestra como líneas.
- 45 La figura 6 muestra un diagrama que indica la distribución del tamaño de los liposomas que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 85 nm adecuado para la preparación de lipoplexos que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 120 nm.
- 50 La figura 7 muestra un diagrama que indica la distribución del tamaño de lipoplexos que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 120 nm.
- La figura 8 muestra un diagrama que indica la distribución del tamaño de varios lotes de liposomas que tienen un tamaño de partícula medio de aproximadamente 30 nm adecuado para la preparación de lipoplexos que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 60 nm.

La figura 9 muestra un diagrama que indica la distribución del tamaño de lipoplexos que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 60 nm.

Ejemplos

Ejemplo 1: Material y Métodos

5 ARNsis

Las moléculas de ARNsi (AtuRNAi) utilizadas en este estudio son oligonucleótidos de ARN romos, de doble cadena, 19-mer, estabilizados por la alternancia de modificaciones 2'-O-metilo en ambas hebras (para detalles ver (Czauderna et al., 2003)) y fueron sintetizados por BioSpring (Frankfurt a. M., Alemania). Las secuencias de ARNsi usadas en este estudio se enumeran en la Tabla 1.

10 Tabla 1: secuencias de ARNsi

Nombre de ARNsi	secuencias 5' a 3'
PKN3 s	<u>gagagccug<u>uacugcgaga</u></u>
PKN3 as	<u>ucucgcag<u>uacaggcucuc</u></u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as	<u>uaaguucuagcug<u>uggugg</u></u>
CD31 s	<u>uuccguucuag<u>aguauucug</u></u>
CD31 as	<u>cagauacu<u>uagaaccgaa</u></u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as Cy3	<u>uaaguucuagcug<u>uggugg-Cy3</u></u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as Cy5	<u>uaaguucuagcug<u>uggugg-Cy5</u></u>
Luciferasa s	<u>cguacgcggaa<u>acuucga</u></u>
luciferasa as	<u>ucgaaguau<u>uccgcgacg</u></u>
Tie2 s	<u>auaucugggcaa<u>ugaugg</u></u>
Tie2 as	<u>Ccaucauu<u>ugcccagauau</u></u>

Los nucleótidos con modificaciones 2'-O-metilo están subrayados.

S representa la cadena con sentido a la que se hace referencia también en esta memoria como la primera hebra; y

As representa la cadena antisentido a la que se hace referencia también en esta memoria como la segunda hebra.

Preparación y caracterización de lipoplexos de ARNsi

15 Liposomas catiónicos que comprendían el nuevo lípido catiónico AtuFECT01 que es el ácido β-L-arginil-2,3-L-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, Atugen AG (Berlín), el fosfolípido lípido neutro/auxiliar 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) y el lípido PEGilado N(carbonil metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina sal de sodio (DSPE-PEG) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania) en una relación molar de 50/49/1 se prepararon por rehidratación de película lipídica en solución de sacarosa estéril libre de RNasa 300 mM hasta una concentración total de lípidos de 4,34 mg/ml, sacarosa 300 mM, pH=4,5 a 6,0. Posteriormente, la dispersión multilamelar se procesó adicionalmente mediante homogeneización a alta presión (22 ciclos a 750 bar y 5 ciclos a 1000 bar) utilizando un dispositivo de

EmulsiFlex C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Canadá). Para generar los lipoplexos de ARNsi (AtuPLEX) la dispersión liposómica obtenida se mezcló con un volumen igual de una solución de 0,5625 mg/ml de ARNsi en sacarosa 300 mM, dando como resultado una relación de carga calculada de fosfatos de cadena principal de ácido nucleico para átomos de nitrógeno de lípidos catiónicos de aproximadamente 1 a 4. El tamaño del liposoma y de la dispersión de lipoplex se determinó por dispersión de la luz cuasi elástica (Quasi Elastic Light Scattering) (QELS) (N5 Submicron Particle Size Analyzer, Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) y el potencial zeta se midió utilizando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Para el marcaje doble del lipoplexo de ARNsi, se generaron liposomas marcados con fluorescencia mediante la adición del lípido trazador de etiquetado fluorescente TexasRed®-1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (TexasRed®-DHPE; Molecular Probes) en la siguiente proporción: 50 moles% de lípido catiónico (AtuFECT01)/44 moles% de lípido auxiliar DPhyPE/1 mol% de DSPE-PEG/5 moles% de TexasRed®-DHPE. Los liposomas fueron procesados por medio de 51 ciclos de extrusión a través de una membrana de policarbonato de 400 nm antes de la mezcla lo que originó una concentración final de 2,17 mg/ml total para los lípidos y 0,28 mg/ml de ARNsi (una inyección de 200 µl en un ratón de 30 g representa una dosis de 1,88 mg/kg de ARNsi y 14,5 mg/kg de lípidos).

Transfección *in vitro* e inmunotransferencia

Líneas de células EOMA murinas y HeLa humanas se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron de acuerdo con la recomendación de la ATCC. Las líneas celulares fueron transfectadas con ARNsi utilizando los liposomas catiónicos descritos anteriormente. Brevemente, se añadieron aproximadamente 12 horas después de la siembra de células, diferentes cantidades de solución de lipoplexos de ARNsi diluidos en un medio que contenía 10% de suero a las células para alcanzar concentraciones de transfección en un intervalo de 1-50 nM de ARNsi. Después de la transfección (48 horas) las células se lisaron y se sometieron a inmunotransferencia tal como se describe (Klippel et al., 1998). Para la extracción de proteínas totales, los tejidos fueron disecados e inmediatamente congelados de golpe en nitrógeno líquido. Se homogeneizaron 20 mg de tejido en un molino mezclador MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) usando perlas de carburo de tungsteno (Qiagen) y las proteínas se extrajeron en tampón de lisis NP40. La concentración de proteína se determinó con un ensayo de proteína DC (BioRad) y cantidades iguales se cargaron para el análisis de inmunotransferencia usando los siguientes anticuerpos: anti-PTEN de conejo (Ab-2, Neomarkers), monoclonal p110α (Klippel et al, 1994), anti-PKN3 de conejo (Leenders et al., 2004), anti-CD31 de cabra (Santa Cruz de Biotechnology), anti Tie-2 de conejo (Cell Signaling Technology).

Experimentos de captación de ARNsi-Cy3 en cultivo celular y en ratones

Para los estudios de captación de moléculas de ARNsi-Cy3 no formuladas en cultivo celular, las células se incubaron con cantidades definidas de solución de ARNsi durante la noche en un medio que contenía suero. La captación de si ARN-Cy3 lipoplexado se llevó a cabo mediante la transfección durante la noche como se mencionó anteriormente. Las células tratadas fueron lavadas con PBS enfriado con hielo y se fijaron en solución de 4% formaldehído/PBS durante 15 minutos antes de la microscopía. El experimento de entrega *in vivo* utilizando ARNsi-Cy3 marcado con etiquetado de fluorescencia se llevó a cabo mediante la administración de ARNsi formulado y desnudo por vía intravenosa. Los ratones fueron tratados con una sola inyección iv de 200 µl en una dosis final de 1,88 mg/kg de ARNsi-Cy3 y 14,5 mg/kg de lípidos y fueron sacrificados en puntos de tiempo definidos y la captación de fluorescencia examinada por microscopía en secciones de tejido congelado o fijados con formalina, embebidos en parafina o montados OCT.

Análisis histológico y microscopía

Después de que los ratones fueron sacrificados, los tejidos se fijaron inmediatamente en 4,5% de formalina tamponada durante 16 horas y, consecuentemente, se procesaron para la inclusión en parafina. Se cortaron secciones de 4 µm, y se colocaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones de tejido fueron teñidas con anticuerpo policlonal de cabra anti-CD31/PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology) (alternativamente para criosecciones de rata CD31, Pharmingen) para visualizar las células endoteliales en secciones de parafina. La inmunohistoquímica y la tinción hematoxilina/eosina (H+E) en secciones de tejido en parafina se realizaron según protocolos estándar. Para los estudios *in vivo* de captación de ARNsis marcados con fluorescencia, las secciones de parafina fueron examinadas directamente por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axioplan. Las imágenes fueron grabadas y procesadas con el software de imágenes Zeiss LSM5. Se realizó un análisis microscópico de la captación de ARNsi con un microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta. Para ello, las secciones se desparafinaron con xileno, rehidrataron a través de lavados de etanol graduado, se tiñeron a contracorriente con Sytox tinte verde (Molecular Probes 100 nM), se enjuagaron y se montaron finalmente en Fluorsave (Calbiochem) para microscopía.

