

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 826**

51 Int. Cl.:

C07C 231/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07C 279/14 (2006.01)
C07C 209/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2005 PCT/EP2005/004920**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2005 WO05105152**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2005 E 05742844 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 1771206**

54 Título: **Lípidos, complejos lipídicos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

05.05.2004 EP 04010700
27.12.2004 EP 04030847

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KEIL, OLIVER y
KAUFMANN, JÖRG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 826 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

Lípidos, complejos lipídicos y uso de los mismos

La presente invención se refiere a lípidos catiónicos, composiciones que los contienen y la utilización de los mismos, así como un método *in vitro* para transferir compuestos químicos al interior de las células.

5 Tanto la biología molecular como la medicina molecular se basan en gran medida en la introducción de compuestos biológicamente activos en las células. Tales compuestos biológicamente activos comprenden típicamente, entre otros, ADN, ARN, así como péptidos y proteínas, respectivamente. La barrera que se ha de vencer es típicamente una bicapa lipídica que tiene una superficie externa cargada negativamente. En la técnica, se han desarrollado una serie de tecnologías para atravesar la membrana celular y, así pues, introducir los compuestos biológicamente
10 activos. Sin embargo, algunos métodos concebidos para ser usados en el laboratorio no se pueden usar en el campo médico y, más en concreto, no son idóneos para la administración del fármaco. Por ejemplo, la electroporación y los métodos balísticos conocidos en la técnica solo permitirían, si acaso, una administración local de los compuestos biológicamente activos. Además de dicha bicapa lipídica, las membranas celulares también comprenden sistemas de transporte. De acuerdo con esto, se ha puesto mucho empeño en la utilización de esta clase de sistemas de transporte para transportar los compuestos biológicamente activos a través de la membrana celular. Sin embargo, debido a la especificidad o reactividad cruzada de tales sistemas de transporte, su utilización no constituye un método aplicable de forma general.

Una estrategia que se puede aplicar de manera más general descrita en la técnica para la transferencia de compuestos biológicamente activos al interior de las células es la utilización de vectores víricos. Sin embargo, los
20 vectores víricos solo se pueden usar con eficacia para transferir genes al interior de algunos tipos celulares; pero no se pueden usar para introducir moléculas sintetizadas químicamente en el interior de las células.

Una estrategia alternativa era la utilización de los denominados liposomas (Bangham, *J. Mol. Biol.* 13, 238-252). Los liposomas son vesículas que se generan tras la asociación de lípidos anfipáticos en agua. Los liposomas comprenden típicamente bicapas de fosfolípidos dispuestas de manera concéntrica. Según el número de capas, los
25 liposomas se pueden clasificar en vesículas unilaminares pequeñas, vesículas multilaminares y vesículas multilaminares grandes. Se ha demostrado que los liposomas son agentes de administración eficaces, ya que permiten la incorporación de compuestos hidrófilos dentro de las capas intermedias acuosas, mientras que los compuestos hidrófobos se incorporan en las capas de lípidos. Se sabe bien en la técnica que tanto la composición de la formulación lipídica como su método de preparación afectan a la estructura y al tamaño de los agregados
30 lipídicos resultantes y, así pues, a los liposomas. También se sabe que los liposomas incorporan lípidos catiónicos.

A los lípidos catiónicos se les ha prestado mucha atención, además de por ser componentes de los liposomas, por poderse usar, como tales, para la administración de biopolímeros al interior de las células. Gracias a los lípidos catiónicos, cualquier compuesto aniónico se puede encapsular de una manera esencialmente cuantitativa debido a la interacción electrostática. Además, se cree que los lípidos catiónicos interaccionan con las membranas celulares cargadas negativamente, lo que inicia el transporte a través de la membrana celular. Se ha hallado que la utilización de una formulación liposómica que contiene lípidos catiónicos o la utilización de lípidos catiónicos tal cual junto con un compuesto biológicamente activo requiere una estrategia heurística, ya que cada formulación tiene un uso limitado porque lo típico es que puedan introducir plásmidos en el interior en algunos tipos celulares, pero no en todos, normalmente en ausencia de suero.

40 La carga y/o las proporciones de masa de los lípidos y de los compuestos biológicamente activos a ser transportados por ellos han resultado ser un factor crucial en la administración de diferentes tipos de tales compuestos biológicamente activos. Por ejemplo, se ha demostrado que las formulaciones lipídicas idóneas para la administración de plásmidos que comprenden un tamaño de 5.000 a 10.000 bases no suelen ser eficaces para la administración de oligonucleótidos, tales como ribozimas sintéticas o las moléculas antisentido que comprenden
45 típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases. Además, se ha indicado recientemente que las condiciones de administración óptimas para los oligonucleótidos antisentido y para las ribozimas son diferentes, incluso para el mismo tipo de célula.

La patente de los EE. UU. n.º 6.395.713 describe composiciones basadas en lípidos catiónicos que, típicamente, consisten en un grupo lipófilo, un conector y un grupo de cabeza, y la utilización de tales composiciones para transferir compuestos biológicamente activos al interior de una célula.

La patente de los EE. UU. n.º 2003/073640 y la solicitud de patente internacional WO 99/05094 describen moléculas potenciadoras de la permeabilidad, y métodos, para incrementar la permeabilidad de la membrana a diferentes moléculas, tales como los ácidos nucleicos.

La patente de los EE. UU. n.º 5.777.153 describe lípidos catiónicos e intermedios de su síntesis que son útiles para transfectar ácidos nucleicos o péptidos al interior de células procariotas o eucariotas.

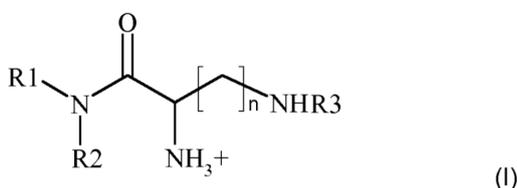
La solicitud de patente internacional WO 97/03939 describe lípidos catiónicos con función amida, composiciones de estos lípidos con macromoléculas polianiónicas, y métodos para interferir con la expresión de las proteínas en una célula que utiliza estas composiciones.

5 La patente europea EP0846680 describe lípidos catiónicos, en concreto lípidos con guanidino, y métodos para su preparación, así como complejos lipídicos polianiónicos que comprenden los lípidos de la invención, su preparación y uso para administrar sustancias biológicamente activas, en particular ácidos nucleicos, a las células.

10 El problema en el que se fundamentaba la presente invención era el de dar a conocer medios para introducir compuestos biológicamente activos en el interior de las células, preferiblemente de células animales. Un problema más en el que se fundamenta la presente invención es el de dar a conocer un agente de administración para ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos pequeños, tales como siRNA, siNA y RNAi o aptámeros y espejómicos (Spiegelmers®).

Estos problemas se solucionan mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas a esto. Las realizaciones preferidas se podrían tomar de las reivindicaciones adjuntas de las que dependen.

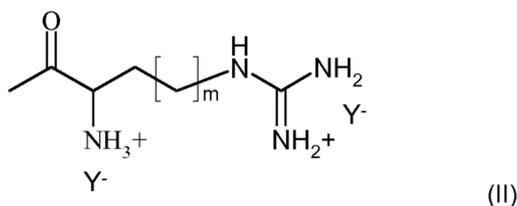
15 En un primer aspecto, el problema en que se fundamenta la presente invención se resuelve mediante un compuesto de acuerdo con la fórmula (I),



en donde R₁ y R₂ selecciona cada uno y de manera independiente del grupo que consiste en alquilo; en donde el término alquilo hace referencia a un radical alifático saturado o a un radical de hidrocarburo alifático mono- o poliinsaturado;

20 n es 1, 2, 3 o 4;

R₃ es un acilo seleccionado del grupo que comprende lisilo, ornitilo, 2,4-diaminobutirilo, histidilo y un resto acilo de acuerdo con la fórmula (II),



en donde m es un entero de 1 a 3, e

25 Y⁻ es un anión farmacéuticamente aceptable.

En una realización, R₁ y R₂ selecciona cada uno y de manera independiente del grupo que consiste en laurilo, miristilo, palmitilo y oleílo.

En una realización, R₁ es laurilo y R₂ es miristilo; o

R₁ es palmitilo y R₂ es oleílo.

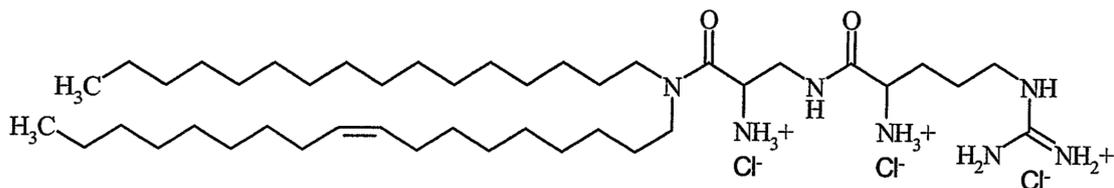
30 En una realización, m es 1 o 2.

En una realización, el compuesto es un lípido catiónico, preferiblemente en asociación con un anión Y⁻.

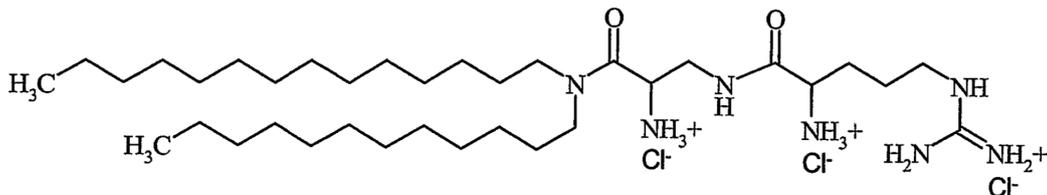
En una realización, Y⁻ se selecciona del grupo que comprende halógenos, acetato y trifluoroacetato.

En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que comprende

- trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-N-palmitil-N-oleilamida

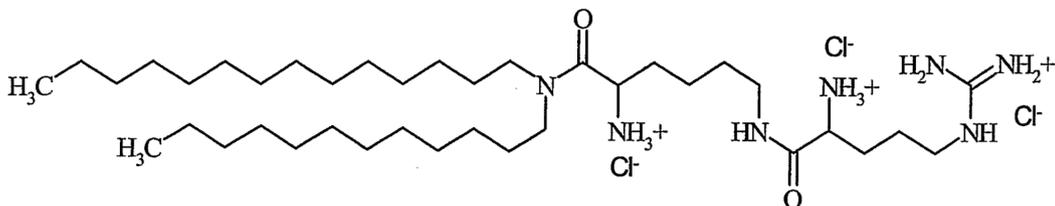


- trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida



y

5 - trihidrocloruro de ϵ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida



En un segundo aspecto, el problema que en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante una composición que comprende como componente lipídico un compuesto de acuerdo con el primer aspecto, y un vehículo.

10 En una realización la composición comprende un constituyente más.

En un tercer aspecto, el problema en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto y un compuesto farmacéuticamente activo y, preferiblemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

En una realización del segundo y el tercer aspecto, la proteína es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

20 En una realización del segundo y el tercer aspecto, el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN, APN y ANB.

En una realización del segundo y el tercer aspecto, el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, en donde preferiblemente, el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espejómicos.

25 En una realización del segundo y el tercer aspecto, la composición comprende además al menos un componente lipídico auxiliar, en donde, preferiblemente, el componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que comprende 1,2-difitaoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

30 En una realización del segundo y el tercer aspecto, el contenido del componente lipídico auxiliar es del 20% en moles al 80% en moles del contenido lipídico total de la composición.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el contenido del componente lipídico auxiliar es del

35% en moles al 65% en moles.

En una realización del segundo y el tercer aspecto, el lípido es trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida y el lípido auxiliar es 1,2-diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

5 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el lípido es el 50% en moles y el lípido auxiliar es el 50% en moles del contenido lipídico total de la composición.

En una realización del segundo y el tercer aspecto, la composición contiene al menos dos lípidos auxiliares.

10 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, al menos un lípido auxiliar comprende un resto que se selecciona del grupo que comprende un resto de PEG, un resto de HEG, un resto de almidón polihidroxietilado (poliHES) y un resto de polipropileno, en donde tal resto proporciona preferiblemente una molécula con una masa de 500 a 10.000 Da, más preferiblemente de 2.000 a 5.000 Da.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el lípido auxiliar que comprende el resto de PEG se selecciona del grupo que comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dialquil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y ceramida-PEG.

15 En una realización más preferida del segundo y el tercer aspecto, el resto de PEG tiene una masa molecular de 500 Da a 10.000 Da, preferiblemente de 2.000 a 5.000 Da, más preferiblemente una masa molecular de 2.000 Da.

En una realización incluso más preferida del segundo y el tercer aspecto, la composición comprende como componente lipídico el trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, como primer lípido auxiliar la 1,2-diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y como segundo lípido auxiliar 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000.

20 En una realización aún más preferida del segundo y el tercer aspecto, el contenido del segundo lípido auxiliar es del 0,05% en moles al 4,9% en moles, preferiblemente del 1 al 3% en moles.

25 En una realización aún mucho más preferida del segundo y el tercer aspecto, el contenido del lípido es del 45% en moles al 50% en moles, el contenido del primer lípido auxiliar es del 45 al 50% en moles y, siempre y cuando haya un segundo lípido auxiliar PEGilado, el contenido del segundo lípido auxiliar es del 0,1% en moles al 5% en moles, preferiblemente del 1 al 4% en moles y más preferiblemente del 2 %, en donde la suma del contenido del lípido, del lípido, del primer lípido auxiliar y del segundo lípido auxiliar es el 100% en moles y en donde la suma del primer lípido auxiliar y del segundo lípido auxiliar es del 50% en moles.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, la composición contiene

30 a) el 50% en moles de trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el 48% en moles de 1,2-diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y el 2% en moles de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000,

o bien

35 b) el 50% en moles de trihidrocloruro de β -L-arginil-2,3-L-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el 49% en moles de 1,2-diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y el 1% en moles de *N*-(carbonilmetoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, preferiblemente la sal de sodio del mismo.

40 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico bicatenario, en donde la composición comprende además un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional que es más preferiblemente un ácido ribonucleico bicatenario y lo más preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, en donde, preferiblemente, la razón molar del iRNA por el lípido catiónico es de 0 a 0,075, preferiblemente de 0,02 a 0,05 e incluso más preferiblemente 0,037.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el compuesto y/o el componente lipídico auxiliar está presente como una dispersión en un medio acuoso.

45 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el compuesto y/o el componente lipídico auxiliar está presente como una solución en un solvente hidrosoluble, en donde, preferiblemente, el solvente se selecciona del grupo que comprende etanol y *tert*-butanol.

50 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico bicatenario, preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, y en donde, preferiblemente, la razón molar del iRNA por el lípido catiónico es de 0 a 0,075, preferiblemente de 0,02 a 0,05 e incluso más preferiblemente 0,037.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, la composición contiene un ácido nucleico, en donde la razón de carga de los fosfatos del esqueleto del ácido nucleico por los átomos de nitrógeno de lípido catiónico es de 1:1,5-7, preferiblemente 1:4.

5 En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, el tamaño de las partículas en la dispersión es de 120 nm.

En una realización preferida del segundo y el tercer aspecto, la dispersión es una dispersión concentrada que contiene el siRNA de 1 a 100 μ M, en donde preferiblemente la dispersión concentrada está diluida *in vivo* o *in vitro* de 1:100 a 1:10.000, más preferiblemente 1:1.000.

10 En un cuarto aspecto, el problema en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante la utilización de un compuesto de acuerdo con el primer aspecto o una composición de acuerdo con el segundo o el tercer aspecto, para la fabricación de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento del cáncer y/o de enfermedades cardiovasculares relacionadas.

15 En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para el tratamiento del cáncer, en donde preferiblemente el cáncer se selecciona del grupo que comprende tumores sólidos y no sólidos, y en donde más preferiblemente el tumor sólido se selecciona del grupo que comprende cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon y carcinoma hepatocelular.

En una realización del cuarto aspecto, el cáncer implica un procedimiento seleccionado del grupo que comprende angiogénesis y neoangiogénesis.

20 En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para la administración del ácido nucleico a una célula seleccionada del grupo que comprende células endoteliales, células epiteliales y células tumorales, preferiblemente la célula es una célula endotelial.

En una realización del cuarto aspecto, las células endoteliales son células endoteliales de la vasculatura.

En una realización del cuarto aspecto, la vasculatura es la vasculatura que surge de la neoangiogénesis, preferiblemente la neoangiogénesis asociada a un tumor.

25 En una realización del cuarto aspecto, la vasculatura se selecciona del grupo que comprende vasculatura hepática, vasculatura cardíaca, vasculatura renal, vasculatura pancreática y vasculatura pulmonar.

En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para la administración sistémica.

En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para la administración local.

30 En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares relacionadas, en donde las enfermedades cardiovasculares se seleccionan del grupo que comprende cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca, hipertensión, trombosis, infarto de miocardio, cardiopatías isquémicas, tales como angina de pecho, y arterioesclerosis.

35 En una realización del cuarto aspecto, el medicamento es para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Preferiblemente tal angiogénesis está relacionada con los siguientes órganos y enfermedades, en donde se ha descrito que la angiogénesis ocasiona tal enfermedad y, por lo tanto, permite la utilización de la composición de acuerdo con la presente invención (Carmeliet P., *Nature Medicine* 9, 653-660 (2003)):

vasos sanguíneos malformaciones vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernoso, arterioesclerosis, arteriopatía por trasplante, hipertensión, diabetes, reestenosis

tejido adiposo obesidad

piel psoriasis, verrugas, dermatitis alérgica, queloides de cicatrización, granulomas piogénicos, enfermedad vesicante, sarcoma de Kaposi en pacientes con sida, alopecia, púrpura de la piel, telangiectasia, formación de lagos venosos

ojo síndrome vítreo hiperplásico persistente, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, neovascularización coroidal

pulmón hipertensión pulmonar primaria, asma, pólipos nasales, insuficiencia respiratoria neonatal, fibrosis pulmonar, enfisema

intestinos	enteropatía inflamatoria y enfermedad periodontal, ascitis, adherencias peritoneales
aparato reproductor	endometriosis, hemorragia uterina, quistes de ovario, hiperestimulación ovárica, preeclamsia
hueso, articulaciones	artritis, sinovitis, osteomielitis, formación de osteófitos, osteoporosis, deterioro de la consolidación de las fracturas óseas
sistema nervioso	enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética, accidente cerebrovascular
digestivo	úlceras gástricas u orales, enfermedad de Crohn
riñón	nefropatía

En un quinto aspecto, el problema en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante la utilización de un compuesto de acuerdo con el primer aspecto y/o la composición de acuerdo con el segundo y/o el tercer aspecto para la fabricación de un agente diagnóstico.

- 5 En un sexto aspecto, el problema en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante la utilización de un compuesto de acuerdo con el primer aspecto o una composición de acuerdo con el segundo y/o el tercer aspecto, *in vitro* como un agente de transferencia.

10 En una realización del sexto aspecto, el agente de transferencia transfiere un componente farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula de humano.

En una realización del sexto aspecto, la célula es una célula endotelial, preferiblemente una célula asociada al endotelio vascular.

- 15 En un séptimo aspecto, el problema en el que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante un método *in vitro* para transferir un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que comprende las etapas siguientes:

- aportar la célula o la membrana;
- aportar un compuesto de acuerdo con cualquiera del primer aspecto;
- aportar el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional; y

- 20 - poner en contacto la célula o la membrana con el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional, y el compuesto de acuerdo con el primer aspecto.

En un octavo aspecto, el problema en el que fundamenta la presente invención se soluciona mediante un método *in vitro* para transferir un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que da a conocer las etapas siguientes:

- 25 - aportar la célula o la membrana;
- aportar una composición de acuerdo con el segundo o el tercer aspecto; y
 - poner en contacto la célula o la membrana con la composición de acuerdo con el segundo o el tercer aspecto.

En una realización del séptimo u octavo aspecto, el compuesto farmacéuticamente activo que comprende como etapa adicional:

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

Se describe en la presente memoria un método para la síntesis de la *N*-palmitiloleilamina que comprende las etapas siguientes:

- aportar ácido oleico;

- aportar palmitilamina;

- hacer reaccionar el ácido oleico y la palmitilamina para formar la *N*-palmitiloleoilamida; y

- reducir la *N*-palmitiloleoilamida a *N*-palmitiloleilamina,

5 en donde el ácido oleico está puro al menos al 90%, más preferiblemente al 95% y lo más preferiblemente al 99%, en donde el porcentaje es la razón molar de ácido oleico y cualquier ácido graso que no sea ácido oleico.

En un caso, el ácido oleico y la palmitilamina se hacen reaccionar a temperatura ambiente.

En un caso, el ácido oleico se somete a un tratamiento antes de hacerlo reaccionar con la palmitilamina, en donde el tratamiento previo comprende hacer reaccionar el ácido oleico con el cloroformiato de etilo, preferiblemente en diclorometano anhidro o tetrahidrofurano anhidro.

10 En un caso, la reacción se lleva a cabo a 0 °C, preferiblemente en gas inerte.

En un caso, la reacción se hace reaccionar además con un depurador ácido, en donde el depurador ácido se selecciona preferiblemente del grupo que comprende trietilamina, diisopropiletilamina y piridina.

En un caso, la razón molar del éster etílico del ácido clorofórmico, ácido oleico, trietilamina y palmitilamina es 1-1,05:1:1-3:1-1,10.

15 En un caso, la reducción de la *N*-palmitiloleoilamida a *N*-palmitoleilamina se lleva a cabo con LiAlH₄.

En un caso, después de hacer reaccionar el ácido oleico con la palmitilamina, se lava la reacción, se precipita, y el precipitado así obtenido se retrocristaliza optativamente.

20 En un noveno aspecto, el problema en que se fundamenta la presente invención se soluciona mediante la utilización de un compuesto de acuerdo con el primer aspecto o una composición de acuerdo con el segundo o el tercer aspecto para la administración sistémica, preferiblemente la administración sistémica a un vertebrado.

En una realización del noveno aspecto, el vertebrado es un mamífero, más preferiblemente un mamífero seleccionado del grupo que comprende ratón, rata, conejillo de Indias, gato, perro, mono y hombre.

25 Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden, tal y como se representa en la figura 1, considerarse que comprenden 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 formado por el resto R3. El presente inventor ha hallado sorprendentemente que esta clase de compuesto que muestra una carga positiva en el grupo conector es particularmente idónea para transferir los compuestos biológicamente activos sobre una membrana celular y preferiblemente al interior de las células, más preferiblemente de las células animales. De igual forma, el presente inventor ha hallado sorprendentemente que la transferencia mediada por los compuestos de acuerdo con la presente
30 invención será particularmente eficaz si el compuesto biológicamente activo es un ácido nucleico, más preferiblemente siRNA y siNA.

35 Tal y como se utiliza preferiblemente en la presente memoria, el término alquilo hace referencia a un radical alifático saturado que contiene de 8 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 18 átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo alifático mono- o poliinsaturado que contiene de 8 a 30 átomos de carbono, que contiene al menos un doble enlace y un triple enlace, respectivamente. Así pues, en una realización preferida, el término alquilo también comprende alqueno y alquino. Alquilo hace referencia tanto a ramificado como a sin ramificar, a saber, grupos alquilo de cadena no lineal o lineal. Los grupos alquilo de cadena lineal preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono. Los grupos alquilo de cadena lineal más preferidos contienen de 12 a 18 átomos de carbono. Los grupos alquilo ramificados preferidos contienen de 8 a 30 átomos de carbono, en donde el número de 8 a 30 átomos de carbono hace referencia 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 se ramifica desde el esqueleto, en donde el grupo alquilo es como está definido en la presente memoria, más preferiblemente con el grupo alquilo que comprende grupos alquilo de cadena corta, más preferiblemente que comprende de 1 a 6, incluso más preferidos de 1 a 3 y los más preferidos 1 átomo de C. Más preferidos son los grupos alquilo ramificados que contienen de 12 a 18
40 átomos de carbono en el esqueleto, en donde los grupos alquilo que se ramifican son como está definido más arriba. Un grupo alquilo particularmente preferido es el grupo fitanilo.

45 En una realización alternativa, el alquilo es un grupo alquilo insaturado ramificado o sin ramificar tal y como está definido más arriba. Más preferiblemente, tal radical de hidrocarburo alifático insaturado contiene 1, 2 o 3 o 4 dobles enlaces, en donde un radical que tiene un doble enlace es particularmente preferido. Lo más preferido es el oleilo que es C18:1Δ9, a saber, un radical de hidrocarburo alifático que tiene 18 átomos de C, en donde en la posición 9 está presente un doble enlace en configuración *cis* en vez de un enlace simple para unir el átomo de C número 9 al átomo de C número 10.
50

Tal y como se usa en la presente memoria, n es cualquier entero entre 1 y 4, lo que significa que n podría ser 1, 2, 3 y 4. Tal y como se utiliza en la presente memoria, m es cualquier entero entre 1 y 3, lo que significa que m podría ser 1, 2 y 3.

Se debe saber que los compuestos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente lípidos catiónicos. Más preferiblemente, cualquiera de los grupos NH o NH₂ presentes en los compuestos de acuerdo con la presente invención están presentes en una forma protonada. Típicamente, cualquier carga positiva del compuesto de acuerdo con la presente invención está compensada por la presencia de un anión. Tal anión puede ser un anión monovalente o polivalente. Los aniones preferidos son haluros, acetato y trifluoroacetato. Los haluros, tal y como se usan en la presente memoria, son preferiblemente fluoruros, cloruros, yoduros y bromuros. Los más preferidos son los cloruros. Tras la asociación del lípido catiónico y el compuesto biológicamente activo a ser transferido al interior de una célula, el anión haluro es remplazado por el compuesto biológicamente activo que preferiblemente presenta una o varias cargas negativas, aunque se tiene que saber que la carga global del compuesto biológicamente activo no es necesariamente negativa.

Se tiene que saber que cualquier compuesto de acuerdo con la fórmula (I) comprende al menos dos átomos de C asimétricos. Está dentro de la presente invención que cualquier posible enantiómero de tal compuesto esté descrito en la presente memoria, a saber, en concreto el enantiómero *R-R*; *S-S*; *R-S* y *S-R*.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden formar una composición o ser parte de una composición, en donde tal composición comprende un vehículo. En tal composición que también se denomina en la presente memoria composición lipídica, los compuestos de acuerdo con la presente invención también se denominan componentes lipídicos. Tal vehículo es preferiblemente un vehículo líquido. Los vehículos líquidos preferidos son los vehículos acuosos y los vehículos no acuosos. Los vehículos acuosos preferidos son agua, sistemas tamponantes acuosos, más preferiblemente sistemas tamponantes que tienen una fuerza tamponante fisiológica y sal o sales a concentraciones fisiológicas. Los vehículos no acuosos preferidos son solventes, preferiblemente solventes orgánicos, tales como etanol, *tert*-butanol. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se puede utilizar, en principio, cualquier solvente orgánico hidrosoluble. Se tiene que saber que la composición, más en concreto la composición lipídica, puede presentarse, así pues, como liposomas o formar liposomas.

La composición de acuerdo con la presente invención podría comprender uno o varios lípidos auxiliares que también se denominan en la presente memoria componentes lipídicos auxiliares. Los componentes de lípidos auxiliares se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides. Los fosfolípidos son preferiblemente di- y monoésteres del ácido fosfórico. Los miembros preferidos de los fosfolípidos son los fosfoglicéridos y los esfingolípidos. Los esteroides, tal y como se utilizan en la presente memoria, son como los que hay en la naturaleza y los compuestos sintéticos se basan 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 la 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) y la 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

Las composiciones particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden alguno de trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#6], trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#11] o trihidrocloruro de ε-arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#15] en combinación con DPhyPE, en donde el contenido de DPhyPE es preferiblemente el 80% en moles, 65% en moles, 50% en moles y 35% en moles, en donde la terminología % en moles hace referencia al porcentaje del contenido lipídico total de la composición, a saber, el contenido lipídico de la composición que incluye el lípido catiónico de acuerdo con la presente invención y cualquier lípido adicional, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, cualquier lípido auxiliar.

Se encuentra dentro de la presente invención que la composición de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente el compuesto de acuerdo con la presente invención y/o uno o varios de los lípidos auxiliares tal y como está descrito en la presente memoria, en donde bien el compuesto de acuerdo con la presente invención, a saber, el lípido catiónico, y/o el componente de lípido auxiliar está presente como una dispersión en un medio acuoso. Como alternativa, el compuesto de acuerdo con la presente invención, a saber, el lípido catiónico y/o el componente de lípido auxiliar está(n) presente(s) como una solución en un solvente hidrosoluble. Como un medio acuoso, se utiliza preferiblemente cualquiera de los vehículos acuosos que están descritos en la presente memoria. Los solventes hidrosolubles preferidos son cualquier solvente que forma una fase homogénea con agua en cualquier proporción. Los solventes preferidos son etanol y *tert*-butanol. Se ha de saber que la composición, más en concreto la composición lipídica, puede así pues estar presente como liposomas o formar liposomas.

Se ha de saber que la composición de acuerdo con la presente invención en sus diferentes realizaciones también se podría utilizar como una composición farmacéutica. En el último caso, la composición farmacéutica comprende un compuesto farmacéuticamente activo y, optativamente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo farmacéuticamente aceptable podría, preferiblemente, seleccionarse del grupo de vehículos que está definido en la presente memoria junto con la composición de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la técnica sabrán

que cualquier composición que esté descrita en la presente memoria podría, en principio, utilizarse también como una composición farmacéutica siempre y cuando 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 adicional de la composición de acuerdo con la presente invención, que es preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo, más preferiblemente cualquier compuesto biológicamente activo que está descrito en la presente memoria. El otro constituyente, compuesto farmacéuticamente activo y/o compuesto biológicamente activo se selecciona preferiblemente del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.

Preferiblemente, tal compuesto biológicamente activo es una molécula cargada negativamente. La terminología molécula cargada negativamente significa que incluye moléculas que tienen al menos un grupo cargado negativamente que puede emparejarse iónicamente con el grupo cargado positivamente del lípido catiónico de acuerdo con la presente invención, aunque el presente inventor no desea comprometerse con ninguna teoría. En principio, la carga positiva del resto conector podía también tener algo de efecto sobre la estructura global del lípido como tal o bien de cualquier complejo formado entre el lípido catiónico y la molécula cargada negativamente, a saber, el compuesto biológicamente activo. Además de esto, la carga positiva adicional introducida en el lípido de acuerdo con la presente invención en comparación con los lípidos catiónicos descritos en la patente de los EE. UU. n.º 6.395.713, debería contribuir a un incremento de la toxicidad de este lípido, tal y como se presenta en Xu Y, Szoka FC Jr: *Biochemistry*, 7 de mayo de 1996, 35 (18): 5616-23. A diferencia de lo que el experto en la técnica habría esperado de este documento de la técnica anterior, los compuestos de acuerdo con la presente invención son particularmente idóneos para los diferentes propósitos descritos en la presente memoria y están, en particular, desprovistos de cualquier incremento de toxicidad.

Un péptido a utilizar preferiblemente en la presente memoria es cualquier polímero que consiste en al menos dos aminoácidos que están covalentemente unidos uno al otro, preferiblemente a través de un enlace peptídico. Más preferiblemente, un péptido consiste en dos a diez aminoácidos. Una realización particularmente preferida del péptido es un oligopéptido que incluso más preferiblemente comprende de 10 a 100 aminoácidos. Las proteínas tal y como se utilizan preferiblemente en la presente memoria son polímeros que consisten en multitud de aminoácidos que están unidos covalentemente los unos a los otros. Preferiblemente, tales proteínas comprenden al menos 100 aminoácidos o restos de aminoácidos.

Una proteína preferida que podría utilizarse junto con el lípido catiónico y la composición de acuerdo con la presente invención es cualquier anticuerpo, preferiblemente cualquier anticuerpo monoclonal.

Los compuestos biológicamente activos particularmente preferidos, a saber, compuestos farmacéuticamente activos y tal constituyente adicional que se utiliza junto con la composición de acuerdo con 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 a utilizar preferiblemente en la presente memoria es un ácido nucleico que no es un ácido nucleico que codifica un péptido y proteína, respectivamente. Los ácidos nucleicos funcionales preferidos son siRNA, siNA, iRNA, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, aptámeros y espejómicos que se conocen bien en la técnica.

Los siRNA son ARN interferentes pequeños como, por ejemplo, los descritos en la solicitud de patente internacional en el marco PCT/EP03/08666. Estas moléculas consisten típicamente en una estructura de ARN bicatenaria que comprende entre 15 y 25, preferiblemente 18 y 23 pares de nucleótidos cuyas bases se emparejan unas a otras, a saber, son esencialmente complementarios entre sí, típicamente mediante apareamientos de bases de Watson y Crick. Una hebra de esta molécula de ARN bicatenaria es esencialmente complementaria a un ácido nucleico diana, preferiblemente un ARNm, mientras la segunda hebra de dicha molécula de ARN bicatenaria es esencialmente idéntica a un tramo de dicho ácido nucleico diana. La molécula de siRNA podría estar flanqueada a cada lado y en cada tramo, respectivamente, por una serie de oligonucleótidos adicionales que, sin embargo, no necesariamente se han de emparejar según la base entre sí.

El iRNA tiene esencialmente el mismo diseño que el siRNA, aunque las moléculas son significativamente más largas que en el siRNA. Las moléculas de iRNA comprenden típicamente 50 o más nucleótidos y pares de bases, respectivamente.

Una clase de ácidos nucleicos adicionales que son activos basándose en el mismo modo de acción que el siRNA y el iRNA es el siNA. El siNA se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional en el marco PCT/EP03/074654. Más en concreto, el siNA corresponde al siRNA, en donde la molécula de siNA no comprende ningún ribonucleótido.