Cuantificación del ARNm mediante RT-PCR (TaqMan)

Los tejidos fueron disecados e inmediatamente congelados de golpe en nitrógeno líquido. Aproximadamente 20 mg de tejido se homogeneizó en un molino mezclador MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) usando cuentas de carburo de tungsteno (Qiagen) y el ARN total fue preparado con el Invisorb spin Tissue ARN Mini Kit (Invitek, Berlín,

Alemania). Dependiendo del tejido, se utilizó de 25 a 100 ng de ARN total para TaqMan RT-PCR cuantitativo con los siguientes conjuntos de amplificación (BioTez GmbH, Berlín, Alemania) (UPR: primer superior, LWR: primer inferior, PRB: Sonda): ARNm de ratón específico para CD31, UPR 5'GGGAACGAGAGCCACAGAGAC3', LWR 5'CATTAAGGGA GCCTTCCGTTTC3', PRB FAM-5'CGGAAGGTCGACCCTAATCTCATGGAAA3'-TAMRA; específico para CD34 para ambas variantes de empalme de ratón, UPR 5'GAG-GCTG ATGCTGGTGTAGT3'; LWR 5'CAGCAAACACTCAGGCCTAACC3'; PRB FAM 5'CTGCTCCCTGCTTCTAGCCCAGTCTGA3'-TAMRA; específico para Tie2 ARNm de ratón, UPR 5'ATGCCTCTGCTCTCAAGGATG3'; LWR 5'TCTGGC AAATCCTCTATCTGTG G3'; PRB FAM-5'TGAGAAAGAAGGCAGGCCAAGGATGACT3'-BHQ1. Las reacciones TaqMan RT-PCR se llevaron a cabo con un ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Software: sistema de detección de secuencia v1.6.3 (ABI)) utilizando un protocolo estándar para la RT-PCR (48° C 30 minutos, 95° C 10 minutos, 40x (95° C, 15 segundos 60° C 1 minuto)) con primers a una concentración de 300 nM y 100 nM para la sonda. Los datos TaqMan se calcularon utilizando el método comparativo C_T . Aquí la cantidad de ARNm diana (CD31 o Tie2), normalizada para una referencia endógena (CD34) y relativo a un calibrador (grupo sacarosa) viene dada por la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los datos para los ratones individuales se muestran como C_T de CD31, CD34 o Tie2 ARNm en relación a la sacarosa presentando el promedio de una triplicado \pm s.e.m. Los datos para los grupos de tratamiento se muestran como $\Delta\Delta C_T$ normalizado para una referencia endógena y en relación a la sacarosa presentando la media de 6 - 8 ratones por grupo \pm s.e.m.

Cuantificación de Tie2 soluble por ELISA

Para el análisis de suero se recogió sangre de ratones anestesiados por sangrado del seno orbital el día 0 y día 5. El Tie2 soluble se midió por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de la interleucina-12 mediante ELISA

Ratones macho C57BL/6 recibieron una única inyección en la vena de la cola de 200 μ l de poly(I:C) - (Sigma, Taufkirchen, Alemania) o solución de lipoplexo de ARNsi (dosis final de 1,88 mg/kg ARNsi o Poly(I:C) y 14,5 mg/kg de lípidos). La sangre se extrajo de ratones anestesiados por sangrado del seno orbital 2 y 24 horas después de la inyección y la IL-12 (p40) del suero, así como los niveles de interferón α se midieron mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante.

Estudios en el ratón

Ratones desnudos Hsd:NMRI-nu/nu macho deficientes inmunes (9 semanas) se utilizaron para la evaluación de la toxicidad de lipoplexo de ARNsi *in vivo*, así como para la detección de ARNi (análisis knock-down *in vivo*) y Tie2 por ELISA. El análisis microscópico de la distribución en los órganos y tipo de células de los lipoplexos de ARNsi marcados con fluorescencia y el análisis por ELISA de IL-12 se llevaron a cabo con ratones C57BL/6 (8-10 semanas) macho competentes inmunes. El mantenimiento y los experimentos con animales se realizaron según los protocolos aprobados y en cumplimiento de las instrucciones de la Landesamt FTTR Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlín, Alemania (núm G0264/99).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias \pm s.e.m. La significación estadística de las diferencias se determinó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Ejemplo 2: Caracterización de lipoplexos de ARNsi *in vitro*

Hemos empleado duplexos de ARNsi, 19-mer que carece de 3'-salientes, que se estabilizan químicamente por la alternancia de modificaciones del azúcar 2'-O-metilo en ambas hebras (Czuderna et al., 2003), mediante lo cual los nucleótidos no modificados se enfrentan a los modificados en la cadena opuesta como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Se ha demostrado previamente en cultivo celular (*ex vivo*) (Czuderna et al., 2003) que estas moléculas así modificadas mejoran la resistencia a la nucleasa del suero, mientras que se conserva la actividad de ARNi. Primero analizamos si estas moléculas median ARNi en un cultivo de células, ya sea acompañado con liposomas catiónicos o sin formulación ("desnudo"). Para este propósito se sintetizó un lípido catiónico de nuevo diseño, conocido como AtuFECT01, en combinación con lípidos auxiliares disponibles en el mercado la estructura de los cuales se representan en la Figura 1a. Este nuevo lípido se caracteriza por un grupo de cabeza altamente cargado, lo que permite una unión más eficiente a ARNsi en comparación con otros lípidos catiónicos disponibles comercialmente, tales como DOTAP o DOTMA. En el siguiente estudio utilizamos lipoplexos de ARNsi consistentes en liposomas cargados positivamente (50 moles% de lípido catiónico AtuFECT01, 49 moles% de lípido neutro/auxiliar DPhyPE y 1 mol% DSPE-PEG) en combinación con diferentes moléculas de ARNsi de diana específica. Se caracterizaron los liposomas y los lipoplexos de ARNsi respecto al tamaño y carga por QELS (análisis unimodal con un ángulo de 90°) y la medición del potencial zeta. Los resultados de los mismos se representan en las figuras. 1c y 1d. El potencial zeta de una formulación de lípido catiónico representativa fue +63 mV, mientras que la formulación de lipoplexo según la presente invención mostró un potencial zeta de +46 mV.

El análisis por inmunotransferencia realizado para la entrega *in vitro* demostró que ningún silenciamiento de genes se produjo cuando se aplicó ARNsi desnudo incluso en concentraciones micromolares en comparación con las concentraciones nanomolares utilizadas para los lipoplexos de ARNsi como puede ser observado en la Figura 2a. Para analizar si la falta de silenciamiento génico era el resultado de una captación celular ineficiente debido a los efectos de repulsión entre los ARNsis aniónicos y la membrana de la célula de carga negativa, se emplearon 3 ARNsis con fluorescencia (Cy3) marcada en 3' para estudiar su absorción por microscopía confocal. Nosotros, y otros han demostrado previamente que el etiquetado de fluorescencia en el 3'-terminal de la molécula antisentido no perjudica la actividad de silenciamiento del ARN cuando es transfectado con vehículos de entrega (Chiu y Rana, 2002; Czauderna et al., 2003). Sorprendentemente, se observó una absorción significativa de ARNsis marcados con fluorescencia en ausencia de reactivos de transfección cuando se aplicaron concentraciones altas (10 μ M) de las moléculas de ARNsi-Cy3, tal como se representa en la Fig. 2b. Por el contrario, se logró una captación equivalente de ARNsi-Cy3 cuando se transfectaron con AtuFECT01 a una concentración de mil veces menor de ARNsi-Cy3 (10 nM). Estos resultados indican que los lipoplexos de ARNsi proporcionan dos efectos beneficiosos para la entrega funcional de ARNsis: una captación celular mejorada y más importante, el escape de la vía endocítica/endosómica en el citoplasma (Zelphati y Szoka, 1996), donde se lleva a cabo mediada por ARNi la degradación del ARNm.

Ejemplo 3: Los lipoplexos de ARNsi PEGilados son funcionales *in vitro* y adecuados para su aplicación *in vivo*

Se ha sugerido que las partículas liposómicas catiónicas pueden interactuar con las proteínas del suero con carga negativa o unirse a otros componentes del suero. Estas interacciones no específicas podrían influir negativamente en las propiedades de distribución y entrega de las formulaciones de liposomas *in vivo*. Para superar este problema, muchos portadores de liposomas están recubiertos con el polímero de poli(etilenglicol), PEG, para evitar el aclaramiento del portador por las proteínas de suero o el sistema del complemento y mejorar el tiempo de circulación. Además, la incorporación de PEG puede ayudar a estabilizar los liposomas mediante el blindaje y reducir el aclaramiento de macrófagos (Allen et al., 1995; Feigner et al, 1987).

A fin de demostrar la ventaja de la PEGilación en el caso de los lipoplexos de ARNsi hemos realizado experimentos con y sin lípidos PEGilados. En los siguientes experimentos utilizamos lipoplexos de ARNsi que comprendían liposomas cargados positivamente (lípidos catiónicos Atufect01, lípidos neutros/auxiliares DPhyPE, y diferentes cantidades de DSPE-PEG-2000) en combinación con diferentes moléculas de ARNsi de diana específica. En primer lugar, se determinó el efecto de diferentes cantidades de PEGilación sobre la actividad de interferencia de ARN *in vitro*. Se eliminó completamente el silenciamiento del gen mediado por ARNsi en presencia de 5 moles% de DSPE-PEG-2000, pero se mantuvo en presencia de 1-2 moles% en la formulación. Los resultados se representan en la Fig. 3a, que muestra el resultado de un análisis de transferencia Western que prueba las formulaciones de ARNsi^{PTEN} liposómicas con diferentes moles% de PEG por transfección de células HeLa (concentración de ARNsi; 20 nM (panel izquierdo) o 5 nM (panel derecho); ut: no tratado); por el que los extractos de proteínas se probaron con anti anti-PTEN y anti-p110 α . La distribución intracelular de lipoplexos de ARNsi marcados con fluorescencia cambió con 1-2% de PEGilación de grandes vesículas perinucleares interconectadas a pequeñas vesículas uniformes como se muestra en la figura 3b. En contraste, a 5 moles% de PEGilación, cuando no se observó ARNi (Fig. 3a), la captación celular parecía estar bloqueada, ya que el ARNsi-Cy3 lipoplexado se unió principalmente a la superficie de la célula como puede verse en la figura 3b, panel derecho. Cuando el ARNsi complementario a la secuencia diana del gen PTEN o PKN3 se formuló en presencia o ausencia de 1 mol% de DSPE-PEG-2000, se observó una caída específica de proteínas mediada por ARNsi independientemente de la pegilación como puede verse en la figura 3c. Sin embargo los lipoplexos de ARNsi no pegilados dieron lugar a una destrucción de proteínas ligeramente más eficiente a concentraciones más bajas cuando se comparan con las variantes pegiladas (Figura 3c, comparando concentraciones 1 nM de ARNsi), pero también mostraron efectos de destrucción inespecíficos (véase el control de carga de PTEN para lipoplexos de ARNsi^{PKN3}) cuando se aplicaron en dosis más altas (20 nM, Figura 3c). Esta inhibición no específica de un nivel de proteína no diana es probablemente debido a un efecto tóxico más pronunciado del lipoplexos no PEGilado *in vitro*.