Los ácidos nucleicos antisentido, tal y como se utilizan preferiblemente en la presente memoria, son oligonucleótidos que se hibridan basándose en la complementariedad de bases con un ARN diana, preferiblemente ARNm, lo que activa la ARNasa H. La ARNasa H se activa por el ADN con enlaces fosfodiéster como unido mediante fosfotioatos. Sin embargo, el ADN con enlaces fosfodiéster se degrada rápidamente por la acción de las nucleasas celulares, lo que no ocurre con el ADN unido mediante fosfotioatos. Así pues, los polinucleótidos antisentido son eficaces solo

como complejos híbridos ADN-ARN. Las longitudes preferidas de los ácidos nucleicos antisentido oscilan de 16 a 23 nucleótidos. Los ejemplos de esta clase de oligonucleótidos antisentido están descritos, entre otras, en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.849.902 y 5.989.912.

5 Un grupo más de ácidos nucleicos funcionales son las ribozimas, que son ácidos nucleicos activos con actividad catalítica que consisten preferiblemente en ARN que básicamente comprende dos partes. La primera parte muestra una actividad catalítica, mientras que la segunda parte es responsable de la interacción específica con el ácido nucleico diana. Tras la interacción entre el ácido nucleico diana y dicha parte de la ribozima, típicamente mediante hibridación y emparejamiento de bases de Watson y Crick de tramos de bases esencialmente complementarias en las dos hebras que se hibridan, la parte catalíticamente activa podría volverse activa, lo que significa que escinde, de manera bien intramolecular o intermolecular, el ácido nucleico diana en el caso de que la actividad catalítica de la ribozima sea una actividad fosfodiesterasa. Las ribozimas, su uso y los principios para diseñarlas los conocen los expertos en la técnica y, por ejemplo, se describen en Doherty y Doudna (*Annu. Ref. Biophys. Biomolstruct.* 2000; 30: 457-75).

15 Un grupo más de ácidos nucleicos funcionales son los aptámeros. Los aptámeros son ácidos nucleicos de isomería D que son bien monocatenarios o bien bicatenarios, y que interaccionan específicamente con una molécula diana. La fabricación o selección de los aptámeros está descrita, por ejemplo, en la patente europea EP 0533 838. A diferencia de iRNA, siRNA, siNA, nucleótidos antisentido y ribozimas, los aptámeros no degradan ningún ARNm diana, sino que interaccionan específicamente con la estructura secundaria o terciaria de un compuesto diana, tal como una proteína. Tras la interacción con la diana, la diana muestra típicamente un cambio en su actividad biológica. La longitud de los aptámeros oscila típicamente de tan solo 15 hasta nada menos que 80 nucleótidos, y preferiblemente oscila de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos.

20 Otro grupo de ácidos nucleicos funcionales son los espejómeros que, por ejemplo, se describen en la solicitud de patente internacional WO 98/08856. Los espejómeros son moléculas similares a los aptámeros. Sin embargo, los espejómeros consisten en, por completo o bien principalmente, nucleótidos L en vez de nucleótidos D, a diferencia de los aptámeros. Por lo demás, en particular con respecto a la posible longitud de los espejómeros, a los espejómeros se les aplica lo mismo que se describió con respecto a los aptámeros.

30 Tal y como se mencionó anteriormente, el presente inventor ha hallado sorprendentemente que el compuesto de acuerdo con la presente invención y las correspondientes composiciones que comprenden tal compuesto pueden ser particularmente eficaces a la hora de transferir los iRNA y, más en concreto, siRNA y siNA, al interior de una célula. Se ha de observar que, aunque no se quiera comprometer con ninguna teoría, debido a los porcentajes en moles concretos de los lípidos auxiliares contenidos en las composiciones lipídicas de acuerdo con la presente invención, cuyo lípido auxiliar puede ser un lípido auxiliar sin PEG o bien en particular un lípido auxiliar que contiene PEG, se pueden apreciar efectos sorprendentes, más en concreto si el contenido de cualquiera de esta clase de lípido auxiliar está contenido dentro del margen de concentración especificado en la presente memoria. Junto con esto, cabe destacar notablemente que, si la composición de acuerdo con la presente invención contiene un lípido auxiliar que comprende un resto de PEG, cualquier acción de administración o transfección que utiliza tal composición que contiene el lípido auxiliar derivado de PEG es particularmente eficaz a la hora de administrar el ácido nucleico, particularmente moléculas de iRNA, lo más particularmente siRNA, siNA, nucleótidos antisentido y ribozimas. La razón para esto es que los presentes inventores han hallado sorprendentemente que los liposomas que contienen más del 4% de lípidos auxiliares que contienen PEG no son activos, mientras que los liposomas con menos del 4% (preferiblemente menos del 3%) intervienen en la administración funcional. Básicamente, los presentes inventores han descubierto que la cantidad específica de PEG en las composiciones lipídicas de acuerdo con la presente invención es idónea para dar a conocer una transfección y administración eficaces, respectivamente.

45 En un aspecto más, los presentes inventores han hallado sorprendentemente que las composiciones lipídicas de acuerdo con la presente invención que están preferiblemente presentes como lipoplejos o liposomas muestran preferiblemente una carga catiónica global y, así pues, un exceso de al menos una carga positiva. Más preferiblemente, las composiciones lipídicas muestran una proporción de carga negativa:positiva de 1:1,3 a 1:5. Por lo tanto, la presente invención está, así pues, relacionada en un aspecto más con cualquier composición lipídica que comprende al menos un lípido catiónico y un ácido nucleico, preferiblemente un iRNA, siRNA o siNA, o cualquier otro de los ácidos nucleicos funcionales definidos en la presente memoria, que tenga una proporción de carga negativa:positiva de 1:1,3 a 1:5. El lípido catiónico es preferiblemente cualquier lípido catiónico descrito en la presente memoria. En una realización preferida, la composición lipídica comprende cualquier lípido auxiliar o combinación de lípidos auxiliares, tal y como está descrito en la presente memoria. En una realización preferida, la composición de acuerdo con la presente invención que contiene los ácidos nucleicos forma lipoplejos. En una realización preferida, el término lipoplejos, tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una composición compuesta por lípido catiónico, lípido auxiliar neutro y ácido nucleico.

60 Los presentes inventores también han hallado que, en particular, la proporción molar del siRNA y del lípido catiónico puede ser crucial para la aplicación satisfactoria de la composición lipídica de acuerdo con la presente invención, en especial en vistas de lo que se ha dicho más arriba con respecto a la carga global catiónica de las formulaciones lipídicas que contienen el ácido nucleico. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, parece ser que 1 mol de

lípidos catiónicos, en particular tal y como está descrito en la presente memoria, puede dar a conocer un máximo de tres cargas positivas por molécula, mientras que el ácido nucleico y más en concreto las moléculas de siRNA que están descritas en la presente memoria, aportan un máximo de 40 cargas negativas por molécula. Para alcanzar una carga positiva global de las formulaciones lipídicas que contienen el siRNA de acuerdo con la presente invención, la relación molar puede oscilar de 0 a un máximo de 0,075. Un margen preferido de proporción molar es de 0,02 a 0,05 e incluso más preferido es un margen de proporción molar de 0,037.

Otro hallazgo sorprendente de los presentes inventores es que la composición de acuerdo con la presente invención muestra características particularmente útiles si la composición contiene un ácido nucleico, preferiblemente una molécula de siRNA o una molécula de siNA, y la proporción de la carga de los fosfatos del esqueleto del ácido nucleico con respecto a los átomos de nitrógeno del lípido catiónico es de 1:1,5-7, más preferiblemente de 1:4. La terminología fosfatos del esqueleto del ácido nucleico, tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los restos de fosfato del ácido nucleico aportados por cada nucleótido que forma tal ácido nucleico. La terminología átomo de nitrógeno del lípido catiónico, tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los átomos de nitrógeno aportados por el lípido catiónico que comprende preferiblemente un total de tres cargas positivas. Dichas tres cargas positivas las aportan dos grupos amino primarios y el grupo de guanidina. Con el propósito de determinar la carga aportada por los fosfatos del esqueleto del ácido nucleico, se realizan las siguientes suposiciones: cada fosfato entre dos nucleósidos aporta una carga negativa y el fosfato del extremo 3', si está presente, aporta dos cargas negativas. Con el propósito de determinar la proporción de las cargas aportadas por los átomos de nitrógeno del lípido catiónico y las cargas aportadas por los átomos de fosfato, se supone que las cargas están presentes tal y como está descrito más arriba, aunque se ha de reconocer que en las circunstancias concretas observadas en la aplicación *in vitro* y/o *in vivo*, la proporción de la carga eficaz podría ser diferente de la especificada más arriba.

La proporción de la carga definida más arriba garantiza la transferencia eficaz del ácido nucleico a través de una membrana de fosfolípidos en bicapa, tal como una membrana citoplasmática.

Un rasgo más de la composición de acuerdo con la presente invención que aporta sus características de administración es su distribución de tamaños. Preferiblemente, la distribución de tamaños de la composición de acuerdo con la presente invención que está presente como una dispersión es de aproximadamente 120 nm. El tamaño se determina preferiblemente mediante la dispersión óptica elástica Quasi, tal y como está descrito con más detalle en la parte de los ejemplos.

Los presentes inventores han hallado sorprendentemente que la composición de acuerdo con la presente invención sea particularmente idónea para introducir ácidos nucleicos, preferiblemente ácidos nucleicos funcionales, tales como moléculas de siRNA y siNA, al interior de las células. Tal y como se describe con más detalle en los ejemplos, las composiciones de acuerdo con la presente invención son muy activas a la hora de introducir dichos ácidos nucleicos en el espacio intracelular de células endoteliales, células epiteliales y células cancerosas. Parece haber una especificidad incluso mayor, de tal manera que la administración es particularmente activa en las células del endotelio vascular, aunque otras células endoteliales también pueden ser infectadas con la composición de acuerdo con la presente invención. Se produce una transfección particularmente eficaz con las células del endotelio vascular, más específicamente de la vasculatura que es el resultado de la neoangiogénesis, como la inducida por los tumores. Otra vasculatura que se podría tratar es la vasculatura del riñón, del corazón, del pulmón, del hígado y del páncreas.

Se ha de saber que la composición de acuerdo con la presente invención es también beneficiosa en la medida en que es particularmente suave o no tóxica. Tal falta de toxicidad es claramente ventajosa frente a las composiciones de la técnica anterior, ya que contribuirá de manera significativa al beneficio medicinal de cualquier tratamiento que utilice esta clase de composición al evitar los efectos secundarios, lo que incrementa el cumplimiento del paciente y las formas concretas de administración, tales como la administración i.v. en embolada. Lo último es, como se podría deducir de la parte de ejemplos en la presente memoria, evidente a partir de estudios con animales.

Se encuentra dentro de la presente invención que la composición, y, más en concreto, la composición farmacéutica, podría comprender uno o varios de los compuestos biológicamente activos mencionados más arriba que podrían estar contenidos en una composición de acuerdo con la presente invención como compuesto farmacéuticamente activo y como constituyente adicional, respectivamente. Los expertos en la técnica conocerán que cualquiera de estos compuestos puede, en principio, utilizarse como un compuesto farmacéuticamente activo. Tal compuesto farmacéuticamente activo está dirigido típicamente contra una molécula diana que está implicada en el mecanismo patológico de una enfermedad. Debido al principio de diseño general y al modo de acción en que se fundamentan los diferentes compuestos biológicamente activos y, así pues, los compuestos farmacéuticamente activos tal y como se usan en relación con cualquier aspecto de la presente invención, se puede tratar virtualmente cualquier diana. En consecuencia, el compuesto de acuerdo con la presente invención y las correspondientes composiciones que contienen el mismo se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o afección que se puede atender, prevenir y/o tratar con esta clase de compuestos biológicamente activos. Se ha de conocer que, además de estos compuestos biológicamente activos, cualquier otro compuesto biológicamente activo también puede ser parte de una composición de acuerdo con cualquier realización de la presente invención. Preferiblemente tal otro compuesto biológicamente activo comprende al menos una carga negativa, preferiblemente en las

condiciones en las que tal otro compuesto biológicamente activo interacciona o forma un complejo con el compuesto de acuerdo con la presente invención, más preferiblemente el compuesto de acuerdo con la presente invención que está presente como un lípido catiónico.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un compuesto biológicamente activo es preferiblemente cualquier compuesto que es biológicamente activo, que preferiblemente muestra algún efecto biológico, químico y/o físico sobre un sistema biológico. Tal sistema biológico es preferiblemente cualquier reacción bioquímica, cualquier célula, preferiblemente cualquier célula animal, más preferiblemente cualquier célula de vertebrado y lo más preferiblemente cualquier célula de mamífero, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, cualquier célula de humano, cualquier tejido, cualquier órgano y cualquier organismo. Tal organismo se selecciona preferiblemente del grupo que comprende ratones, ratas, conejillos de Indias, conejos, gatos, perros, monos y humanos.

10 También está dentro la presente invención que cualquiera de las composiciones de acuerdo con la presente invención, más en concreto cualquier composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención podría comprender cualquier compuesto o compuestos adicionales farmacéuticamente activos.

15 La composición, en concreto la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar para diferentes formas de administración, en donde la administración local y la administración sistémica son particularmente preferidas. Incluso más preferida es una vía de administración que se selecciona del grupo que comprende la administración intramuscular, percutánea, subcutánea, intravenosa y pulmonar. Tal y como se utiliza preferiblemente en la presente memoria, la administración local significa que la correspondiente composición se administra en una relación espacial cercana a la célula, tejido y órgano, respectivamente, al que la composición y el compuesto biológicamente activo, respectivamente, se han de administrar. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la administración sistémica significa una administración que es diferente de una administración local y, más preferiblemente, es la administración en un líquido corporal, tal como sangre y otros líquidos, respectivamente, en donde el líquido corporal transporta la composición hasta la célula, tejido y órgano, respectivamente, a los cuales la composición y el compuesto biológicamente activo, respectivamente, se han de administrar.

25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la célula a través de cuya membrana celular se ha de transferir un compuesto biológicamente activo por medio del compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, respectivamente, es preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula de vertebrado e incluso más preferiblemente una célula de mamífero. Más preferiblemente, la célula es una célula de humano.

30 Cualquier medicamento que se puede fabricar con el compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, respectivamente, es para el tratamiento y la prevención de un paciente. Preferiblemente, tal paciente es un vertebrado, más preferiblemente un mamífero, e incluso más preferiblemente tal mamífero se selecciona del grupo que comprende ratones, ratas, perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, monos y humanos. En un aspecto más, el compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar como un agente de transferencia, más preferiblemente como un agente de transfección.

35 Tal y como se utiliza preferiblemente en la presente memoria, un agente de transferencia es cualquier agente que es idóneo 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 al interior de una célula, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria. Preferiblemente, las células son células endoteliales, más preferiblemente células endoteliales de vertebrados y lo más preferiblemente células endoteliales de mamíferos, tales como ratones, ratas, conejillos de Indias, perros, gatos, monos y seres humanos.

45 Aún en otro aspecto, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para la transferencia, más en concreto la transfección, de una célula con un compuesto biológicamente activo. En una primera etapa, en donde la secuencia de las etapas no está necesariamente limitada, se aportan la célula y la membrana y la célula, respectivamente. En una segunda etapa, se aporta un compuesto de acuerdo con la presente invención, así como un compuesto biológicamente activo, tal como un compuesto farmacéuticamente activo. Esta reacción se puede poner en contacto con la célula y la membrana, respectivamente, y, debido a las características biofísicas del compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención, el compuesto biológicamente activo se transferirá de un lado de la membrana a otro o en caso de que la membrana forme una célula, desde el exterior de la célula al interior de la célula. Se encuentra dentro de la presente invención que antes de poner en contacto la célula y la membrana, respectivamente, el compuesto biológicamente activo y el compuesto de acuerdo con la presente invención, a saber, el lípido catiónico, se ponen en contacto, después de lo cual se forma preferiblemente un complejo, y tal complejo se pone en contacto con la célula y la membrana, respectivamente.

55 En otro aspecto de la presente invención, el método *in vitro* para transferir un compuesto biológicamente activo y un compuesto farmacéuticamente activo, respectivamente, comprende las etapas de aportar la célula y la membrana, respectivamente, aportar una composición de acuerdo con la presente invención, y poner en contacto tanto la composición como la célula y la membrana, respectivamente. Se encuentra dentro de la presente invención que la composición se podría haber formado antes o durante la puesta en contacto con la célula y la membrana,

respectivamente.

En una realización de cualquier método *in vitro* para transferir un compuesto biológicamente activo, tal y como se describe en la presente memoria, el método podría comprender más etapas, preferiblemente la etapa de detectar si se ha transferido el compuesto biológicamente activo. Tal reacción de detección depende mucho de la clase de compuestos biológicamente activos transferidos de acuerdo con el método y será con facilidad obvio para los expertos en la técnica. Se encuentra dentro de la presente invención que tal método se realice en cualquier célula, tejido, órgano y organismo, tal y como está descrito en la presente memoria.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por referencia a las siguientes figuras y ejemplos de los cuales se pueden extraer más características, realizaciones y ventajas de la presente invención. Más en concreto,

- 10 En la figura 1 se muestra el diseño básico del lípido catiónico de acuerdo con la presente invención;
- En la figura 2 se muestra la síntesis de la *N*-oleilpalmitilamina que es un posible material de partida para la síntesis de los compuestos de acuerdo con la presente invención, en donde tal síntesis es la que está de acuerdo con la técnica anterior, tal y como está descrito en la patente de los EE. UU. n.º 6.395.713;
- 15 En la figura 3 se representa la síntesis de la *N*-oleilpalmitilamina que es un material de partida importante de acuerdo con la presente invención;
- En las figuras 4 a 9 se representa la síntesis del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-aminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida y del trihidrocloruro de ϵ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida;
- 20 En la figura 10 se representa la síntesis de un grupo de cabeza catiónico alternativo, que un componente alternativo para la síntesis de los lípidos catiónicos de acuerdo con la presente invención;
- En la figura 11 se representa una vía de síntesis alternativa para la síntesis del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida;
- En las figuras 12A y 12B se representa la distribución de tamaños de las formulaciones lipídicas de acuerdo con la presente invención, y el impacto de la extrusión y de la homogeneización a alta presión, respectivamente;
- 25 En la figura 13 se representa el resultado de un análisis por transferencia Western de una formulación lipídica que contiene iRNA que ha sido expuesta a crioprotectores y se ha conservado a diferentes temperaturas;
- En la figura 14 se representa el resultado de un análisis por transferencia Western sobre el impacto de diferentes cargas de siRNA sobre las formulaciones lipídicas que difieren en su lípido auxiliar;
- 30 En la figura 15 se representa el resultado de un análisis por transferencia Western y el impacto de diferentes concentraciones de lípidos con sustituciones de PEG;
- En la figura 16 se representa la estrategia experimental utilizada para generar un modelo de ratón con tumor dependiente de Ras^{V12} y su uso en los análisis de diferentes formulaciones;
- En las figuras 17A, 17B y 17C se representan diagramas que indican el volumen del tumor en función de los días transcurridos tras la exposición de la célula a diferentes formulaciones;
- 35 En la figura 18a se representa el resultado de un análisis por transferencia Western del efecto del siRNA específico de PKN3 lipoplejado y desnudo;
- En la figura 18b hay fotografías de microscopia confocal que muestran la distribución intracelular de los siRNA desnudos y formulados;
- 40 En la figura 18c hay fotografías de microscopia de epifluorescencia (paneles superiores) y de microscopia confocal (panel inferior) que describen la distribución en el hígado de los siRNA formulados en liposomas y desnudos;
- En la figura 18d hay fotografías de microscopia de epifluorescencia y confocal de las células endoteliales sobre las que han actuado selectivamente los siRNA formulados en liposomas;
- En la figura 18e hay fotografías de microscopia de fluorescencia de las células endoteliales de diferentes tumores;
- 45 En la figura 19a hay una ilustración esquemática del modo de acción del siRNA dirigido contra PTEN sobre la síntesis del ADN, y muestra el resultado de un análisis por transferencia Western con la utilización de diferentes especies de siRNA, y fotografías de microscopia de inmunofluorescencia de células HELA tratadas con dichas especies diferentes de siRNA;

En la figura 19b se representan imágenes de células endoteliales tratadas con diferentes moléculas de siRNA y un diagrama que representa el resultado de un ensayo de BrdU en las células endoteliales del hígado;

En la figura 19c se representan imágenes de células endoteliales tratadas con diferentes moléculas de siRNA y un diagrama que representa el resultado de un ensayo de BrdU en las células endoteliales tumorales;

- 5 En la figura 20a se representa el resultado de un análisis por transferencia Western para determinar moléculas de siRNA potentes para el silenciamiento eficaz de CD31;

En la figura 20b hay un diagrama que ilustra el efecto del siRNA anti-CD31 sobre la cantidad del ARNm de CD31 en diferentes órganos de ratones;

- 10 En la figura 20c se muestra el resultado de un análisis por transferencia Western para determinar la eficacia del silenciamiento de la proteína CD31 en diferentes órganos de ratones mediante la utilización de moléculas de siRNA anti-CD31;

En la figura 20d se muestra el resultado del silenciamiento *in vivo* de la proteína CD31 mediante la inmunotinción directa de cortes tumorales en parafina de ratones tratados con moléculas de siRNA anti-CD31;

- 15 En la figura 21a se representa el resultado de un análisis por transferencia Western que estudia la eficacia de las moléculas del siRNA anti-CD31 y del siRNA anti-PTEN sobre el silenciamiento de CD31, CD34, PTEN y p-Akt;

En la figura 21b hay un diagrama que ilustra el efecto de diferentes patrones de la administración del lipoplejo sobre la masa corporal de los animales del análisis en función del tiempo;

En la figura 21c se representan diagramas que ilustran el efecto de diferentes pautas de tratamiento del siRNA anti-CD31 sobre el volumen de dos xenoinjertos tumorales diferentes; y

- 20 En la figura 21d hay un diagrama que ilustra la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de PC-3 consolidados bajo una pauta de tratamiento con anti-CD31.

Ejemplo 1: Síntesis de la *N*-oleilpalmitilamina de acuerdo con la técnica anterior.

- La *N*-oleilpalmitilamina es un material de partida importante para los compuestos de acuerdo con la presente invención. La *N*-oleilpalmitilamina puede, en principio, sintetizarse como se describe en la patente de los EE. UU. n.º 6.395.713. El esquema de reacción correspondiente está representado en la figura 2. Sin embargo, el material de partida es oleilamina de grado técnico tal y como lo proporciona, p. ej., Fluka. Un análisis de este material de partida mediante cromatografía de gases muestra una pureza de $\geq 70\%$, en donde el 30% del material consiste en una amina que tiene longitudes de cadena diferentes. La razón de ello podía ser que el material se obtiene como tal de las plantas. Combinar tanto la oleilamina como el 1-bromohexadecano (bromuro de palmitilo) produce la *N*-oleilpalmitilamina después de hacer reaccionar ambos materiales de partida de 100 °C a 120 °C durante 30 minutos. El rendimiento es de aproximadamente el 83%.

Ejemplo 2: Síntesis de la *N*-palmitiloleilamina de acuerdo con la presente invención

- Una nueva síntesis ha sido advertida por el presente inventor con respecto a los compuestos de acuerdo con la presente invención (figura 3). Este nuevo esquema de reacción se basa en el hallazgo del presente inventor de que la gran cantidad de impurezas afecta a la calidad del agente de transferencia preparado basándose en este material de partida. En consonancia, la reacción comienza con un ácido oleico que tiene una pureza de $\geq 99\%$, según se muestra por cromatografía de gases, y con la puesta en contacto de tal ácido oleico con etilcloroformiato, TEA y CH_2Cl_2 , y haciendo reaccionar el anhídrido carbónico-carboxílico mezclado así obtenido con hexadecilamina (palmitilamina) que tiene de nuevo una pureza de $\geq 99\%$, según se muestra por cromatografía de gases. El producto de la reacción, la *N*-palmitiloleilamida [#1] se hace reaccionar posteriormente con LiAlH_4 (en THF), lo que da lugar a la *N*-palmitiloleilamina [#2] al 85% que está presente como un sólido cristalino incoloro.

A continuación se describen las condiciones de reacción con más detalle.

Síntesis de la *N*-palmitiloleilamida [#1]

- Se disuelven 2,62 ml (27,5 mmol) del éster etílico del ácido clorofórmico en 30 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 250 ml con nitrógeno de acuerdo con Schlenk en gas inerte de argón, y se enfría a 0 °C. Se añade gota a gota una solución de 7,93 ml (25 mmol) de ácido oleico y 4,16 ml (30 mmol) de trietilamina en 40 ml de diclorometano anhidro con agitación durante 20 minutos. Después de agitar en un baño de hielo durante 30 minutos, se le añade rápidamente gota a gota una solución con 6,64 g (27,5 mmol) de palmitilamina en 50 ml de CHCl_3 y la mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, la solución se lava tres veces con 40 ml de agua cada vez, se seca la fase orgánica sobre Na_2SO_4 y se retira el solvente con un rotavapor. El residuo se retrocristaliza desde 100 ml de acetona. Se obtienen 11,25 g (22,3 mmol), que corresponden a un rendimiento del 89%, de un sólido incoloro.

Síntesis de la *N*-palmitiloleilamina [#2]

Se aportan 20 ml de LiAlH₄ a 1 M en éter bajo gas inerte de argón en un matraz de tres cuellos de 250 ml que tiene un embudo de goteo y un condensador de reflujo y, posteriormente, se le añade gota a gota una solución de 7,59 g (15 mmol) de palmitiloleilamida en 80 ml de THF durante 20 minutos. La mezcla se somete a reflujo durante 2,5 horas, a continuación se le añaden otros 5 ml de LiAlH₄ a 1 M en éter y se somete a reflujo durante otras 2,5 horas. El hidruro en exceso se descompone con NaOH a 6 M con enfriamiento en un baño de hielo y el precipitado se retira por filtración. El precipitado se extrae dos veces con 40 ml de MtBE caliente cada vez, las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na₂SO₄ y se retira el solvente con un rotavapor. El residuo se cristaliza desde 100 ml de MtBE a -20 °C. Se obtienen 6,23 g (12,7 mmol), que corresponden a un rendimiento del 85%, de un sólido cristalino incoloro.

Ejemplo 3: Síntesis de la Boc-Dap(Fmoc)-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#3]

Se disuelven 521 mg (1,06 mmol) de *N*-oleilpalmitilamina en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml y se le añaden 289 mg (1,17 mmol) de EEDQ. Posteriormente, se le añaden 500 mg (1,17 mmol) de Boc-Dap(Fmoc)-OH con agitación y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 horas. La solución se transfiere con 80 ml de diclorometano a un embudo de separación y se lava tres veces con 20 ml de HCl a 0,1 N cada vez y una vez con 20 ml de la solución saturada de NaHCO₃. Después del secado sobre Na₂SO₄, se retira el solvente con un rotavapor (figura 4). Se obtiene un aceite viscoso amarillento que ya no se purifica más. En la cromatografía en capa fina con hexano/acetato de etilo 1:1 se observa una R_f de 0,70.

Ejemplo 4: Síntesis de la Boc-Dap-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#4]

Se disolvió 1 g del producto bruto Boc-Dap(Fmoc)-*N*-palmitil-*N*-oleilamida en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml. Se le añadieron 3 ml de dietilamina y se agitaron a temperatura ambiente (figura 4). El control de la reacción por cromatografía en capa fina mostró que, después de 4,5 horas, se había completado la reacción del producto de partida. Los componentes volátiles se retiraron con un rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía con 40 g de gel de sílice 60 (Merck) con hexano/acetato de etilo 5:1. El producto se eluyó con una etapa en gradiente que consiste en acetato de etilo, acetato de etilo/metanol 4:1 y diclorometano/metanol 4:1. Se obtuvieron 576 mg (0,85 mmol) de la Boc-Dap-*N*-palmitil-*N*-oleilamida como un aceite viscoso amarillento.

Ejemplo 5: Síntesis de la tetra-Boc-[β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida] [#5]

Se disolvieron 576 mg (0,85 mmol) de Boc-Dap-*N*-palmitil-*N*-oleilamida en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 100 ml y se les añadieron 210 mg (0,85 mmol) de EEDQ y 403 mg (0,85 mmol) de Boc-Arg(Boc)₂-OH con agitación (figura 5). La mezcla se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, se retira el diclorometano mediante un rotavapor y el residuo en 100 ml de MtBE se transfiere a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó exhaustivamente con HCl a 0,1 N, NaOH a 1 N y solución saturada de NaHCO₃, se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. Posteriormente, el producto bruto se purificó por cromatografía rápida (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) con hexano/acetato de etilo como eluyente. Se obtuvieron 694 mg (0,61 mmol), que corresponden a un rendimiento del 72%, de un aceite viscoso incoloro.

Ejemplo 6: Síntesis del trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#6]

Se aportaron 694 mg (0,61 mmol) de la tetra-Boc[β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida] bien seca en una atmósfera de argón en un matraz de 25 ml con nitrógeno de acuerdo con Schlenk y se le añadieron 8 ml de HCl a 4 N en dioxano (figura 5). La mezcla se agitó en gas inerte de argón a temperatura ambiente durante 24 horas, mediante lo cual el producto se precipitó como un sólido amorfo y parcialmente ceroides a partir de la solución después de aproximadamente 6 a 8 horas. Después de completar la reacción (control en capa fina con CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65:25:4), se retiraron los componentes volátiles a gran vacío. Se obtuvieron 489 mg (0,58 mmol) de la β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida en forma de trihidrocloruro.

Ejemplo 7: Síntesis de la *N*-laurilmiristilamina [#7]

Se suspendieron 18,54 g (100 mmol) de dodecilamina (laurilamina), 6,36 g (60 mmol) de Na₂CO₃ y 50 mg de yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) en 100 ml de DMF anhidro en un matraz con 3 cuellos de 500 ml que tiene un condensador de reflujo y un embudo de goteo. Se le añadió gota a gota una solución de 16,4 ml (60 mmol) de 1-bromotetradecano en 100 ml de dioxano anhidro a 100 °C durante un periodo de 110 minutos y la mezcla se agitó durante otras 3,5 horas a 100 °C (figura 6). La solución se filtró a la temperatura más alta que fue posible alcanzar. El sólido cristalino que se precipitó a 4 °C durante una noche se retiró y se lavó con un poco de metanol frío. Posteriormente, el sólido se retrocristalizó desde 200 ml de metanol. Se obtuvieron 9 g de cristales folioides incoloros que se retrocristalizaron a partir de 100 ml de MtBE. Los cristales que precipitaron a -18 °C se retiraron por succión desde una frita enfriada y se lavaron con MtBE frío. Se obtuvieron 7,94 g (21 mmol) de un sólido cristalino incoloro, que se corresponde con un rendimiento del 35%.

Ejemplo 8: Síntesis de la Boc-Dap(Fmoc)-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#8]

Se disolvieron 715 mg (1,68 mmol) de Boc-Dap(Fmoc)-OH en 15 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml y se le añadieron 420 mg (1,7 mmol) de EEDQ. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y posteriormente se le añadió gota a gota una solución de 641 mg (1,68 mmol) de *N*-laurilmiristilamina en 25 ml de diclorometano anhidro lentamente durante 60 minutos (figura 6). Después de un tiempo de reacción de 20 horas, se retiró el solvente en un rotavapor y el residuo se transfirió con 100 ml de MtBE a un embudo de separación. La solución se lavó exhaustivamente con HCl a 0,1 N y solución saturada de NaHCO₃, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. Se obtuvieron 1,02 g de un producto bruto que se purificó por cromatografía rápida (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) con hexano/acetato de etilo como eluyente. Se obtuvieron 607 mg de producto bruto en forma de aceite muy viscoso e incoloro. La cromatografía en capa fina con hexano/acetato de etilo 1:1 proporcionó una R_f de 0,58.

Ejemplo 9: Síntesis de la Boc-Dap-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#9]

Se disolvieron 607 mg de Boc-Dap(Fmoc)-*N*-lauril-*N*-miristilamida en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml (figura 6). Se le añadieron 3 ml de dietilamina y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4,5 horas. Los constituyentes volátiles se retiraron en un rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía con 40 g de gel de sílice 60 (Merck) con hexano/acetato de etilo 5:1. El producto se eluyó con una etapa en gradiente que consistió en acetato de etilo, diclorometano y diclorometano/metanol 3:1. Se obtuvieron 372 mg (0,655 mmol) de Boc-Dap-*N*-lauril-*N*-miristilamida como un aceite viscoso amarillento.

Ejemplo 10: Síntesis de la tetra-Boc[β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida] [#10]

Se disolvieron 372 mg (0,655 mmol) de Boc-Dap-*N*-lauril-*N*-miristilamida en 8 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml y se le añadieron 162 mg (0,655 mmol) de EEDQ y 311 mg (0,655 mmol) de Boc-Arg-(Boc)₂-OH con agitación (figura 7). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, se retiró el diclorometano en un rotavapor y el residuo se transfirió con 80 ml de MtBE a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó exhaustivamente con HCl a 0,1 N., NaOH a 1 N y solución saturada de NaHCO₃, se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. El producto bruto se purificó posteriormente por cromatografía rápida (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) con una etapa en gradiente de hexano/acetato de etilo. Se obtuvieron 500 mg (0,5 mmol) de un aceite viscoso incoloro, que se corresponde con un rendimiento del 76%.