Para analizar si la PEGilación de los lipoplexos de ARNsi también pueden reducir la toxicidad *in vivo* se aplicó dosis idénticas de lipoplexos de ARNsi pegilados (1 mol% DSPE-PEG-2000) y no pegilados por inyección en la vena de la cola en ratones. Tratamientos diarios consecutivos (día 1 a 5) de lipoplexos de ARNsi no pegilados (se utilizaron cuatro secuencias diferentes de ARNsi^{LUC}, ARNsi^{PKN3}, ARNsi^{CD31} y ARNsi^{PETEN}) de administración sistémica (iv) causó pérdida de peso corporal con el tiempo, mientras que los ratones tratados con las mismas dosis diarias de variantes PEGilados (1 mol% DSPE-PEG-2000) no parecieron afectados como se puede ver en la Fig. 3d.

Para dilucidar las diferencias en la pérdida de peso corporal después del tratamiento con lipoplexos de ARNsi pegilado y no pegilado, se analizó una reacción inmunológica posible debido al tratamiento con lipoplexos. Por esta razón, se analizó el nivel de interleucina-12 (IL-12) (Alexopoulou et al, 2001; Liu et al, 2003) en ratones competentes inmunes después de una inyección única bolus iv del Poly(I:C) no complejado (control positivo) o lipoplexos de ARNsi pegilados y no pegilados (ARNsi^{PTEN}, ARNsi^{LUC}). El análisis de ELISA reveló que no hubo aumento de la IL-12 tras el tratamiento de lipoplexos de ARNsi independientemente de la PEGilación como puede verse en la figura 3e. Por lo tanto, parece poco probable que una respuesta de citocinas inespecífica causara la reducción de peso corporal observada tras el tratamiento de lipoplexos de ARNsi no pegilado. Tomados en conjunto estos datos muestran que 1 mol% de DSPE-PEG-2000 en las formulaciones de lipoplexos de ARNsi es suficiente para reducir los efectos

secundarios tóxicos no específicos *in vivo* sin una severa pérdida de la eficacia de ARNi *in vitro*. En consecuencia, un grado definido de PEGilación parece ser un requisito previo importante para una segura y eficiente aplicación *in vivo* de los lipoplexos de ARNsi caracterizados en este documento.

Ejemplo 4: Captación específica de ARNsi lipoplexado en el endotelio vascular y excreción renal de ARNsi desnudo

5 En un siguiente paso nos propusimos investigar la biodistribución y la cinética de los lipoplexos de ARNsi en comparación con ARNsi no formulado después del tratamiento sistémico en ratones. Para este propósito, se inyectó una dosis única de ARNsi marcado con fluorescencia de Cy3 ya sea complejo con lípidos (inyección iv 200 μ l en una dosis final de 1,88 mg/kg de ARNsi-Cy3 y 14,5 mg/kg de lípidos) o no formulado (ARNsi-Cy3: 0,188 mg/ml igual a 15 μ M) en ratones inmunocompetentes, y se diseccionaron seis órganos distintos en nueve puntos de tiempo (de 5 minutos a 48 horas) para su examen por epifluorescencia y microscopía confocal. Un análisis microscópico inicial reveló que se detectó fluorescencia en todos los tejidos analizados de los animales 20 minutos después del tratamiento con lipoplexo de ARNsi-Cy3 como se muestra en la figura 4a, paneles inferiores. La fluorescencia Cy3 apareció en un patrón de tinción distintivo para cada órgano. Este patrón de tinción Cy3 específico para cada órgano recuerda la distribución del tejido endotelial. En contraste, el ARNsi desnudo se encontró predominantemente en el riñón 20 minutos después de la inyección, sin señales detectables en otros órganos, lo que sugiere una rápida excreción renal de moléculas de ARNsi no formuladas (Figura 4a, fila superior). Además, el ARNsi-Cy3 desnudo aplicado se acumula en el polo y el lumen de los túbulos proximales y en la orina 5 minutos después de la inyección, lo que no se observó con el ARNsi-Cy3 lipoplexado. En conclusión, los ARNsis no formulados no fueron dirigidos a ningún tipo de célula de los tejidos analizados *in vivo* después de la administración sistémica, esto se debe más probablemente a su excreción renal instantánea. Para los lipoplexos de ARNsi-Cy3, los datos de fluorescencia microscópica sugieren, sin embargo, que las moléculas de ARNsi fueron captadas por el endotelio vascular en diferentes órganos con una tasa de aclaramiento profundamente retrasada. Para analizar la farmacocinética de los lipoplexos de ARNsi-Cy3 con más detalle se comparó la captación de lipoplexos de ARNsi-Cy3 más estrechamente en diferentes puntos de tiempo. Se seleccionaron los cuatro órganos (pulmón, corazón, hígado y bazo) con la mayor cantidad de fluorescencia Cy3 a los 20 minutos después de la inyección (200 μ l de inyección iv a una dosis final de 1,88 mg/kg de ARNsi-Cy3 y 14,5 mg/kg de lípidos) para este análisis. La fluorescencia Cy3 se comparó mediante el examen microscópico utilizando parámetros de grabación idénticos. Cantidades importantes de ARNsi-Cy3 lipoplexado se acumularon en todos estos órganos a partir de cinco minutos después de la inyección como se puede ver en la Figura 4b. Este nivel de fluorescencia disminuyó gradualmente en el siguiente período de 2 horas en el corazón y el tejido pulmonar. En contraste, se detectó la mayor parte de la fluorescencia en el bazo 20 minutos después de la administración del lipoplexo de ARNsi Cy3, y se mantuvo hasta 20 horas en este tejido. En el hígado, el lipoplexo de ARNsi-Cy3 acumulado con el tiempo dio lugar a la mayor cantidad de fluorescencia Cy3 a las 2 horas después de la inyección, antes de disminuir durante el próximo período de tiempo de 4-20 horas. Sorprendentemente, el patrón de tinción de fluorescencia distintivo del lipoplexo de ARNsi-Cy3 en cada tejido no cambió con el tiempo lo que sugiere que las moléculas de ARNsi no se difunden por todo el tejido entero. No se observó fluorescencia Cy3 a las 48 horas después de la administración única de lipoplexos de ARNsi-Cy3 en ninguna de las muestras analizadas por este ensayo microscópico. Estos resultados indican que las moléculas de ARNsi formuladas en lipoplexos logran una mejor captación de órganos en comparación con los administrados como ARNsis desnudos.

40 La captación de ARNsi mejorada de un órgano, sin embargo, no indica necesariamente una captación intracelular o específica del tipo de célula de estas moléculas, que es un requisito previo para la funcionalidad de los ARNsis entregados. Un análisis más detallado de la captación de ARNsi-Cy3 formulado en el corazón y el pulmón por microscopía confocal reveló que a nivel celular, la tinción de fluorescencia estaba predominantemente presente en los revestimientos de los vasos sanguíneos lo que sugiere la entrega a las células endoteliales. El endotelio vascular en el corazón se visualizó mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-CD31. Los resultados se representan en la Figura 4c. La tinción para las células endoteliales que expresan el CD31 ilustra la presencia de numerosos capilares sanguíneos a lo largo de las células del músculo cardíaco (Figura 4c; flecha: secciones transversales y secciones longitudinales de los capilares). Estas estructuras capilares estaban decoradas en el corazón de los ratones tratados con una sola inyección intravenosa de lipoplexos ARNsi-Cy3 según lo revelado por microscopía confocal (Figura 4c, panel derecho).

La microscopía confocal de secciones de pulmón de ratones tratados con lipoplexos de ARNsi-Cy3 reveló una tinción puntuada de la pared alveolar, pero no del epitelio de los bronquiolos como se puede observar en la figura. 4d. La pared alveolar es atravesada por el endotelio de los capilares alveolares como se visualizó por tinción con anti-CD31 (Figura 4D, panel izquierdo). Por consiguiente, concluimos que los ARNsis lipoplexado usando los liposomas descritos en este documento pueden ser entregados al endotelio capilar del pulmón. Una captación de ARNsi específica de células endoteliales similar se observó para otros órganos incluyendo el hígado, páncreas, riñón, intestino delgado, y estómago. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las formulaciones de ARNsis basadas en lípidos catiónicos mejoran las propiedades de biodistribución de ARNsis y permite una absorción predominante de ARNsis en células endoteliales en todo el cuerpo.