Ejemplo 11: Síntesis del trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#11]

Se aportaron 511 mg (0,5 mmol) de tetra-Boc-[β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida] bien seca en argón en un matraz con argón de 25 ml de acuerdo con Schlenk y se le añadieron 10 ml de HCl a 4 N en dioxano (figura 7). La mezcla se agitó en gas inerte de argón a temperatura ambiente durante 24 horas, con lo que el producto se precipitó como un sólido parcialmente amorfo y parcialmente ceroide a partir de la solución después de 6 a 8 horas. Tras completarse la reacción (control por cromatografía en capa fina con CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65:25:4), todos los componentes volátiles se retiraron a gran vacío. Se obtuvieron 323 mg (0,5 mmol) de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-lauril-*N*-miristilamida en forma de trihidrocloruro.

Ejemplo 12: Síntesis de la Boc-Lys(Fmoc)-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#12]

Se disolvieron 937 mg (2 mmol) de Boc-Lys(Fmoc)-OH en 10 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml y se le añadieron 495 mg (2 mmol) de EEDQ (figura 8). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y posteriormente se le añadió lentamente, gota a gota, una solución de 764 mg (2 mmol) de *N*-laurilmiristilamina en 30 ml de diclorometano anhidro durante 120 minutos. Después de un tiempo de reacción de 20 horas, el solvente se retiró en un rotavapor y el residuo se transfirió con 100 ml de MtBE a un embudo de separación. La solución se lavó exhaustivamente con HCl a 0,1 N y NaHCO₃ saturado, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. Se obtuvieron 1,757 g de un producto bruto que se purificó por cromatografía rápida con hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente. Se obtuvieron 1,377 g de producto bruto como un aceite muy viscoso e incoloro. La cromatografía en capa fina con hexano/acetato de etilo 1:1 dio una R_f de 0,57.

Ejemplo 13: Síntesis de la Boc-Lys-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#13]

Se disolvieron 1,377 g de Boc-Lys(Fmoc)-*N*-lauril-*N*-miristilamida en 16 ml de diclorometano anhidro en un matraz con fondo redondo de 50 ml. Se le añadieron 6 ml de dietilamina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas (figura 8). Los componentes volátiles se retiraron en un rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía con 40 g de gel de sílice 60 (Merck) con hexano/acetato de etilo 5:1. El producto se eluyó con una etapa en gradiente que consistió en acetato de etilo, diclorometano y diclorometano/metanol 3:1. Se obtuvieron 556 mg (0,911 mmol) de Boc-Lys-*N*-lauril-*N*-miristilamida como un aceite viscoso amarillento, así como 119 mg de una fracción mezclada.

Ejemplo 14: Síntesis de la tetra-Boc-[ε-arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida] [#14]

Se disolvieron 556 mg (0,911 mmol) de Boc-Lys-*N*-lauril-*N*-miristilamida en 40 ml de diclorometano anhidro y se le añadieron 226 mg (0,911 mmol) de EEDQ y 433 mg (0,911 mmol) de Boc-Arg(Boc)₂-OH con agitación (figura 9). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, el diclorometano se retiró en un rotavapor y el residuo se transfirió con 80 ml de MtBE a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó exhaustivamente con HCl a 0,1 N y solución saturada de NaHCO₃, se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. El producto bruto se purificó posteriormente por cromatografía rápida (CombiFlash Retrieve; Isco Inc.) con una etapa en gradiente de hexano/acetato de etilo. Se obtuvo un aceite viscoso e incoloro con un rendimiento de 730 mg (0,684 mmol) que se corresponde con el 75%.

Ejemplo 15: Síntesis del trihidrocloruro de ϵ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida [#15]

Se aportaron 730 mg (0,684 mmol) de la tetra-Boc- $[\epsilon$ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida] bien seca en argón en un matraz con argón de 25 ml de acuerdo con Schlenk y se le añadieron 10 ml de HCl a 4 N en dioxano (figura 9). La mezcla se agitó en gas inerte de argón a temperatura ambiente durante 24 horas, después de lo cual el producto se precipitó desde la solución como un sólido amorfo parcialmente ceroide después de aproximadamente 8 horas. Tras completar la reacción, lo que se controló por cromatografía en capa fina con CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65:25:4, se retiraron todos los componentes volátiles a gran vacío. Se obtuvieron 491 mg (0,633 mmol) de la ϵ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida en forma de trihidrocloruro.

Ejemplo 16: Síntesis del ácido tri-Boc- γ -carbamidino- α,γ -diaminobutírico [#16]

Se aportaron 1,31 g (6 mmol) de Boc-Dab-OH en 15 ml de acetonitrilo en un matraz con fondo redondo de 100 ml y se le añadieron 12 mmol de diisopropiletilamina (DIPEA) (figura 10). Posteriormente, se le añadió agua gota a gota hasta que se disolvió una parte del Boc-Dab-OH, y posteriormente se le añadieron 1,96 g (5 mmol) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, después de lo cual el acetonitrilo se retiró en un rotavapor. El residuo acuoso se diluyó con 5 ml de agua y se le añadieron 50 ml de diclorometano. Se acidificó la reacción a pH 2 con la adición de HCl a 2 N con agitación y la posterior separación de la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con 50 ml de diclorometano y las fases orgánicas combinadas se lavaron posteriormente con algo del HCl diluido y solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se retiró en un rotavapor. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice 60 con hexano/acetato de etilo 2:1. Se obtuvieron 1,138 g (2,47 mmol), que corresponden a un rendimiento del 50%, de un sólido amorfo e incoloro.

Ejemplo 17: Síntesis del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#6]

Se suspenden 1,225 g (6 mmol) de Boc-Dap-OH en 15 ml de CH₂Cl₂ absoluto en un matraz de Schlenk de 250 ml que comprende un embudo de goteo en una atmósfera de argón y se le añaden 1,72 ml de trimetilamina. Se le añade gota a gota una solución de 1,52 ml (12 mmol) de TMSCl en 30 ml de CH₂Cl₂ absoluto durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Mientras tanto, 941 mg (5,8 mmol) de carbonildiimidazol se disuelven en 8 ml de CH₂Cl₂ absoluto en un matraz de Schlenk de 100 ml en atmósfera de argón. Se le añade gota a gota una solución de 2,66 g (5,6 mmol) de Boc-Arg(Boc)₂-OH en 25 ml de CH₂Cl₂ absoluto durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Ambas soluciones de reacción se agitan a temperatura ambiente durante 4 h. Posteriormente, 832 μ l (6 mmol) de trietilamina se añaden a la primera solución y la segunda solución se añade gota a gota durante 15 a 20 minutos a través del embudo de goteo a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de 15 a 20 minutos, se le añaden 30 ml de agua, se agita vigorosamente durante 45 minutos y la solución se ajusta a pH 2. Se separa la fase orgánica y se extrae la fase acuosa varias veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se secan con una solución saturada de NaCl y sulfato de sodio, y se retira el solvente en un rotavapor. El residuo de tipo cristalino se purifica por cromatografía rápida en gel de sílice con diclorometano como eluyente. Se obtienen 2,74 g (4,15 mmol; 74%) de un sólido amorfo e incoloro [compuesto 17].

Este sólido se hace reaccionar con la oleilpalmitilamina [#2] en condiciones que son esencialmente análogas a la del ejemplo 10, en donde la temperatura se ajusta entre 35 y 40 °C (rendimiento del 72%). El producto final pretendido, el trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida [#6], se obtiene tras retirar por escisión los grupos de protección Boc, tal y como está descrito en el ejemplo 11. El producto obtenido así se puede purificar adicionalmente por cromatografía rápida en gel de sílice RP-18 con MeOH/agua como eluyente.

Ejemplo 18: Fabricación de complejos que consisten en liposomas catiónicos y siRNA (lipoplejos)

Los lipoplejos que consisten en liposomas catiónicos y siRNA se fabricaron con tecnologías estándares conocidas en la técnica, tales como rehidratación de la película lipídica/torta, procedimiento de inyección de etanol, evaporación en fase inversa o procedimiento de diálisis de detergente [compárese *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*; Jean R. Philippot y Francis Schuber; CRC Press, enero de 1995 y *Liposome Technology: Preparation of Liposomes*: 001 Gregory Gregoriadis, CRC Press I Llc., abril de 1984].

Los liposomas así obtenidos, que también se denominan en la presente memoria lipoplejos, en combinación con ácidos nucleicos, tal como siRNA, comprenden como el lípido el trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida y adicionalmente 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina o bien 1,2-dioleil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina, en donde se prefiere la utilización de la 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina. La fracción lipídica de tales liposomas y lipoplejos, respectivamente, fue del 50% en moles de trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida y bien del 50% en moles de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina o del 50% en moles de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

- 5 La combinación de 50% en moles del trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida y de 50% en moles de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina también se denomina atuFect en la presente memoria.

Se ha de saber que, en principio, se puede fabricar cualquier otro lípido y composición lipídica tal y como se describe en la presente memoria con las técnicas mencionadas anteriormente, así como las demás etapas del procesamiento.

- 10 Los liposomas y los lipoplejos, respectivamente, se someten a más etapas de procesamiento de manera que se recortan con respecto al tamaño, capacidad de polidispersión y laminaridad. Estas características se pueden ajustar mediante sonicación, extrusión, tal como a través de membranas porosas, y homogeneización, preferiblemente homogeneización a presión elevada.

- 15 Los liposomas y lipoplejos formados así se caracterizaron por espectroscopia de correlación de fotones con un analizador de partículas submicrométricas N5 de Beckman-Coulter y el resultado de los tamaños de tales liposomas por extrusión o bien por homogeneización a presión elevada se describen en las figuras 12A y 12B, respectivamente.

- 20 A partir de la figura 12A se puede extraer que la distribución de tamaños de los liposomas se puede modificar con diferentes membranas que tienen exclusiones por diferentes tamaños, en el presente caso 1000 nm y 400 nm, respectivamente. En ambos casos, la etapa de extrusión se repitió 21 veces. Sin embargo, se encuentra dentro de la presente invención que la exclusión por tamaño puede ser de aproximadamente 50 a 5000 nm, y que las etapas de extrusión se pueden repetir de 10 a 50 veces.

- 25 Tal y como se puede extraer de la figura 12B, la homogeneización a presión elevada es también un medio idóneo para modificar la distribución de tamaños de los liposomas, en donde tras aplicar tal homogeneización a presión elevada, el tamaño de los liposomas depende del número de ciclos de homogeneización a los que se someten los liposomas. Los márgenes de presión típicos son de 100 a 2.500 bar, en donde en el presente caso la presión aplicada fue de 1500 bar.

Ejemplo 19: Estabilidad en almacenamiento de atuFect

- 30 Si las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan típicamente como composiciones farmacéuticas, es esencial que tales formulaciones farmacéuticas sean estables en las condiciones de almacenamiento. Para estudiar la estabilidad en almacenamiento, se diseñó un siRNA contra el supresor tumoral PTEN que se formuló con atuFect tal y como está descrito en el ejemplo 18.

- 35 Más en concreto, los liposomas se fabricaron con una solución concentrada de lípidos con las concentraciones concentradas finales que se recogen a continuación, mediante rehidratación de la película lipídica en la solución de sacarosa a 300 mM, seguido de la extrusión y la homogeneización a presión elevada, respectivamente. Los liposomas obtenidos así se mezclaron con las moléculas de siRNA descritas a continuación a una proporción molar de 1:1; como alternativa, la capa lipídica se podía rehidratar en presencia de siRNA y los lipoplejos así obtenidos se extruyeron del homogeneizado.

Las moléculas de siRNA fueron las siguientes:

PTENAV10 antisentido: **5' uaaguucuagcuguggg-P 3'**;

PTENBV10 sentido: **5' ccaccagcuagaacuua-P 3'**;

- 40 en donde los nucleótidos en negrita indican que el correspondiente nucleótido está 2'-O-metilado.

Los lipoplejos se incubaron con las células HeLa en presencia del medio que contiene suero durante 48 h a diferentes concentraciones (nM para la molécula de siRNA, que se muestra en la figura 13). La inmunotransferencia con los extractos de las células enteras con los anticuerpos específicos contra p110a (control de carga) y PTEN se realizó tal y como se describe anteriormente (protocolo estándar de inmunotransferencia de tipo Western).

- 45 Sin embargo, los crioprotectores idóneos incluyen, sin limitación, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, rafinosa, galactosa, manitol y PEG. En el presente ejemplo, se utilizó como vehículo una solución de sacarosa a 300 mM para la formulación del atuFect que contiene el siRNA dirigido contra el PTEN. Las concentraciones concentradas finales fueron de 1,445 mg/ml para los lípidos totales y de 15 μM para el PTEN-siRNA. La solución se mantuvo a temperatura ambiente, o bien se conservó a 4 °C durante siete días, o bien se conservó a -80 °C durante siete días.
- 50 Dicha solución se diluyó en medio que contiene suero a la concentración final indicada (20, 10, 5 nM). Se realizaron pruebas con las células HeLa con una densidad de células de 40.000 por pocillo. Los resultados se representan en la figura 13, de la cual se puede deducir que la congelación de los atuFect que contienen siRNA en un crioprotector

y la conservación de los mismos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días es, después de la descongelación, tan eficaz como si se mantiene a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ejemplo 20: Composición lipídica y carga del siRNA

Se prepararon dos tipos diferentes de formulaciones lipídicas. La formulación lipídica 01 consistía en el 50% en moles del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida como lípido catiónico y en el 50% en moles de la 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, mientras que la formulación lipídica 02 consistía en el 50% en moles del trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida como lípido catiónico y en el 50% en moles de la 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina. Cada formulación lipídica contenía un siRNA dirigido contra PTEN (la solución concentrada era de $15\text{ }\mu\text{M}$ de siRNA y de $1,445\text{ mg/ml}$ de lípidos), en donde la molaridad del siRNA se tituló en las células que conducen a una concentración final de $1\text{ }\mu\text{M}$, 500 nM , 100 nM y 50 nM , respectivamente.

Estas formulaciones lipídicas que contienen el RNAi específico de PTEN se administraron a una línea celular de ratón (B16V, ATCC n.º CRL6475) que se hizo crecer en las condiciones estándares de cultivo celular en el medio de Eagle modificado de Dulbecco con 4 mM de L-glutamina ajustada para contener $1,5\text{ g/l}$ de bicarbonato de sodio y $4,5\text{ g/l}$ de glucosa, 90%; suero bovino fetal, al 10%. La densidad celular fue de $40.000\text{ células/6 pocillos}$ y, después de 48 horas, las células se lisaron y sometieron a un análisis por transferencia Western, cuyo resultado está representado en la figura 14. La señal obtenida con un anticuerpo monoclonal específico contra la cinasa PRK2 (Becton Dickinson) se utilizó como control de carga en comparación con la señal de PTEN (anticuerpo monoclonal, Santa Cruze, CA).

De la figura 14 se podría deducir que la formulación lipídica 01, a saber, la que contiene la 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, seguía siendo eficaz si el contenido de siRNA era de 50 nM , mientras que la formulación lipídica 02 que contiene la 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como lípido auxiliar pudo generar un silenciamiento de PTEN solo si el contenido del siRNA era de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ o más, como se detectó mediante un anticuerpo específico contra PTEN (Santa Cruze, CA). La señal de la cinasa PRK2 sin relación con lo anterior se utilizó como control de carga y se detectó mediante un anticuerpo dirigido contra ésta.

Ejemplo 21: Composición lipídica y contenido de PEG

Para analizar el impacto del PEG sobre la eficacia sobre la transfección y la administración de las composiciones lipídicas que comprenden el trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida (lípido catiónico) como componente lipídico y la 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE) y la 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol-2000 (DSPE-PEG200), se generaron las siguientes formulaciones de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria:

Formulaciones C₁-C₅:

	Lípido catiónico [% en moles]	DPhyPE [% en moles]	DSPE-PEG [% en moles]
C ₁	49	50% en moles	1
C ₂	48	50% en moles	2
C ₃	47	50% en moles	3
C ₄	46	50% en moles	4
C ₅	45	50% en moles	5

Formulaciones H₁-H₅:

	Lípido catiónico [% en moles]	DPhyPE [% en moles]	DSPE-PEG [% en moles]
H ₁	50% en moles	49	1
H ₂	50% en moles	48	2
H ₃	50% en moles	47	3
H ₄	50% en moles	46	4
H ₅	50% en moles	45	5

Para cualquiera de las formulaciones arriba mencionadas, la concentración de lípido era de $1,445\text{ mg/ml}$, y la concentración del siRNA era de $15\text{ }\mu\text{M}$ en sacarosa a 300 mM . La dilución de los complejos de reserva concentrados

formados produjo una concentración final del siRNA en el medio de cultivo celular de 20, 10 y 5 nM.

Las moléculas de RNAi contenidas en dichas formulaciones estaban dirigidas contra PTEN y las secuencias son tal y como se describe en el ejemplo 22. Las formulaciones lipídicas se administraron a las células HeLa contenidas en una placa de 6 pocillos, cada uno de los cuales con 40.000 células/pocillo. A las células se les analizó la expresión de PTEN y los resultados se representan en la figura 15 como inmunotransferencias de tipo Western. Se utilizó la expresión de p110a como control de carga y se detectó mediante un anticuerpo monoclonal específico contra p110a. A partir de cualquiera de las inmunotransferencias de tipo Western representadas en la figura 15, se puede deducir que aproximadamente del 1 al 2% en moles del lípido auxiliar que contiene PEG era idóneo para aportar un silenciamiento eficaz de la expresión de PTEN.

Se puede concluir que, preferiblemente, el componente de DPhyPE se ha de remplazar por el lípido auxiliar PEGilado en vez de que el componente lipídico catiónico se remplace por el lípido auxiliar PEGilado. Esto se puede deducir del experimento de más arriba, en donde las formulaciones H parecen ser más potentes que las formulaciones de C. El contenido del lípido auxiliar PEGilado es preferiblemente de aproximadamente el 0,05% al 4,9%, preferiblemente del 1 al 3% y más preferiblemente del 2 al 3%.

15 **Ejemplo 22: Uso *in vivo* de una formulación lipídica que contiene siRNA**

Para comprobar la idoneidad de las formulaciones lipídicas que contienen el siRNA de acuerdo con la presente invención, las formulaciones lipídicas se utilizaron en un modelo de ratón. A diferencia de la mal llamada inyección de presión hidrodinámica que se utiliza con frecuencia para administrar los siRNA al hígado *in vivo*, en donde se inyecta rápidamente en la vena de la cola un volumen que corresponde a aproximadamente el 10% de la masa corporal, que es aproximadamente 2,5 ml de líquido por ratón, los presentes experimentos *in vivo* se llevaron a cabo de tal manera que las formulaciones lipídicas que contienen el siRNA se administraron de forma sistémica a volúmenes pequeños (de 200 a 300 µl) que se inyectaron lentamente, a saber, durante varios segundos, en la vena de la cola de ratones, con lo que se lleva a la práctica un modelo de administración clínicamente relevante. El diseño del experimento se representa en la figura 16.

Los fibroblastos de embrión de rata funcionalmente normales (RAT2; ATCC:CRL-174) se transformaron con Ras oncogénico (Ras^{V12}). Los fibroblastos transformados dependientes de Ras^{V12} se inyectaron posteriormente en los ratones (6 ratones por grupo; Shoe:NMRI-nu/nu macho de ocho semanas de edad, DIMED, Alemania) que desarrollaron un tumor al cabo de diez días. En esta etapa, dichos animales se dejaron sin tratar hasta el día 19 después de la inyección de los fibroblastos transformados o bien se comenzó el tratamiento con diferentes formulaciones el día 11. Como otro control, se inyectaron fibroblastos de embrión de rata funcionalmente normales en los ratones, que no desarrollaron un tumor.

La molécula del siRNA que se denomina en la presente memoria T-Ras consistía en una primera hebra T-Ras 3A que tiene la siguiente secuencia: **aacguguagaaggcauccu-P** en la dirección 5' a 3' y una segunda hebra T-Ras 3B que tiene la siguiente secuencia: **aggauGCCUUCUACACGUU-P** en la dirección 5' a 3'. Obsérvese que los nucleótidos que están impresos en negrita y que están subrayados son nucleótidos 2'-O-metilados. En cualquiera de las hebras, el extremo 3' comienza con un fosfato representado por la P en las secuencias arriba mencionadas.

Como control, se diseñó una molécula de siRNA específica de PTEN con una primera hebra que tiene la secuencia siguiente: 5' **uaaguucuagcuguggg-P** 3' y una segunda secuencia 5' **ccaccacagcuagaacuuu-P** 3', en donde el patrón de modificaciones es el mismo que está explicado con respecto a T-Ras 3A y T-Ras 3B, respectivamente.

Al modelo de ratón se le administraron las formulaciones siguientes:

Panel A de formulaciones:

PBS;

T-Ras 3: 10 mg/kg / atuFect 3,7 mg/kg;

T-Ras 3 desnudo 10 mg/kg; y

45 T-Ras 3 5 mg/kg / atuFect 38,5 mg/kg.

Panel B de formulaciones:

PBS;

atuFect solo 38,5 mg/kg;

PTEN 10 mg/kg / atuFect 38,5 mg/kg; y

T-Ras 3 5 mg/kg / atuFect 38,5 mg/kg.

Panel C de formulaciones:

sacarosa (50 mM);

T-Ras 3 3,75 mg/kg / atuFect-PEG 28,9 mg/kg, administrados i.v.; y

5 T-Ras 3 3,75 mg/kg / atuFect-PEG 28,9 mg/kg, administrados i.p.

atuFect-PEG, tal y como se utiliza en la presente memoria, significa el 50% en moles de trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el 48% en moles de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y el 2% en moles de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol-2000 (DSPE-PEG2000), en sacarosa a 50 mM.

10 La dosificación en los animales fue de 5 mg/kg de siRNA y 38,5 mg/kg de lípidos totales; la concentración de los componentes en la solución de inyección fue de 0,5 mg/ml de siRNA y 3,85 mg/ml de lípidos totales; la proporción molar fue: siRNA: 0,5 mg/ml que corresponde a 0,04 μ mol/ml (la masa molecular de aproximadamente 12.500 Da). El lípido era de 3,85 mg/ml de lípido global, en donde el contenido del lípido catiónico era de 1,97 mg/ml (masa molecular de 843,6 Da) que corresponde a 2,3 μ mol/ml de lípido catiónico. La proporción molar del siRNA por el lípido catiónico fue de 0,0174 a 1.

Los resultados de estos experimentos se representan en la figura 17A (panel A de formulaciones), figura 17B (panel B de formulaciones) y figura 17C (panel C de formulaciones) que muestran el volumen tumoral en función del tiempo, a saber, los días transcurridos tras la exposición de las células.

20 Tal y como se puede deducir de las figuras 17A y 17B, los lipoplejos que consisten en siRNA específico de T-Ras formulados con atuFect muestran la inhibición más fuerte e indica que la acción selectiva es específica. Debe observarse que la molécula de control negativo PTENV10 no muestra una mejoría de la inhibición del crecimiento tumoral cuando se compara con atuFect solo (figura 17B).

25 Tal y como se puede deducir de la figura 17C, también atuFect-PEG es muy eficaz y permite que tanto la administración i.p como la i.v. den lugar a eficacias similares. Con respecto a esto, cabe destacar que es obvio que los complejos PEGilados son funcionalmente activos y se debe suponer que, debido a la PEGilación, tales composiciones lipídicas son menos tóxicas que las composiciones lipídicas parecidas que carecen del lípido (auxiliar) PEGilado.

Ejemplo 23: Material y métodos para los ejemplos 24 a 27

Preparación de los siRNA-lipoplejos

30 Se prepararon liposomas catiónicos que comprenden el lípido catiónico trihidrocloruro de β -L-arginil-2,3-L-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el fosfolípido neutro 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) y sal de sodio del lípido PEGilado *N*-(carbonilmetoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania) a una proporción molar de 50/49/1 mediante rehidratación de la película lipídica en 300 mM de solución estéril de sacarosa libre de ARNasa para dar una concentración lipídica total de 4,34 mg/ml. Posteriormente, la dispersión multilaminar se procesó adicionalmente mediante homogeneización a presión elevada (22 ciclos a 750 bar y 5 ciclos a 1000 bar) con un dispositivo EmulsiFlex C3 (Avestin, Inc. Ottawa, Canadá). La dispersión liposómica obtenida se mezcló con un volumen igual de una solución de siRNA a 0,5625 mg/ml en 300 mM de sacarosa, lo que da lugar a que el cálculo de la proporción de carga de los fosfatos del esqueleto del ácido nucleico por los átomos de nitrógeno del lípido catiónico sea de aproximadamente 1 a 4. El tamaño de la dispersión de lipoplejos fue de aproximadamente 120 nm según se determinó mediante dispersión óptica cuasi elástica (analizador de tamaño de partículas submicrométricas N5, Beckman Coulter, Inc., Miami, FL). Para los experimentos *in vitro*, esta dispersión se diluyó además a una concentración de 5 a 20 nM de siRNA en el medio de cultivo celular que contiene suero al 10%.

Experimentos con animales

45 Durante este estudio se utilizaron ratones macho desnudos y atímicos (Hsd:NMRI-nu/nu, 8 semanas de edad). Para los experimentos de tratamiento del tumor con xenoinjertos tumorales consolidados, se implantaron subcutáneamente (s.c.) un total de $5,0 \times 10^6$ células/100 μ l (en presencia del 50% de matrigel para 3Y1-Ras^{V12}). Para los experimentos de tratamiento del tumor, se administró por vía i.v. la solución del complejo de siRNA liposómico mediante una inyección de pequeño volumen en la vena de la cola a poca presión. Se consiguió una dosificación diferente mediante diferentes pautas de inyección (diarias frente a dos veces al día) utilizando, para un ratón de 30 g, un volumen de inyección de 200 μ l de una solución concentrada que contenía el siRNA a 0,28 mg/ml y el lípido a 2,17 mg/ml (equivalente a una dosis de siRNA de 1,88 mg/kg y de lípido de 14,5 mg/kg). El volumen del tumor se determinó con un calibrador y se calculó de acuerdo con la fórmula $volumen = (longitud \times anchura^2)/2$. Todos los experimentos con animales de este estudio se realizaron de acuerdo con los protocolos autorizados y en

cumplimiento de las directrices de *Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin*, Alemania (N.º G0264/99).

Análisis estadístico

5 Los datos se expresan como medias \pm E.E.M. La significación estadística de las diferencias se determinó con la prueba de la *U* de Mann-Whitney. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Experimento de la captación de siRNA-Cy3 en el cultivo celular y en los ratones

10 Para los estudios en cultivo celular sobre la captación de moléculas de siRNA-Cy3 sin formular, se incubaron las células HeLa con cantidades definidas de la solución de siRNA durante una noche en el medio sin suero. La captación por las células de siRNA-Cy3 lipoplejado se llevó a cabo mediante la transfección durante una noche, tal y como está mencionado más adelante. Las células tratadas se enjuagaron con PBS enfriado en hielo y se fijaron en la solución de formaldehído al 4%/PBS durante 15 minutos antes de la microscopia. Para marcar los endosomas y lisosomas tardíos, las células se incubaron con el tinte fluorescente LysoTracker (Molecular Probes) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se examinaron mediante microscopia confocal después de la fijación. El experimento de administración *in vivo* que utiliza el siRNA-Cy3 marcado con fluorescencia se llevó a cabo mediante la administración intravenosa del siRNA formulado y el desnudo. Los ratones se trataron con una sola inyección i.v. de 200 μ l a una dosis final del siRNA-Cy3 de 1,88 mg/kg y del lípido de 14,5 mg/kg. Los ratones se sacrificaron en los puntos de tiempo definidos y se examinó la captación de fluorescencia mediante microscopia en cortes de tejido tanto fijados en formol, como incluidos en parafina, como en congelados y montados en OCT.

Transfección *in vitro*

20 Las líneas celulares de humanos CEVUH, HeLa y PC-3, así como las líneas celulares murinas EOMA y NIH3T3 se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. La línea celular HuH-7 de hepatoma de humano estaba disponible en el MDC, Berlín. Las células 3Y1 de rata que expresan el Ras^{V12} oncogénico se generaron mediante la transducción de Ras^{V12} inducible, tal y como está descrito³⁸.

25 Las líneas celulares se transfectaron con siRNA con los liposomas catiónicos descritos más arriba. En pocas palabras, aproximadamente 12 horas después de la inoculación de las células, se añadieron a las células diferentes cantidades de la solución siRNA-lipoplejo diluida en el medio que contiene suero para conseguir concentraciones del siRNA para la transfección en un margen de 1 a 50 nM. Después de la transfección (48 h), las células se lisaron y sometieron a inmunotransferencia, tal y como está descrito²⁰. Los siguientes anticuerpos se utilizaron para la inmunotransferencia: anti-PTEN de conejo (Ab-2, Neomarkers), monoclonal contra p110 α /p85³⁹, anti-PKN3³⁸ de conejo, anti-CD31 de cabra (Santa Cruz Biotechnology), anti-CD34 de conejo (Santa Cruz Biotechnology), anti-Akt fosforilada de conejo (S473) (Cell Signaling Technology).

Ensayo de BrdU *in vivo*

35 Para medir la proliferación celular *in vivo*, los ratones se trataron con BrdU (Sigma, 250 mg/kg) por inyección intraperitoneal y se sacrificaron dos horas después. Los cortes de tejido del hígado o del tejido tumoral incluidos en parafina y fijados con formol se sometieron a tinción con BrdU de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit de detección *in situ* de BrdU, Pharmingen).

Determinación de la densidad de los microvasos (DMV)

40 El número de microvasos se determinó contando los vasos positivos para CD31/CD34 en 3 a 8 áreas seleccionadas al azar de cortes tumorales únicos²⁴. El número de los vasos como unidades vasculares se evaluó independientemente de la forma, puntos de ramificación y tamaño de la luz (se denomina «número de vasos»). Además, se valoró la densidad vascular mediante la determinación de la longitud total de las estructuras de los vasos positivos para CD31/CD34 (denominado «suma de la longitud de los vasos») con el programa informático Axiovision 3.0 (Zeiss). El recuento se realizó mediante el barrido de cortes del tumor a 200 \times aumentos con un microscopio óptico Axioplan de Zeiss.

Análisis histológico y microscopia

50 Después de sacrificar los ratones, los tejidos se fijaron rápidamente en formol tamponado al 4,5% durante 16 horas y luego se procesaron para la inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m y se colocaron en portaobjetos de cristal. Los cortes de tejido se tiñeron con anti-CD31/PECAM-1 policlonal de cabra (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) (como alternativa para los criocortes, CD31 de rata, 1:100, Pharmingen) y anti-CD34 monoclonal de rata (Cedarlane) para visualizar células endoteliales en los cortes en parafina. La inmunohistoquímica y la contratinción con hematoxilina y eosina (H+E) en los cortes de tejido en parafina se realizaron de acuerdo con los protocolos estándares. Para los estudios de captación *in vivo* de los siRNA marcados con fluorescencia, los cortes en parafina se examinaron directamente por epifluorescencia con un microscopio Axioplan de Zeiss. Se grabaron las

5 imágenes y se procesaron con el programa informático de toma de imágenes LSM5 de Zeiss. El análisis en profundidad de la captación del siRNA al microscopio se realizó con un microscopio confocal LSM510 Meta de Zeiss. Para esto, los cortes se desparafinaron con xileno, se rehidrataron mediante lavados con etanol con la pureza necesaria, se contratiñeron con el tinte verde Sytox (Molecular Probes 100 nM; 10 min), se enjuagaron y, finalmente, se montaron en FluorSave (Calbiochem) para la microscopia. La tinción con inmunofluorescencia de las células NIH3T3 se realizó tal y como está descrito⁴⁰, utilizando los anticuerpos siguientes: anti-Akt fosforilada de conejo específico para la inmunohistoquímica (S473) (Cell Signaling Technology) y anti- α -tubulina de ratón (DM1A, Calbiochem).

Tabla 1: Secuencias de los siRNA que se utilizaron a lo largo de los ejemplos 24 a 27

Nombre del siRNA	Secuencia de 5' a 3'
PKN3 s	<u>gagagccug<u>uacugc</u>gaga</u>
PKN3 as	<u>ucucgcag<u>uacaggcu</u>cuc</u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as	<u>uaag<u>uucuagcug</u>ggugg</u>
PTEN s (control)	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as (control)	<u>uaag<u>uucuagcug</u>ggugg</u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuaga<u>acuua</u></u>
PTEN as-Cy3	<u>uaag<u>uucuagcug</u>ggugg-Cy3</u>
CD31-1 s	<u>cca<u>acuac</u>cca<u>uccaga</u>a</u>
CD31-1 as	<u>uuc<u>uggau</u>gguga<u>aguugg</u></u>
CD31-2 s	<u>ggugauagcc<u>ccgguggau</u></u>
CD31-2 as	<u>a<u>uccacc</u>gggcu<u>aucacc</u></u>
CD31-6 s	<u>cca<u>cuucu</u>ga<u>acucca</u>ca</u>
CD31-6 as	<u>u<u>guugg</u>ag<u>uucaga</u>agugg</u>
CD31-8 s	<u>cagau<u>acucu</u>aga<u>acggaa</u></u>
CD31-8 as	<u>u<u>uccgu</u>cuag<u>aguau</u>cug</u>

10 Los nucleótidos con modificaciones por 2'-O-metilación están subrayados.

Ejemplo 24: Administración de siRNA desnudos y formulados *in vitro* e *in vivo*

15 En este estudio, se emplearon siRNA bicatenarios de 19 unidades que carecen de protuberancias en 3', que ya se han estabilizado químicamente mediante la alternancia de modificaciones del azúcar por 2'-O-metilación en ambas hebras¹⁶, mediante lo cual, los nucleótidos sin modificar están enfrentados a los modificados de la hebra opuesta. Las moléculas de siRNA que realmente se utilizaron se describen en el ejemplo 23.

20 En una primera etapa, analizamos si estas moléculas intervienen en la interferencia por ARN en el cultivo celular en ausencia de vehículos de administración. El análisis de inmunotransferencia demostró que no se producía ningún silenciamiento génico cuando el siRNA desnudo se aplicaba incluso a concentraciones micromolares en comparación con las concentraciones nanomolares utilizadas para los siRNA-lipoplejos. Los resultados se muestran

en la figura 18a.