60 Ejemplo 5: ARNi mediado por lipoplexos de ARNsi en los vasos del pulmón, corazón e hígado

El tratamiento sistémico de ratones con lipoplexos de ARNsi-Cy3 sugiere una entrega de ARNsis al compartimento endotelial de diferentes órganos. Después de esta observación, nos propusimos correlacionar la captación de ARNsi y la distribución con la eficacia de la interferencia de ARN en órganos particulares. Para ello, se diseñó el siguiente experimento *in vivo*: ratones desnudos (6, 8 por grupo) fueron tratados con cuatro inyecciones iv de tres lipoplexos de ARNsi de diana específica en días consecutivos (dosis diaria: 1,88 mg/kg ARNsi y 14,5 mg/kg de lípidos). Se identificaron *in vitro* potentes ARNsis específicos para dos de los genes diana endógenos, CD31 (PECAM-1) y Tie2, y se aplicaron para demostrar la silenciamiento de ARN en los vasos de los órganos seleccionados. Es importante destacar que la expresión de estos dos genes está altamente restringida a las células endoteliales. Grupos adicionales de ratones se trataron en paralelo con solución de sacarosa o con lipoplexos de ARNsi específicos para la secuencia de codificación de PTEN murino a fin de controlar los efectos inespecíficos. PTEN está, en contraste con CD31 y Tie2, expresado de forma ubicua en todos los tipos de células de los ratones. La expresión génica se evaluó mediante la medición de los cambios en los niveles de ARNm empleando RT-PCR y los niveles de proteína mediante métodos de inmunotransferencia y ELISA, 24 horas después del último tratamiento de lipoplexos de siARN. Los resultados se representan en la Figura 5. El ARN total se preparó a partir de pulmón, corazón e hígado de los grupos de tratamiento correspondientes (sacarosa, ARNsi^{PTEN}, ARNsi^{Tie2}, ARNsi^{CD31}) para analizar la caída de mRNA en el endotelio de los dos genes diana mediante RT-PCR (TaqMan) cuantitativa. El nivel de ARNm de CD34, otro gen con una expresión restringida a las células endoteliales vasculares se midió para normalizar las cantidades equivalentes de ARN de las células endoteliales. La relación promedio del nivel de ARNm de CD31 o Tie2 normalizado al nivel de ARNm de CD34 se muestra en la Figura 5a. Sólo en muestras procedentes de animales tratados con lipoplexos de siARN^{Tie2} y siARN^{CD31} estuvieron los niveles de ARNm de Tie2 y CD31 significativamente reducidos, según lo revelado por los datos de cuantificación de los ARNm respectivos. La reducción en los niveles de ARNm de Tie2 en el grupo de tratamiento de lipoplexos de ARNsi^{Tie2} o de mRNA de CD31 para el grupo de lipoplexos de ARNsi^{CD31} demuestra la especificidad del objetivo del tratamiento con siARN. En el hígado la caída en el nivel de ARNm fue más prominente para Tie2 (Figura 5a, panel inferior), mientras que en los pulmones y el corazón la expresión de ambos genes diana se inhibió de manera similar. Para corroborar la inhibición mediada por ARNsi de los genes de ambos objetivos nos propusimos confirmar la inhibición de la expresión de la proteína Tie2 por inmunotransferencia (Figura 5b). Se prepararon lisados de proteínas de órganos de 6-7 animales individuales de los grupos de tratamiento de lipoplexos de siARN^{Tie2} - o lipoplexos de siARN^{CD31}, se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y las inmunotransferencias correspondientes se probaron con anti-Tie2 y anti-PTEN (control de carga). Se observó una reducción significativa de proteína Tie2 en los tres órganos de los animales tratados con lipoplexos de ARNsi^{Tie2}. Con lisados de proteínas de hígado no fuimos capaces de detectar cantidades significativas de CD31 por inmunotransferencia. Sin embargo, se demostró la reducción significativa específica del nivel de la proteína CD31 del pulmón y corazón de los lipoplexos de siARN. Tomados en conjunto, estos datos demuestran un "silenciamiento génico" de ARNm y nivel de proteínas mediado por ARNsi en el endotelio vascular del ratón.

Dado que el nivel de proteína Tie-2 se redujo significativamente en los lisados proteicos de los tres órganos analizados analizamos si podíamos detectar una reducción en el nivel de la forma soluble de Tie2 en la sangre de animales tratados con lipoplexos de ARNsi^{Tie2}. La proteína de Tie2 actúa como un receptor de tirosina quinasa exclusivamente en las células endoteliales en concierto con sus ligandos, las angiopoyetinas, contribuyendo así al remodelado y la integridad vascular (Davis et al., 1996; Thurston, 2003). La forma soluble de Tie2, s-Tie2, es un producto de escisión proteolítica del dominio extracelular del receptor que puede ser detectado fácilmente en la sangre por ensayos de ELISA. Miramos los cambios en s-Tie2 en el suero antes y después del tratamiento de lipoplexos de ARNsi usando un ELISA de s-Tie2 como lectura. Todos los cuatro grupos de ratones ensayados mostraron niveles similares de s-Tie2 antes del tratamiento (día 0; Figura 5c, diagrama de la izquierda). Los ratones tratados con lipoplexos de siARN^{Tie2} exhibieron una reducción significativa en los niveles de s-Tie2 en comparación con los ratones tratados de los grupos de control (sacarosa, siARN^{PTEN}, siARN^{CD31}) en el día 5 de la pauta de tratamiento (día 5; Figura 5c, diagrama de la derecha). Este resultado implica que el tratamiento sistémico con lipoplexos de ARNsi^{Tie2} afecta a la expresión global del gen Tie2 *in vivo*, presumiblemente mediante la supresión de la expresión de la proteína Tie-2 en los vasos del endotelio del cuerpo. En conclusión, lipoplexos de ARNsi basados en AtuFECT01 están dirigidos al endotelio vascular de muchos tejidos después de la administración iv. La administración repetida de lipoplexos de ARNsi dio lugar a la disminución de ARN, así como de la expresión génica de la proteína endotelial como diana específica en tejidos tales como el pulmón, corazón e hígado.

Ejemplo 6: Método para la preparación de lipoplexos de ARNsi

Lipoplexos de ARNsi que tienen un tamaño promedio de partícula de aproximadamente 120 nm

Soluciones de los lípidos que forman los lipoplexos de la presente solicitud en cloroformo (c = 20 mg/ml) fueron dispensadas en un matraz de 100 ml de fondo redondo de modo que en la mezcla había una relación resultante de lípido catiónico ácido β-(L-arginil-2,3-L-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro (AtuFECT01) : ayudante de lípidos 1,2-difitanoiil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) : PEG lípido N(carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina sal de sodio (DSPE-PEG) de 50 moles%:49 moles%:1 mol%. Posteriormente, el disolvente se eliminó al vacío y la película de lípido resultante se secó a alto vacío durante 4 horas. Se añadió a los lípidos secos, una solución de sacarosa estéril 270 mM, lo que originó una concentración de 4,335 mg/ml de lípido total. Mediante una corta sonicación en un baño de ultrasonido durante 5

minutos, los lípidos se dispersaron y posteriormente se homogeneizaron con homogeneización de alta presión (Avestin C3). Dicha homogeneización de los liposomas se llevó a cabo sometiendo a 21 ciclos a 750 bar y 52 ciclos a 1.250 bar. Los liposomas así obtenidos tienen un tamaño de partícula medio de aproximadamente 85 nm como se representa en la Fig. 6 y como se determina por QELS (Beckman Coulter-N5 y Malvern Zetasizer NS).

- 5 Estos liposomas se sometieron a un tratamiento adicional en condiciones asépticas. A tal efecto, se mezclaron con el mismo volumen de una solución de ARNsi en sacarosa 270 mM ($c = 0,5625$ mg/ml). La solución ARNsi se añade a los liposomas bajo agitación a 1500 rpm por medio de una jeringa. Se origina la formación de lipoplexos que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 120 nm.

10 La distribución del tamaño de las lipoplexos así obtenidos se ilustra en la Fig. 7. El tamaño de partícula se determinó mediante QELS (Beckman-Coulter N5 y Malvern Zetasizer NS).

Lipoplexos de siARN que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 60 nm

- 15 Se añadió 1 ml de una solución que contenía los lípidos tal como se especificó anteriormente en relación con la preparación de lipoplexos de ARNsi que tenían un tamaño medio de partícula de aproximadamente 120 nm ($c = 86,5$ mg/ml lípidos totales en la relación anterior de 50:49:1) en 30% de terc-butanol por medio de una jeringa bajo condiciones asépticas y agitación a 1.500 rpm, a 19 ml de una solución de sacarosa 270 mM estéril en un minuto. De esta forma, se pueden obtener liposomas que tengan un tamaño medio de partícula de aproximadamente 30 nm. La figura 8 muestra la distribución del tamaño respectivo. El tamaño de partícula se determinó mediante QELS (Beckman-Coulter N5 y Malvern Zetasizer NS).

20 La solución de liposomas así obtenida se dividió en porciones alícuotas de 1,6 ml en viales de liofilización de 5 ml que posteriormente se congelaron de golpe a -80° C y luego liofilizaron.

- 25 Para la preparación de lipoplexos, 3,2 ml de una solución de 0,28 mg/ml de ARNsi en 135 mM de solución de sacarosa estéril se inyecta en el vial que contiene los liposomas liofilizados también referida como el liofilizado. El vial que contiene el liofilizado y la solución se agitan posteriormente hasta la completa disolución de la torta formada por el liofilizado. Los lipoplexos así obtenidos tienen un tamaño de partícula medio de aproximadamente 60 nm como se representa en la Figura 9. El tamaño de partícula se determinó mediante QELS (Beckman-Coulter N5 y Malvern Zetasizer NS).

Referencias

En la medida en que se refiere el presente documento a varios documentos de la técnica anterior, tales documentos cuyos datos bibliográficos completos son como sigue, se incorporan aquí en su totalidad para referencia.

- 30 Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. y Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- Allen, T.M., Hansen, CB. y de Menezes, D.E.L. (1995) Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 267-284.
- 35 Barron, L.G., Uyechi, L.S. y Szoka, F.C., Jr. (1999) Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther*, 6, 1179-1183.
- Braasch, D.A., Paroo, Z., Constantinescu, A., Ren, G., Oz, O.K., Mason, R.P. y Corey, D.R. (2004) Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 1139-1143.
- Chae, S. S., Paik, J.H., Furneaux, H. y Hla, T. (2004) Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest*, 114, 1082-1089.
- 40 Chien, P.Y., Wang, J., Carbonaro, D., Lei, S., Miller, B., Sheikh, S., Ali, S.M., Ahmad, M.U. y Ahmad, I. (2005) Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*, 12, 321-328.
- Chiu, Y.L. y Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, 10, 549-561.
- 45 Chiu, Y.L. and Rana, T.M. (2003) siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna*, 9, 1034-1048.
- Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K. and Kaufmann, J. (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 31, 2705-2716.
- 50 Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. y Yancopoulos, G.D. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87, 1161-1169.