Tal y como se puede deducir de la figura 18a con más detalle, había una inhibición dependiente de la concentración de la expresión de la proteína PKN3 con los siRNA lipoplejados, pero no con los siRNA desnudos, en las células HeLa, tal y como se valora por inmunotransferencia. El PTEN sirvió como control de carga.

5 También se analizaron los siRNA convencionales sin modificar (de 21 unidades, con protuberancias en 3' de 2 nucleótidos)⁶ y varias moléculas conjugadas que incluyen siRNA unidos a péptido o conjugados al colesterol, pero no se detectó ninguna reducción específica y selectiva de la expresión de la proteína endógena en ausencia de vehículos de administración (no se muestran los datos).

10 Para analizar si la falta del silenciamiento génico era el resultado de una captación celular ineficaz debido a los efectos de repulsión entre los siRNA aniónicos y la membrana celular cargada negativamente, empleamos los siRNA marcados con fluorescencia (Cy3) en 3' para estudiar su captación mediante microscopia confocal. Nosotros, además de otros, hemos demostrado anteriormente que la marcación con fluorescencia en el extremo 3' de la molécula antisentido no empeora la actividad de silenciamiento del ARN cuando se transfecta con vehículos de administración^{16,17}. Sorprendentemente, observamos una captación significativa de los siRNA marcados con fluorescencia en ausencia de reactivos de transfección cuando se aplicaban concentraciones elevadas de las moléculas de siRNA-Cy3. Sin embargo, la mayor parte de la marcación de fluorescencia se veía que acababa en las vesículas endosómicas/lisosómicas tardías, tal y como se demostró mediante la colocalización con el marcador LysoTracker, lo que sugiere que los siRNA sin formular permanecen atrapados en la vía endosómica. En cambio, los siRNA transfectados como complejos liposómicos se disociaron de estas vesículas y se liberaron al citoplasma. Estos resultados indican que la formulación liposómica de los siRNA proporciona al menos dos efectos beneficiosos para la administración funcional de los siRNA: una mejoría de la captación celular y, muy importante, el escape de la vía endocitósica/endosómica del citoplasma¹⁸, en donde tiene lugar la degradación del ARNm mediada por RNAi.

Los detalles de la figura 18b son los que vienen a continuación.

25 En la figura 18b se muestra la distribución intracelular de los siRNA desnudos y formulados. Los siRNAs-Cy3 marcados con fluorescencia se analizaron mediante microscopia confocal de las células HeLa en los paneles de la izquierda y del centro. Los paneles de la derecha muestran fotos de la superposición de la distribución subcelular después de la contratinción con LysoTracker (verde; flechas, localización de siRNA-Cy3 con respecto al compartimento endosómico/lisosómico). Fila superior, siRNA-Cy3 desnudo; fila inferior, siRNA-Cy3 lipoplejado.

30 Para analizar si la formulación liposómica cambia las propiedades farmacológicas de los siRNA *in vivo*, se inyectó (poco volumen y poca presión) una dosis única de moléculas de siRNA-Cy3 (siRNA a 1,88 mg/kg) en la vena de la cola de los ratones. El análisis al microscopio de varios órganos, entre ellos páncreas, pulmón, riñón y próstata, mostró un incremento significativo de la fluorescencia específica de Cy3 con los siRNA formulados (no se muestran los datos). La cantidad más elevada de fluorescencia se detectó en el hígado de los ratones tratados con siRNA formulados en liposomas en todos los puntos de tiempo analizados (1 h, 4 h, 24 h después de la inyección, figura 18c). Este resultado indica una mejor biodistribución de las moléculas de siRNA formuladas en los lipoplejos cuando se compara con la administración de los siRNA desnudos.

35 No obstante, la mejoría de la biodistribución en los órganos enteros no indica necesariamente una captación de estas moléculas específica de tipo celular o intracelular, lo que es un requisito previo para la funcionalidad de los siRNA administrados. Un análisis más detallado por microscopia confocal de la captación en el hígado de los siRNA-Cy3 formulados reveló que, a nivel celular, la tinción con fluorescencia estaba predominantemente presente en los revestimientos de los vasos sanguíneos y las sinusoides (figura 18c, panel inferior). Una inspección más detallada de los vasos del hígado reveló que la capa endotelial está claramente marcada por los siRNA-Cy3 fluorescentes a diferencia del control con PBS (figura 18d, fila superior). En el interior de la célula endotelial, el siRNA-Cy3 está exclusivamente presente en el citoplasma (figura 18d, paneles inferiores). Se observó el mismo patrón de tinción en los criocortes del hígado sin fijar, lo que descarta cualquier artefacto por la fijación en formol (no se muestran los datos). Para comprobar si el siRNA lipoplejado que está marcado con fluorescencia también actúa selectivamente sobre la vasculatura tumoral, los ratones que llevan diferentes tumores experimentales se trataron con inyecciones i.v. únicas de los lipoplejos siRNA-Cy3. En los tres xenoinjertos de tumor experimentales (dos subcutáneos, s.c. y uno intrahepático, i.hep.), detectamos señales significativas de la fluorescencia en la vasculatura tumoral (figura 18e, flecha). La captación del siRNA-Cy3 por la capa endotelial de la vasculatura del tumor se confirmó mediante la contratinción con el anticuerpo anti-CD34, un marcador de las células endoteliales (figura 18e, paneles inferiores). Además, la captación del lipoplejo-siRNA por el endotelio se confirmó con lípidos marcados con fluorescencia (no se muestran los datos). En conjunto, estos datos demuestran que las formulaciones de los siRNA basadas en lípidos catiónicos mejoran la cinética y las propiedades de distribución de los siRNA y permiten una captación predominante de los siRNA hacia el interior de las células endoteliales.

El diseño experimental para los resultados mostrados en la figura 18c fue el que se describe a continuación. El siRNA-Cy3 desnudo o lipoplejado se administró mediante una sola inyección i.v. y los cortes de tejido hepático de los puntos en el tiempo indicados se analizaron por microscopia de epifluorescencia (paneles superiores). Los

paneles inferiores son imágenes de cerca de microscopia confocal de los cortes del hígado que muestran la distribución de siRNA-Cy3 sin formular (imagen de la izquierda) en comparación con el lipoplejo (imagen de la derecha, siRNA-Cy3 en rojo; núcleos en verde mediante contratinción con verde de Sytox). Las imágenes se guardaron con los mismos ajustes. Compárese la intensidad de la tinción de los vasos del hígado (flecha) y de las sinusoides (flecha doble).

Los detalles de la figura 18d son los que se describen a continuación. El revestimiento endotelial de un vaso del hígado está decorado con siRNA-Cy3 fluorescente (panel de la derecha), a diferencia del corte de control tratado con PBS (panel de la izquierda). La microscopia confocal reveló la administración citoplasmática del siRNA-Cy3 formulado (rojo, combinado) en las células endoteliales del hígado (glóbulos rojos, flecha doble). No hay ninguna fluorescencia detectable en el núcleo (verde, flechas).

El diseño experimental para los resultados mostrados en la figura 18e fue el que se describe a continuación. Sobre las células endoteliales de diferentes tumores se actuó selectivamente con los siRNA formulados en liposomas tal y como está indicado con las flechas (siRNA-Cy3 en rojo; núcleos en verde). En la fila superior se muestran imágenes de fluorescencia de cortes del tumor PC-3 hecho crecer subcutáneamente (panel de la izquierda) y del tumor de fibroblastos de rata 3Y1 transformado con Ras^{V12} (panel central) o del tumor HuH-7 hecho crecer intrahepáticamente (panel de la derecha). En la fila inferior se muestra la detección del siRNA-Cy3 administrado en liposomas al interior de las células endoteliales del tumor HuH-7. Las células endoteliales tumorales se muestran mediante tinción de H+E (panel de la izquierda) con sus característicos citoplasma delgado y núcleo prominente (flecha). En los cortes consecutivos se muestra la correspondiente fluorescencia del siRNA-Cy3 (rojo, panel central) y de la inmunotinción con anti-CD34 de las células endoteliales (panel de la derecha), respectivamente.

Ejemplo 25: Administración funcional de siRNA específicos de PTEN al interior de células endoteliales en el hígado y en el tumor

Para demostrar la capacidad que tienen los siRNA-lipoplejos para silenciar la expresión del gen endógeno en las células endoteliales *in vivo*, seleccionamos como diana el supresor tumoral PTEN, un antagonista de la fosfoinosítido 3-cinasa (PI 3-cinasa). Pretendíamos seguir el silenciamiento funcional del gen de PTEN en un sistema de lectura positivo mediante la medición del incremento de la síntesis de ADN por la incorporación de BrdU en el núcleo de las células endoteliales. Se sabe que la pérdida de expresión de PTEN activa de manera constante la señalización de la PI 3-cinasa, que se puede medir mediante un incremento de la fosforilación de la cinasa Akt vía abajo¹⁹ (figura 19a). La activación constante de la PI 3-cinasa también está acompañada por un incremento de la tasa de la síntesis de ADN²⁰.

Primero, la actividad de iRNA de un siRNA^{PTEN} seleccionado (compárese con el ejemplo 23), que actúa selectivamente sobre el ARNm de PTEN de humano y de ratón, se verificó *in vitro* mediante la transfección mediada por lípido (figura 19a). La misma secuencia del siRNA que lleva la modificación de 2'-O-metilo en cada nucleótido se utilizó como control negativo (siRNA^{control}), ya que este patrón de modificación uniforme destruye completamente la actividad de iRNA¹⁶. Se observó un silenciamiento de la proteína PTEN y un incremento de la fosforilación de Akt por inmunotransferencia. Los estudios de inmunofluorescencia confirmaron el incremento de la fosforilación de la Akt en presencia de la molécula de siRNA^{PTEN} activa (figura 19a). Esto demuestra la capacidad que tiene la molécula de siRNA^{PTEN} para activar la señalización de la PI 3-cinasa en el cultivo celular.

Para comprobar el silenciamiento del gen de PTEN, se trataron ratones *in vivo* (4 por grupo) con PBS, o bien siRNA^{PTEN} desnudo, o bien siRNA^{PTEN}-lipoplejo, o bien vehículo lipídico, durante tres días consecutivos mediante una inyección en la vena de la cola a poca presión (véanse los Métodos). El día cuatro del tratamiento, se inyectó BrdU a los ratones, y dos horas después se sacrificaron los ratones y se midió la incorporación de BrdU mediante tinción inmunohistológica de los cortes del hígado en función de los núcleos positivos para BrdU. El tamaño pequeño de las células endoteliales y las dificultades a la hora de detectar una señal fiable con la Akt fosforilada y los anticuerpos específicos contra PTEN no permitieron detectar *in situ* el silenciamiento de la proteína. Sin embargo, de manera coherente con la administración específica de célula observada para el siRNA marcado con fluorescencia en las células endoteliales, se observó un incremento significativo en los núcleos positivos para BrdU en el endotelio del hígado sólo con el siRNA^{PTEN} liposómico (figura 19b). Un experimento similar con ratones que llevan tumores reveló un incremento significativo también en el número de núcleos positivos para BrdU en el endotelio tumoral después del tratamiento con el PTEN-siRNA activo formulado en liposomas (figura 19c). La molécula de control siRNA^{control} completamente metilada e inactiva no hizo incrementar la incorporación de BrdU con respecto al grupo de control con PBS. A partir de estos datos, concluimos que los siRNA específicos de PTEN estabilizados que se han formulado con lípidos catiónicos son funcionales *in vivo* a la hora de inducir el silenciamiento génico en las células endoteliales después de la administración sistémica.

Los detalles de la figura 19a son los que vienen a continuación. La transfección *in vitro* de un siRNA específico de PTEN estabilizado (10 nM) redujo la cantidad de la proteína PTEN e incrementó la fosforilación de la cinasa Akt vía abajo (P*-Akt), según se reveló por inmunotransferencia (panel superior derecho; subunidades de la PI 3-cinasa p110 α , p85, control de carga sin alterar). El siRNA^{control} representa una molécula de siRNA^{PTEN} inactiva por estar totalmente metilada; ut son las células sin tratar. También se visualizó el incremento de la Akt fosforilada mediante

tinción de inmunofluorescencia en las células NIH3T3 transfectadas con siRNA^{PTEN} (Akt fosforilada en rojo; anti- α -tubulina como marcador de la forma de la célula, en verde).

5 En la figura 19b se representan imágenes representativas (paneles superiores) y la correspondiente cuantificación (diagrama inferior) que demuestran las diferencias significativas en el número de núcleos endoteliales positivos para BrdU (flechas) en muestras de hígado de los animales tratados con PBS, siRNA^{PTEN} desnudo, siRNA^{PTEN} lipoplejado y liposomas catiónicos, respectivamente (se muestran dos imágenes para cada tratamiento). Significación estadística: siRNA^{PTEN} desnudo frente a siRNA^{PTEN}-lipoplejo, * P = 0,0286; liposomas frente a siRNA^{PTEN}-lipoplejo, * P = 0,0286.

10 Los detalles de la figura 19c son los que vienen a continuación: La especificidad de la secuencia del siRNA^{PTEN} lipoplejado sobre la síntesis de ADN se confirmó con un ensayo de BrdU para la vasculatura tumoral. El incremento de los núcleos positivos para BrdU (flecha) se detectó en los vasos sanguíneos tumorales (V) de los animales tratados con siRNA^{PTEN}-lipoplejo y no con el siRNA^{control}-lipoplejo; Tu: tejido tumoral. La cuantificación de los núcleos positivos para BrdU en las células endoteliales aumentó significativamente: siRNA^{control}-lipoplejo frente a siRNA^{PTEN}-lipoplejo, * P = 0,032.

15 **Ejemplo 26: Silenciamiento génico *in vivo* de CD31**

Para demostrar más directamente el silenciamiento génico *in vivo* mediado por siRNA, nos centramos en la acción selectiva sobre un gen expresado de manera específica en las células endoteliales. Elegimos la molécula 1 de adhesión de las plaquetas y de las células endoteliales (PECAM-1), también conocida como CD31, como diana idónea, ya que su expresión se limita a las células del sistema vascular, principalmente a las células endoteliales así como a las plaquetas, monocitos, neutrófilos y determinados linfocitos T²¹⁻²³.

20 El cribado de las moléculas del siRNA con modificaciones por 2'-O-metilación (compárese con el ejemplo 23) en las líneas de células endoteliales procedentes de humano y de ratón (CEVUH, EOMA) condujo a la identificación de varias moléculas potentes de CD31-siRNA específicas de humano y de ratón (figura 20a). La molécula de siRNA más potente, siRNA^{CD31-8}, se formuló en liposomas tal y como está descrito en el ejemplo 23 y se administró sistémicamente en los ratones que llevan el tumor durante dos o durante siete días consecutivos. Los ratones de control se trataron con solución isotónica de sacarosa o con siRNA^{PTEN} lipoplejado para analizar la especificidad. Después del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se analizó el silenciamiento génico en diferentes tejidos por RT-PCR en tiempo real (TaqMan) e inmunotransferencia.

30 En las muestras de tejido de tumor, de hígado y de pulmón se observó una reducción de la cantidad de ARNm de CD31 en los ratones tratados con el siRNA^{CD31-8}-lipoplejo, pero no así en el tejido del bazo. La reducción observada de la cantidad de ARNm de CD31 apunta a un modo de acción de iRNA basado en la escisión de los ARNm (figura 20b). Además, se detectó una reducción significativa de la cantidad de proteína CD31 en los lisados del tumor y del hígado de los ratones tratados con el siRNA^{CD31-8}-lipoplejo durante dos días consecutivos, a diferencia de la falta de cambio en la cantidad de proteína observada en los ratones de control (figura 20c, panel izquierdo).

35 Para analizar la especificidad y que la carga sea la misma, se analizó en paralelo en estos lisados la cantidad de la proteína CD34, otra proteína marcadora de las células endoteliales, así como PTEN. También se examinaron los extractos de células enteras del bazo y del pulmón, pero no se detectó la expresión de la proteína CD31 de manera fiable mediante análisis de inmunotransferencia en estos órganos (no se muestran los datos). Se confirmó el silenciamiento de la proteína CD31 en un experimento independiente con ratones que no llevan el tumor mediante siete inyecciones i.v. diarias (figura 20c, panel derecho).

40 Además, la reducción en la expresión de CD31 también se reveló *in situ*, mediante la medición de las diferencias en la densidad de los microvasos (DMV) para los marcadores endoteliales CD31 y CD34 en un modelo de ratón con tumor xenoinjertado. La medición de la DMV es un marcador indicativo de la angiogénesis tumoral y se analizó mediante tinción inmunohistoquímica los vasos sanguíneos con anticuerpos específicos contra CD31 o contra CD34²⁴⁻²⁶. Los siRNA específicos de CD31 y PTEN formulados se administraron por inyección en la vena de la cola con un volumen normal (200 μ l) y presión normal a los dos días en los ratones que llevan el tumor (el tamaño del tumor es de 800 mm³). El día tres, se sacrificaron los ratones y se comparó la DMV en cortes consecutivos después de la inmunotinción con los anticuerpos contra CD31 y CD34, respectivamente.