- Feigner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. y Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 7413-7417.
- 5 Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. y Triche, T.J. (2005) Sequence-Specific Knockdown of EWS-FLI1 by Targeted, Nonviral Delivery of Small Interfering RNA Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Metastatic Ewing's Sarcoma. *Cancer Res*, 65, 8984-8992.
- Klippel, A., Escobedo, J.A., Hirano, M. y Williams, L.T. (1994) The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. *Mol Cell Biol*, 14, 2675-2685.
- 10 Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T. W., Giedlin, M.A., Kavanaugh, W.M. y Williams, L.T. (1998) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol*, 18, 5699-5711.
- Landen, C.N., Jr., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M.T., Lopez-Berestein, G. y Sood, A.K. (2005) Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*, 65, 6910-6918.
- 15 Leenders, F., Mopert, K., Schmiedeknecht, A., Santel, A., Czaderna, F., Aleku, M., Penschuck, S., Dames, S., Sternberger, M., Rohl, T., Wellmann, A., Arnold, W., Giese, K., Kaufmann, J. y Klippel, A. (2004) PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *Embo J*, 23, 3303-3313.
- Liu, L., Zhou, X., Shi, J., Xie, X. y Yuan, Z. (2003) Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin. *Immunology*, 110, 341-347.
- 20 Liu, T.G., Yin, J.Q., Shang, B.Y., Min, Z., He, H. W., Jiang, J.M., Chen, F., Zhen, Y.S. y Shao, R.G. (2004) Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 11, 748-756.
- Morrissey, D.V., Lockridge, J.A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C. S., Jeffs, L.B., Judge, A., MacLachlan, I. y Polisky, B. (2005) Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 23, 1002-1007.
- 25 Muratovska, A. y Eccles, M.R. (2004) Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett*, 558, 63-68.
- Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Tanaka, M., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Segawa, H., Toda, Y., Kageyama, S., Yoshiki, T., Okada, Y. y Maekawa, T. (2005) Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest*, 115, 978-985.
- 30 Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V. y Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol Chem*, 278, 585-590.
- Schiffelers, R.M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., Molema, G., Lu, P.Y., Scaria, P.V. y Woodle, M.C. (2004) Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 32, e 149.
- 35 Shadidi, M. y Sioud, M. (2003) Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *Faseb J*, 17, 256-258.
- Song, E., Zhu, P., Lee, S.K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D.M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D.B., Shankar, P., Marasco, W.A. y Lieberman, J. (2005) Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 23, 709-717.
- 40 Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. y Vornlocher, H.P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432, 173-178.
- 45 Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A. y Ochiya, T. (2005) Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 12177-12182.
- Thurston, G. (2003) Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*, 314, 61-68.

Turner, J.J., Arzumanov, A.A. y Gait, M.J. (2005) Synthesis, cellular uptake and HTV-I Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell- penetrating peptides. *Nucleic Acids Res*, 33, 27-42.

Uprichard, S.L. (2005) The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett*, 579, 5996-6007.

- 5 Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F. y Aigner, A. (2005) RNAi-mediated gene- targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther*, 12, 461-466.

Yano, J., Hirabayashi, K., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Nogawa, M., Kashimori, I, Naito, H., Kitagawa, H., Ishiyama, K., Ohgi, T. y Irimura, T. (2004) Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 7721-7726.

- 10 Zelphati, O. y Szoka, F.C., Jr. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11493-11498.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de lípidos contenida en y/o que contiene un vehículo que comprende
- a) 50 moles% del ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, preferiblemente el ácido (β -(L-arginil)-2,3-L-diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro)
- 5 b) de 48 a 49 moles% de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE), y
- c) de 1 a 2 moles% de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilen-glicol, preferiblemente la sal sódica de N-(carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
- 10 en donde el vehículo que contiene la composición de lípidos tiene una osmolaridad de aproximadamente 50 a 600 mosmoles/kg, preferiblemente de aproximadamente 250 a 350 mosmoles/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 280 a 320 mosmoles/kg, y/o
- en donde los liposomas formados por el primer componente lípido y/o uno o ambos de los lípidos auxiliares y el compuesto protector en el vehículo tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 30 a 100 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 80 nm.
- 15 2. La composición según la reivindicación 1, en donde la osmolaridad se determina principalmente por un azúcar, en donde dicho azúcar se selecciona preferiblemente del grupo que comprende sacarosa, trehalosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa, lactulosa, inulina, rafinosa, y cualquier combinación de las mismas, más preferiblemente se selecciona del grupo que comprende sacarosa, trehalosa, inulina, rafinosa y cualquier combinación de las mismas.
- 20 3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la composición contiene uno o varios compuestos básicos, en donde tales compuestos básicos se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende aminoácidos básicos y bases débiles.
4. La composición de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición de lípidos comprende un ácido nucleico, por lo que dicho ácido nucleico es preferiblemente el constituyente ulterior.
- 25 5. La composición de lípidos según la reivindicación 4, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiégelmeros.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende un ácido nucleico y el ácido nucleico forma junto con el liposoma un lipoplexo.
- 30 7. La composición de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración de lípidos en el vehículo es aproximadamente de 0,01 a 100 mg/ml, preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 40 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 25 mg/ml, cada uno basado en la cantidad total de lípido proporcionada por el lipoplexo.
- 35 8. La composición de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el ácido nucleico es un ARNsi y la concentración del ARNsi en la composición de lípidos es de aproximadamente 0,2 a 0,4 mg/ml, preferiblemente 0,28 mg/ml, y la concentración total de lípidos es de aproximadamente 1,5 a 2,7 mg/ml, preferiblemente 2,17 mg/ml.
9. Una composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y opcionalmente un compuesto farmacéuticamente activo y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición según la reivindicación 9, en donde el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente ulterior se seleccionan del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.
11. La composición según la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, con lo que preferiblemente el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiégelmeros.
- 45 12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el residuo de PEG proporciona un peso molecular de aproximadamente 500 a 10.00 Da, más preferiblemente de aproximadamente 2.000 a 5.000 Da.
- 50 13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, 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 lo más preferible un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende ARNi, ARNsi, ANsi, ácido nucleico antisentido y ribozima, en donde preferiblemente la relación molar de ARNi a lípido

catiónico es de aproximadamente 0 a 0,075, preferiblemente de aproximadamente 0,02 a 0,05 y aún más preferiblemente 0,037.

14. Un lipoplexo, que es una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o contenido en dicha composición, que comprende:

5 a) un liposoma cargado positivamente que consiste en

aa) aproximadamente 50 moles% del ácido β -arginil-2,3-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro, preferiblemente el ácido (β -(L-arginil-2,3-L-diamino-propiónico-N-palmitil-N-oleil-amida trihidrocloruro)

ab) aproximadamente de 48 a 49 moles% de 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE)

10 ac) aproximadamente de 1 a 2 moles% de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilen-glicol, preferiblemente la sal de sodio de N-(Carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y

b) un ácido nucleico funcional, preferiblemente un ARNsi.

15 15. El lipoplexo según la reivindicación 14, en donde el potencial zeta del lipoplexo es aproximadamente de 40 a 55 mV, preferiblemente aproximadamente de 45 a 50 mV.

16. El lipoplexo según la reivindicación 14 o 15, en donde el lipoplexo tiene un tamaño de aproximadamente 80 a 200 nm, preferiblemente de aproximadamente 100 a 140 nm y más preferiblemente de aproximadamente 110 nm a 130 nm, como se determina por QELS.

20 17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición comprende un lipoplexo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

18. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 17 o de un lipoplexo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para la fabricación de un medicamento.

19. El uso según la reivindicación 18, en donde el medicamento es para la administración de un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional, al endotelio, preferiblemente al endotelio vascular

25 20. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, en donde el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad dependiente de la angiogénesis.

21. El uso según la reivindicación 21, en donde la enfermedad es una enfermedad de cáncer, más preferiblemente un tumor sólido.

30 22. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el medicamento se utiliza en combinación con una o varias otras terapias.

23. El uso según la reivindicación 22, en donde la terapia se selecciona del grupo que comprende quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia con anticuerpos y terapia de radiación.

24. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 17 o de un lipoplexo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, como un agente de transferencia in vitro.

35 25. El uso según la reivindicación 24, en donde el agente de transferencia transfiere un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es preferiblemente el ácido nucleico contenido en la composición o el ácido nucleico es preferiblemente el componente de ácido nucleico del lipoplexo.

26. El uso según la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, preferiblemente un ARNsi.

40 27. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde el agente de transferencia es específico para el endotelio, preferiblemente el endotelio vascular.

28. Un método in vitro para transferir un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional dentro de una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que comprende las siguientes etapas:

45 - proporcionar la célula o la membrana;

- proporcionar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 17 o un lipoplexo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, por lo que la composición comprende opcionalmente el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente ulterior; y

- poner en contacto la célula o la membrana con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 17 o un lipoplexo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

29. El método de la reivindicación 28, en donde el método comprende, como etapa adicional:

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

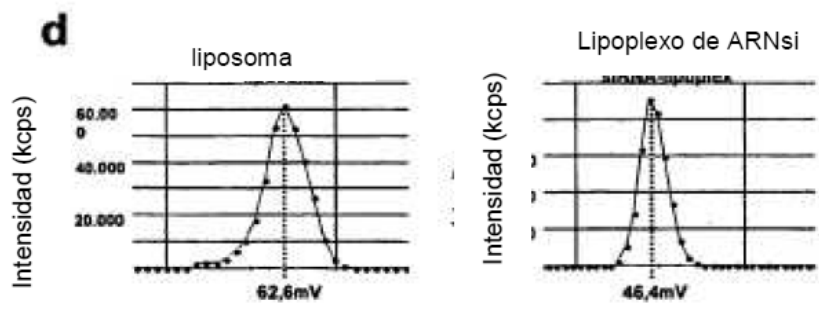
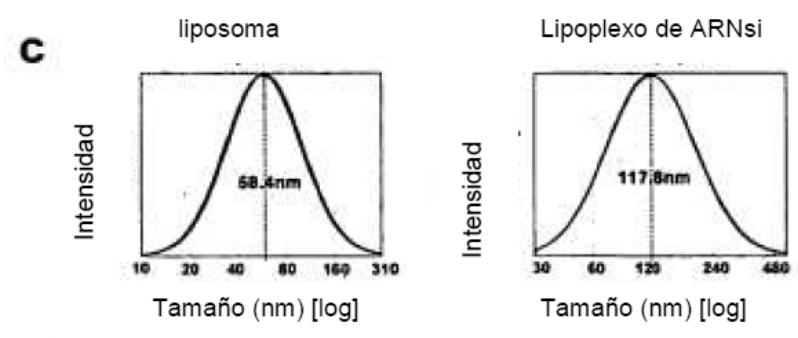
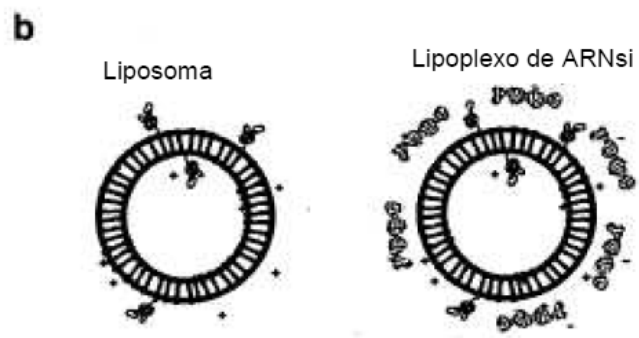
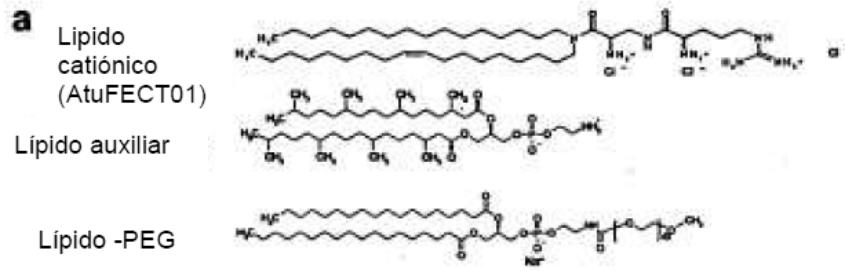


Figura 1

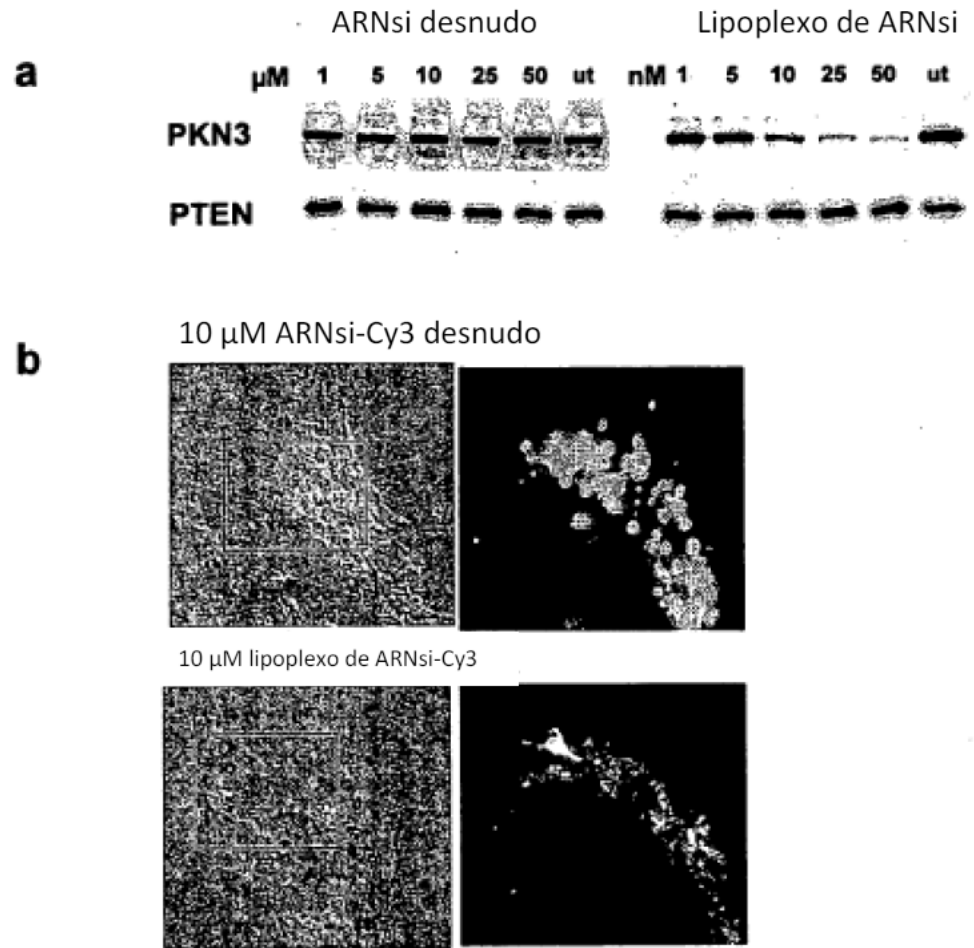


Figura 2

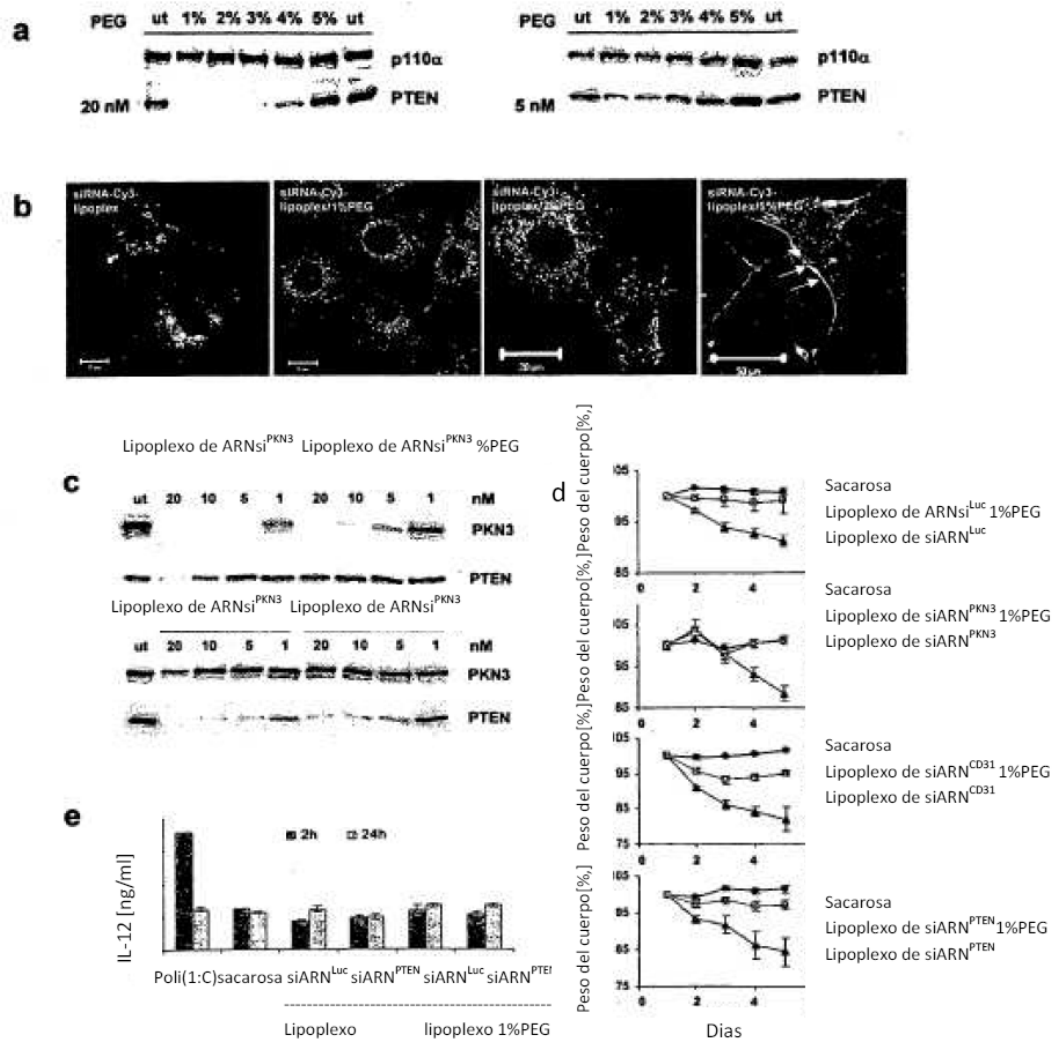


Figura 3

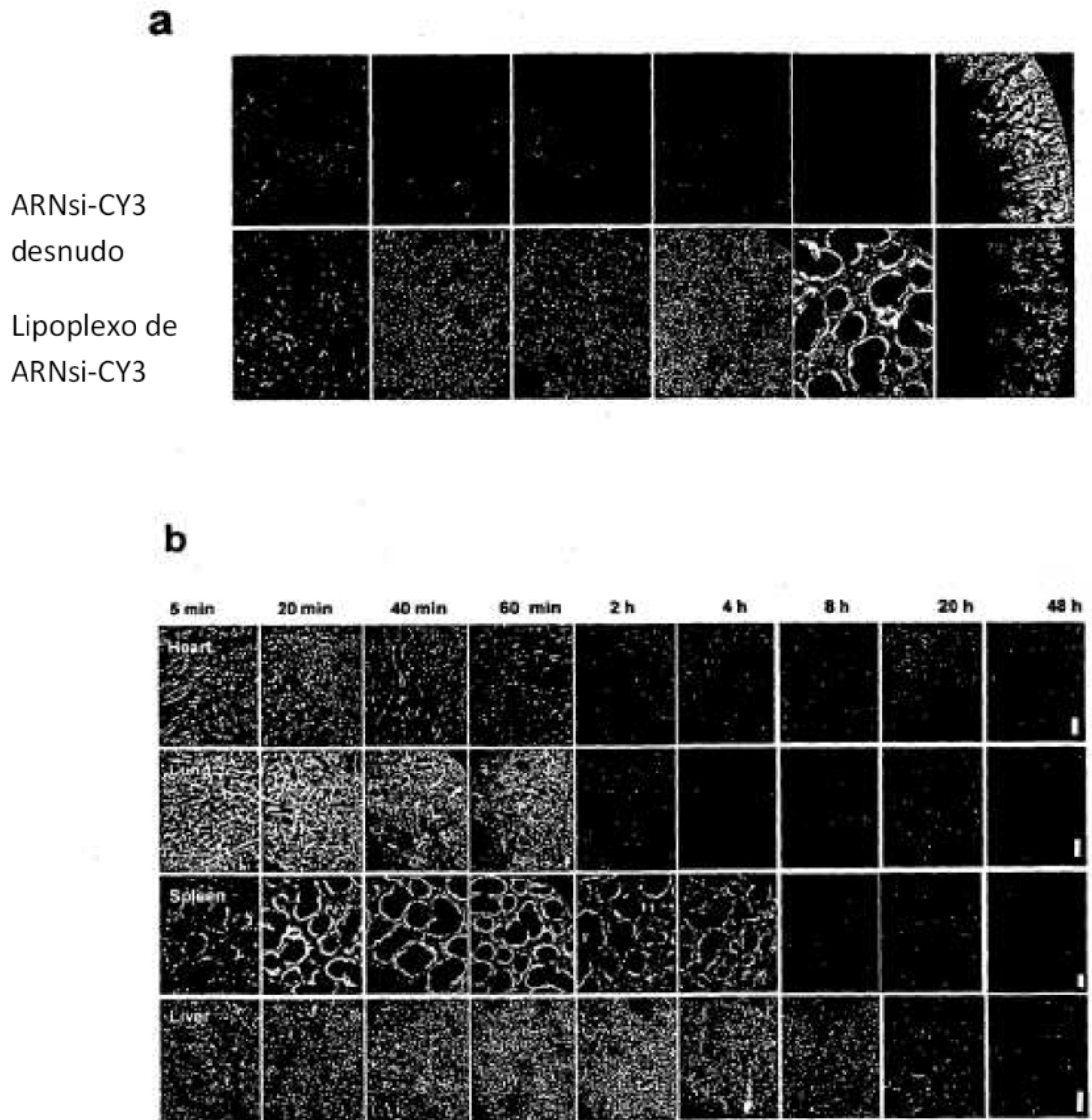


Figura 4

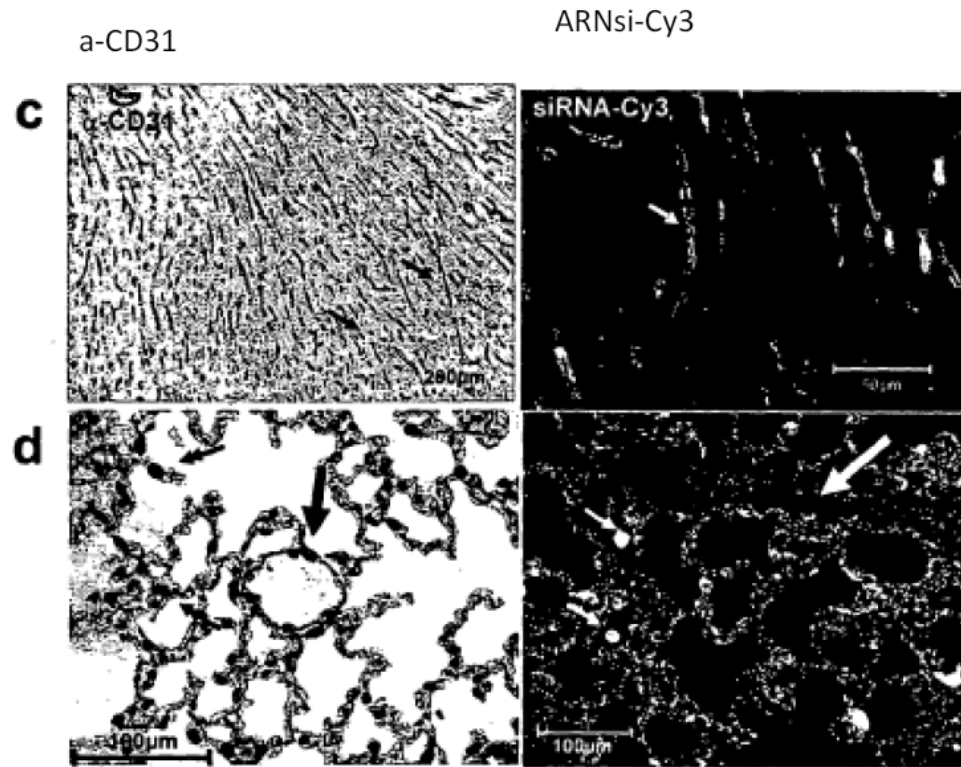
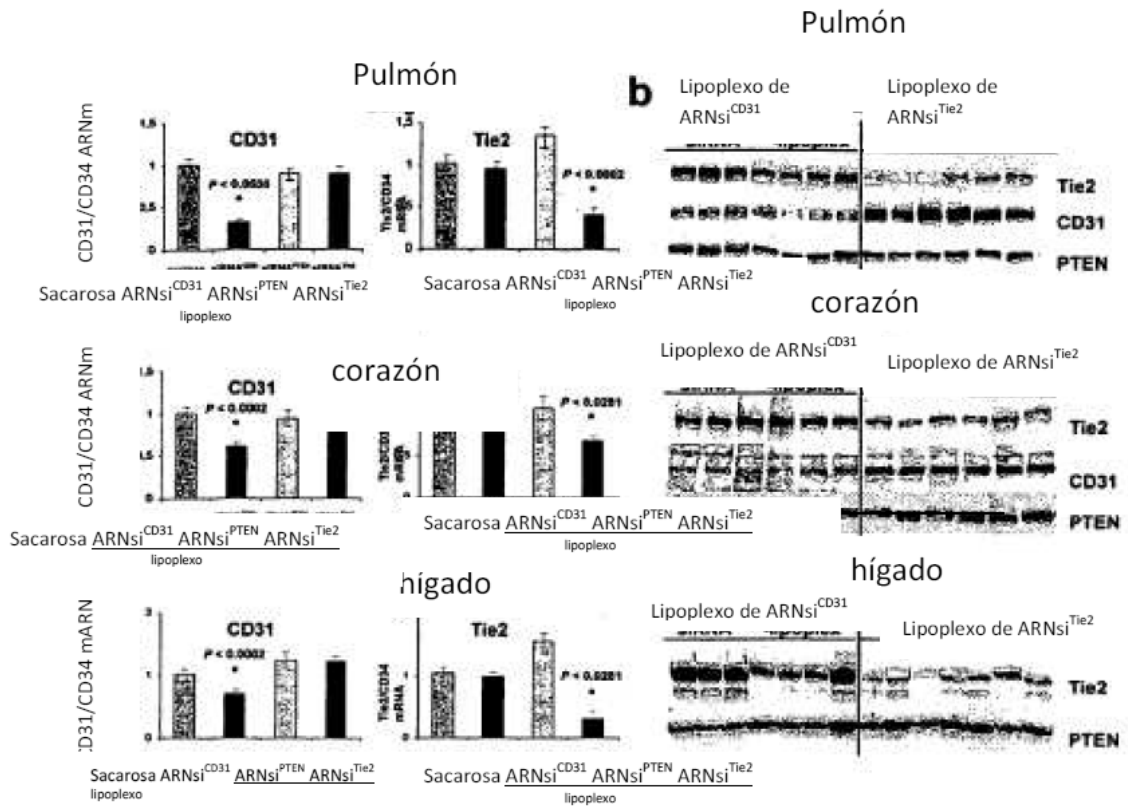


Figura 4

a



c

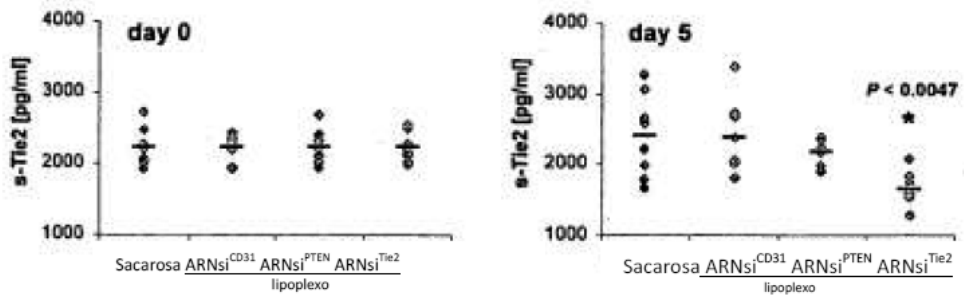


Figura 5

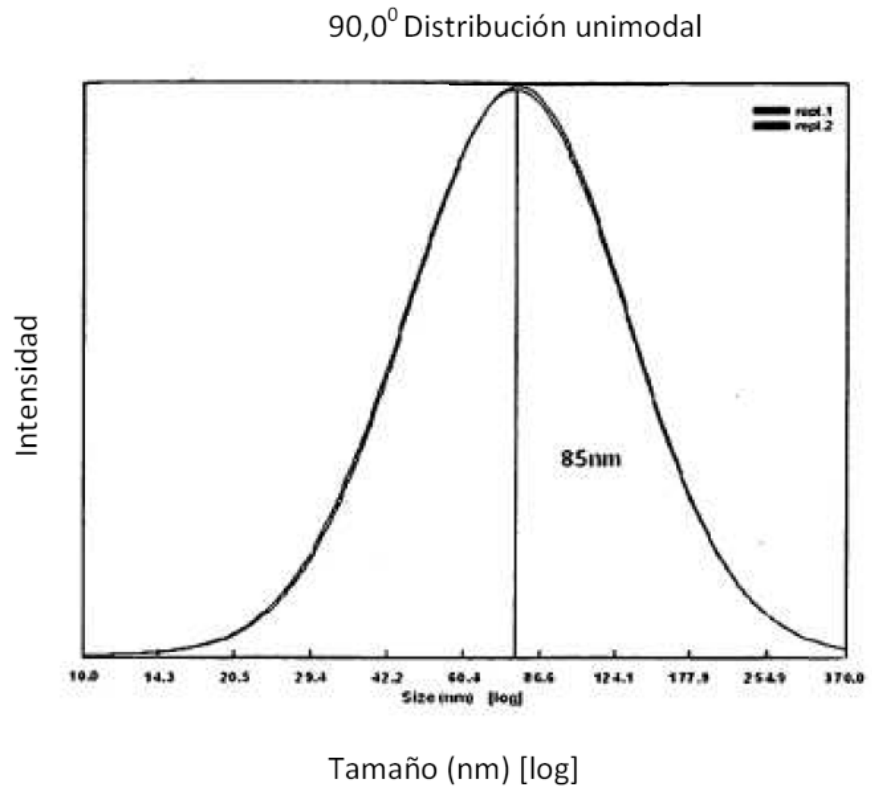


Figura 6

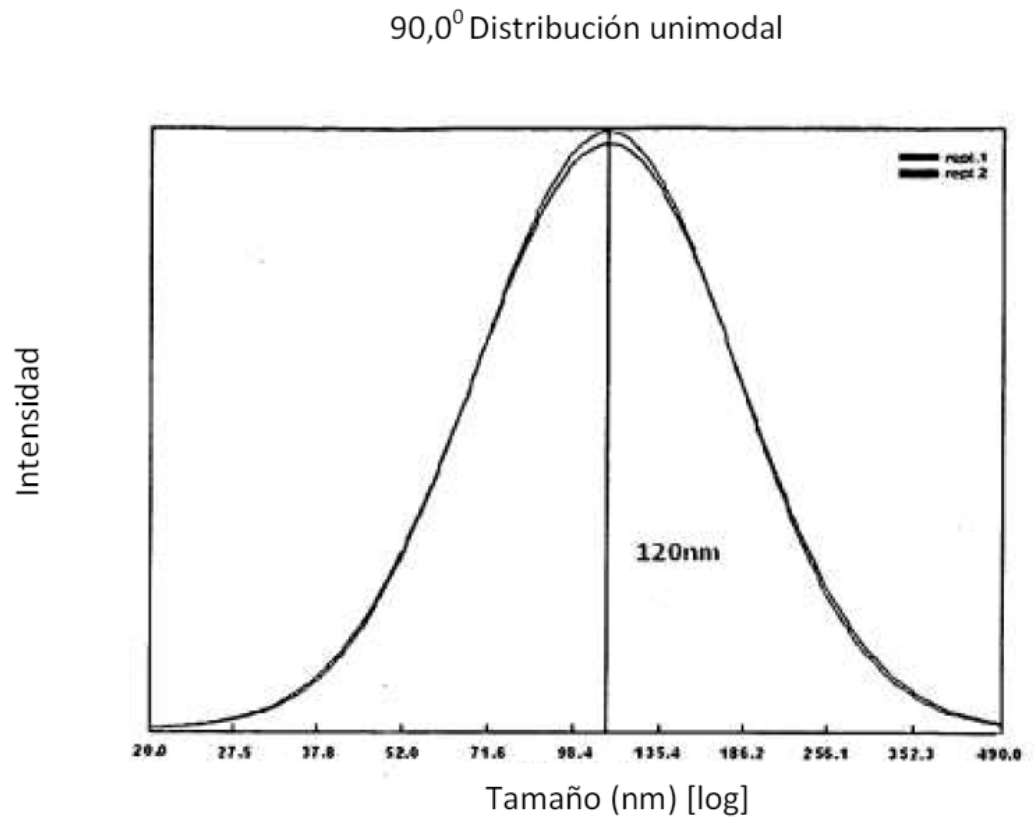


Figura 7

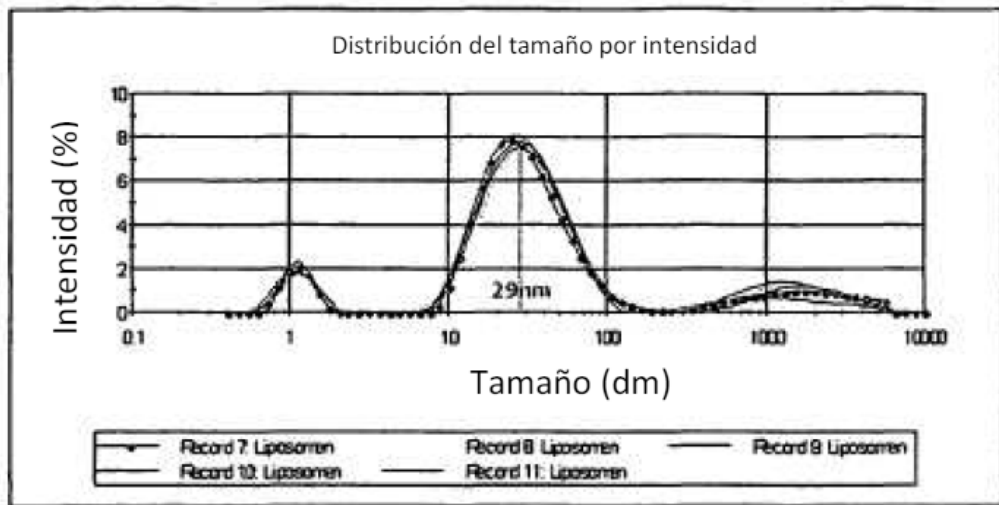


Fig. 8

90,0° Distribución unimodal

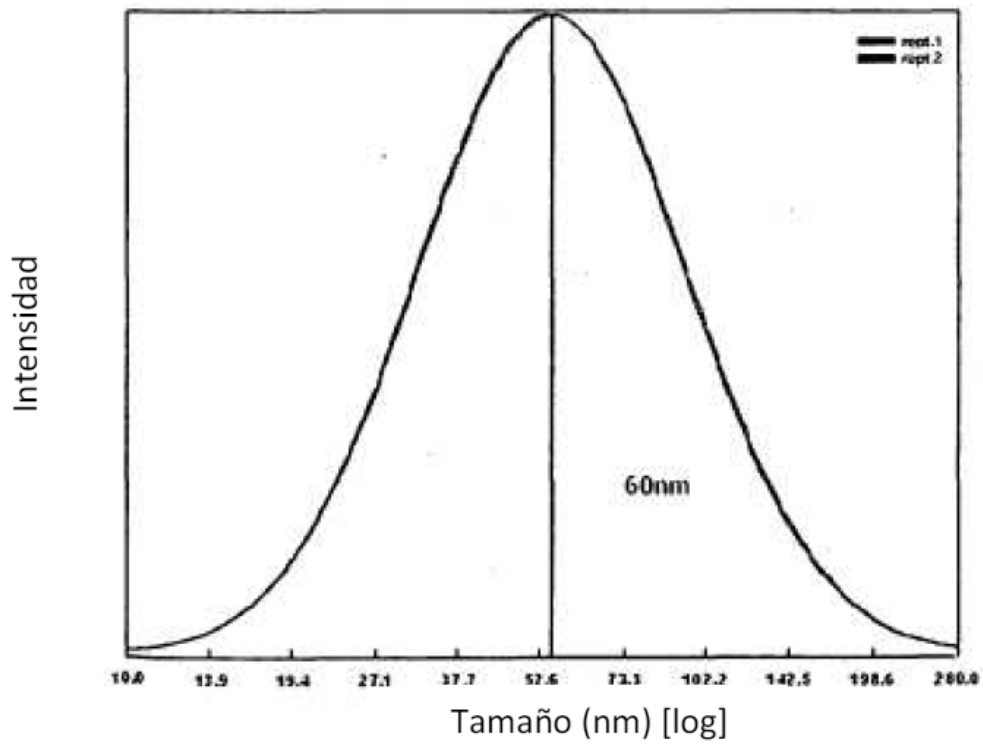


Fig. 9