50 Los ratones tratados con el siRNA^{CD31-8} lipoplejado mostraban una disminución estadísticamente significativa de la cantidad total de vasos positivos para CD31, según se midió mediante el número total de vasos, así como la longitud del vaso (figura 20d). La tinción con los anticuerpos específicos contra CD34 no reveló ningún cambio de la DMV, lo que indica de nuevo que el silenciamiento fue específico de CD31. Ambos grupos de control, siRNA^{PTEN} y tratados con sacarosa isotónica, no mostraban diferencias en la valoración de la DMV mediante tinción con CD31 o bien con CD34. Este resultado junto con los datos moleculares sobre el ARNm y el silenciamiento de la proteína indica que la reducción de la expresión de CD31 fue específica, sin una disminución en las células endoteliales positivas para CD34 en respuesta a la administración sistémica del siRNA^{CD31-8} lipoplejado. Concluimos que el silenciamiento *in vivo* del gen de CD31 (PECAM-1) en la vasculatura de los tumores y del hígado se puede conseguir con la administración de los siRNA formulados con lípidos catiónicos.

Los detalles de la figura 20a son los que vienen a continuación. En la figura 20a se muestra la identificación de los siRNA estabilizados potentes para el silenciamiento eficaz de CD31. Las CEVUH y células EOMA murinas se transfectaron con cuatro siRNA diferentes que actúan selectivamente sobre CD31 específicos de ratón y de humano (CD31-1, 2, 6, 8) y un PTEN-siRNA de control. El silenciamiento específico de la proteína se valoró por inmunotransferencia con anti-CD31 y anti-PTEN, con lo que se demostró que la eficacia más elevada la tenía la molécula del siRNA^{CD31-8}.

Los detalles de la figura 20b son los que vienen a continuación. Los ratones tratados durante dos días consecutivos mediante una inyección i.v. del siRNA^{CD31-8} lipoplejado mostraban una reducción de la cantidad de ARNm de CD31 en determinados tejidos, según se reveló por RT-PCR cuantitativa con TaqMan. La cantidad relativa del ARNm de CD31 se normalizó por la cantidad de ARNm de PTEN.

Los detalles de la figura 20c son los que vienen a continuación. El silenciamiento de la proteína CD31 en los ratones tratados sistémicamente con siRNA^{CD31-8}-lipoplejos se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia con extractos de hígado y de tumor con el uso del anticuerpo anti-CD31 y del anti-PTEN, así como anti-CD34 (otra proteína marcadora del endotelio) para mostrar que la carga de proteína era igual. Los ratones se trataron por inyección i.v. durante dos (panel izquierdo: hígado y tumor) o siete días consecutivos (panel derecho: hígado). Se observó el silenciamiento de la proteína CD31 en los animales tratados con siRNA^{CD31-8}-lipoplejo en el hígado y en el tumor (véase el animal 2, panel izquierdo), pero no en los ratones tratados con la solución de sacarosa isotónica o los ratones tratados con siRNA^{PTEN}-lipoplejo (véanse los animales 1, 3). Con una pauta de tratamiento de siete días, se observó el silenciamiento considerable de CD31 en los animales 5 y 6, a diferencia de los animales de control 4, 7 y 8 (panel derecho). La funcionalidad del siRNA^{CD31-8}-lipoplejo utilizado para el estudio *in vivo* se verificó en paralelo en las CEVUH (siRNA a 10 nM).

Los detalles de la figura 20d son los que vienen a continuación. El silenciamiento *in vivo* de la proteína CD31 se valoró directamente mediante inmunotinción de cortes de tumores en parafina de los correspondientes ratones tratados con sacarosa isotónica, siRNA^{CD31-8}-lipoplejo y siRNA^{PTEN}-lipoplejo. Se tiñeron cortes consecutivos con los anticuerpos anti-CD31 y anti-CD34, respectivamente, para visualizar la vasculatura tumoral. Se encontró una reducción de la intensidad de la tinción para CD31, pero no para CD34, en el corte de tumor procedente de los ratones tratados con el siRNA^{CD31-8}-lipoplejo. La cuantificación de la DMV (determinada según el número de vasos, diagrama superior y la longitud total de los vasos, diagrama inferior) de los vasos positivos para CD31 muestra una reducción de la DMV en las muestras de los ratones tratados con siRNA^{CD31-8}-lipoplejo. Esta diferencia no se observó cuando se midió la DMV en los vasos positivos para CD34.

Con respecto a las moléculas del siRNA anti-CD31 descritas en la presente memoria, ha de observarse que la descripción de la presente solicitud está relacionada con cualquier molécula de siRNA anti-CD31 y más preferiblemente cualquier molécula de siRNA anti-CD31 que muestra el patrón de modificación que se muestra y se describe en la presente memoria, tal y como se describe con respecto a la molécula del siRNA anti-CD31-8.

Ejemplo 27: Eficacia del siRNA^{CD31}-lipoplejo administrado sistémicamente a los modelos de tumor

En este ejemplo se aborda la cuestión de si los siRNA formulados contra CD31/PECAM-1 muestran algún potencial terapéutico sobre el crecimiento del tumor.

La CD31 se ha propuesto que participa en diversos mecanismos celulares para la formación y el funcionamiento de vasos o plaquetas^{23,27,28}, pero su posible contribución a la neovascularización durante el desarrollo del tumor no se ha tratado hasta ahora. Las moléculas de siRNA elegidas para la estrategia terapéutica comprendían el siRNA^{CD31-8} específico y el siRNA^{PTEN} como molécula de control. Los siRNA^{CD31-8} y siRNA^{PTEN}-lipoplejos para los estudios de la eficacia *in vivo* se analizaron en un experimento de transfección dependiente de la dosis en las CEVUH antes del experimento *in vivo*. En la figura 21a se muestran las inmunotransferencias representativas que demuestran la funcionalidad y potencia de estos siRNA-lipoplejos.

Se consiguió el silenciamiento de la proteína CD31 con el siRNA^{CD31-8} en el margen subnanomolar con estas formulaciones. La especificidad del silenciamiento génico mediado por el siRNA^{CD31-8} se demostró mediante la detección específica de PTEN, Akt fosforilada y CD34. A diferencia de las transfecciones con siRNA^{PTEN}, el estado de fosforilación de la Akt no estaba afectado en las CEVUH por la reducción de CD31. La cantidad de proteína CD34 no cambió con ambos lipoplejos cuando se comparó con los controles sin tratar. El posible efecto terapéutico del CD31-siRNA-lipoplejo administrado sistémicamente se investigó en los ratones que llevaban dos tipos diferentes de xenoinjertos tumorales subcutáneos.

Primero establecimos una pauta que permitió la repetición del tratamiento sistémico con diferentes dosis diarias de lipoplejo. Se consiguieron diferentes dosis totales mediante la administración de inyecciones en la vena de la cola, cada día o dos veces al día, de 200 µl de la solución de lipoplejo (dosis única de 1,88 (mg/kg)/d de siRNA; 14,5 (mg/kg)/d de lípido). No observamos efectos tóxicos graves sobre el estado de salud del animal según se valoró mediante la vigilancia de los cambios de masa corporal como marcador global de la salud general (figura 21b).

Posteriormente, analizamos las dos pautas de dosificación que representan tratamientos i.v. cada día o bien dos veces al día en un estudio de la eficacia del siRNA^{CD31-8}-lipoplejo sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Ambas pautas de tratamiento dieron lugar a un claro efecto inhibidor del siRNA^{CD31-8} lipoplejado sobre el crecimiento del tumor de un xenoinjerto s.c. consolidado de 3Y1-Ras^{V12} de crecimiento rápido (figura 21c). En especial, para este xenoinjerto tumoral concreto, la pauta de dos veces al día mejoró el efecto inhibidor sobre el desarrollo tumoral. Esta inhibición fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el siRNA^{PTEN}-lipoplejo, así como con los grupos de control tratados con sacarosa (figura 21c).

En otro experimento, el tratamiento sistémico con siRNA^{CD31-8} formulado en liposomas sobre un xenoinjerto tumoral subcutáneo de PC-3 que crece más lentamente causó de igual forma un retraso significativo del crecimiento tumoral a diferencia del siRNA^{PTEN} de control (figura 21d). En conjunto, los experimentos con el xenoinjerto *in vivo* demuestran claramente que el desarrollo de las células tumorales en ratones atímicos se puede suprimir mediante la administración sistémica de los CD31-siRNA formulados en liposomas. Estos datos también implican que CD31 (PECAM-1), una diana farmacológica que no es típica, aparece como diana idónea para la intervención terapéutica antiangiogénica con ARN interferentes.

Los detalles de la figura 21a son los que vienen a continuación. Control de calidad y la prueba de eficacia del siRNA lipoplejado utilizado para el tratamiento tumoral sistémico en las CEVUH. La inmunotransferencia con el anticuerpo anti-CD31 reveló un silenciamiento de CD31 dependiente de la concentración en el caso del siRNA^{CD31-8}, pero no con el siRNA^{PTEN} de control. La reducción de CD31 no tuvo efecto sobre la señalización de la PI 3-quinasa, tal y como se reveló mediante el seguimiento del estado de fosforilación de la Akt (P*-Akt), a diferencia del siRNA^{PTEN} de control. La cantidad de proteína CD34 no estaba afectada.

Los detalles de la figura 21b son los que vienen a continuación. Se siguió la influencia de dos dosis diferentes de siRNA-lipoplejo sobre la masa corporal. Se administraron diferentes dosis de siRNA^{PTEN}-lipoplejo (cuadrados: inyección diaria que da lugar a 1,88 (mg/kg)/d de siRNA y 14,5 (mg/kg)/d de lípido; rombos: inyección dos veces al día (separadas por 8 h) de 3,75 (mg/kg)/d de siRNA y 28,9 (mg/kg)/d durante siete días consecutivos y se midieron los cambios de masa corporal y se representaron gráficamente como el valor medio ($n = 7$ ratones). Para la comparación, se muestra la masa corporal (media \pm EEM) de cada animal tratado con la solución isotónica de sacarosa (círculos).

Los detalles de las figuras 21c y 21d son los que vienen a continuación. Inhibición del crecimiento del tumor mediante el tratamiento con CD31-siRNA-lipoplejo. Se consolidaron bajo la piel dos xenoinjertos tumorales diferentes (c: 3Y1-Ras^{V12}, d: PC-3) en ratones atímicos (c: diagrama de la izquierda: $n = 8$ ratones por grupo, derecha, $n = 7$ ratones por grupo; d: $n = 8$ por grupo). Los ratones que llevan tumores se trataron con siRNA^{CD31-8}-lipoplejo (rombos), siRNA^{PTEN}-lipoplejos (triángulos) o sacarosa isotónica (círculos rellenos). Se aplicaron diferentes pautas de tratamiento tal y como está indicado; flecha simple, cada día; flechas dobles, dos veces al día. (c) El crecimiento de los tumores 3Y1-Ras^{V12} fue inhibido significativamente por el siRNA^{CD31-8}-lipoplejo en comparación con los siRNA^{PTEN}-lipoplejos al aplicar la pauta de dosificación de dos veces al día (diagrama derecho). (d) El crecimiento de los xenoinjertos PC-3 consolidados se inhibió significativamente con el siRNA^{CD31-8}-lipoplejo en comparación con el siRNA^{PTEN}-lipoplejo tratado que se administró como está indicado (1,88 (mg/kg)/d de siRNA; 14,5 (mg/kg)/d de lípido; flecha). Los datos representan media \pm EEM; significación: $*P < 0,05$ de acuerdo con Mann-Whitney.

Las siguientes referencias son inherentes a los ejemplos 23 a 28:

6. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
16. Czauderna, F. et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 2705-16 (2003).
17. Chiu, Y.L. & Rana, T.M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* **10**, 549-61 (2002).
18. Zelphati, O. & Szoka, F.C., Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11493-8 (1996).
19. Stambolic, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
20. Klippel, A. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **18**, 5699-711 (1998).
21. Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. & Bates, P.A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* **17**, 229-44 (1995).
22. Newman, P.J. et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**, 1219-22 (1990).
23. Ilan, N. & Madri, J.A. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 515-24 (2003).
24. Fox, S.B. & Harris, A.L. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *Apmis* **112**, 413-30 (2004).
25. Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M. & Perret, G.Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* **64**, 2941-55 (2004).
26. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**, 1-8 (1991).
27. Ilan, N., Mahooti, S. & Madri, J.A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* **111** (Pt 24), 3621-31 (1998).
28. Solowiej, A., Biswas, P., Graesser, D. & Madri, J.A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol* **162**, 953-62 (2003).
38. Leenders, F. et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *Embo J* **23**, 3303-13 (2004).
39. Klippel, A., Escobedo, J.A., Hirano, M. & Williams, L.T. The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. *Mol Cell Biol* **14**, 2675-85 (1994).
40. Santel, A. & Fuller, M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-74 (2001).

Las peculiaridades de la presente invención descrita en la especificación, las reivindicaciones y/o los dibujos podrían ser material, por separado o bien en cualquier combinación de los mismos, para realizar la invención en diferentes formas de la misma.

5

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> atugen AG
- <120> Lípidos, complejos lipídicos y uso de los mismos
- 5 <130> A 19025 PCT
- <160> 20
- 10 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- 15 <213> Artificial
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> hebra antisentido de siRNA específico de PTEN
- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN
- 25 <400> 1
- uaaguucuag cuguggugg 19
- <210> 2
- <211> 19
- 30 <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 35 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN
- <400> 2
- ccaccacagc uagaacuua 19
- 40 <210> 3
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 45 <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de T-Ras
- <220>
- 50 <221> característica miscelánea
- <223> hebra de una molécula de siRNA específico de T-Ras
- <400> 3
- aacguguaga aggcauccu 19
- 55 <210> 4
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 60 <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de T-Ras

<220>
 <221> característica miscelánea
 5 <223> hebra de una molécula de siRNA específico de T-Ras

 <400> 4
 aggaugccuu cuacacguu 19

 10 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de PKN3

 <400> 5
 20 gagagccugu acugcgaga 19

 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PKN3
 30
 <400> 6
 ucucgcagua caggcucuc 19

 <210> 7
 35 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 40 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de PTEN

 <220>
 <221> característica miscelánea
 45 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de PTEN

 <400> 7
 ccaccacagc uagaacuua 19

 50 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN

 <220>
 60 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN

 <400> 8
 65 uaaguucuag cuguggugg 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de PTEN de control
 10 <400> 9
 ccaccacagc uagaacuua 19
 <210> 10
 <211> 19
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> característica miscelánea
 20 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN de control
 <400> 10
 uaaguucuag cuguggugg 19
 25 <210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de PTEN
 <400> 11
 35 ccaccacagc uagaacuua 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 40 <213> Artificial
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de PTEN que tiene Cy3 en el extremo 3'
 45 <400> 12
 uaaguucuag cuguggugg 19
 <210> 13
 50 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 55 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-1)
 <400> 13
 60 ccaacuucac cauccagaa 19
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65

<220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-1)

5 <400> 14
 uucuggaugg ugaaguugg 19

<210> 15
 <211> 19
 10 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> característica miscelánea
 15 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-2)

<400> 15
 ggugauagcc ccgguggau 19

20 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-2)

<400> 16
 30 auccaccggg gcuauacc 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-6)

<400> 17
 40 ccacuucuga acuccaaca 19

<210> 18
 <211> 19
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> característica miscelánea
 50 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-6)

<400> 18
 uguuggaguu cagaagugg 19

55 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

60 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> hebra sentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-8)

<400> 19
 65 cagauacucu agaacggaa 19

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
5 <213> Artificial

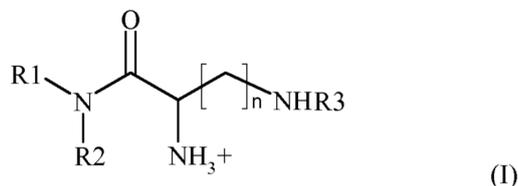
<220>
<221> característica miscelánea
10 <223> hebra antisentido de una molécula de siRNA específico de CD31 (CD31-8)

<400> 20
uuccguucua gaguaucug 19

15

REIVINDICACIONES

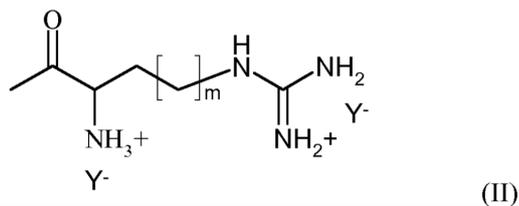
1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I),



5 en donde R₁ y R₂ son cada uno e independientemente seleccionados del grupo que comprende alquilo; en donde el término alquilo hace referencia a un radical alifático saturado o a un radical de hidrocarburo alifático mono- o poliinsaturado;

n es 1, 2, 3 o 4;

10 R₃ es un acilo seleccionado del grupo que comprende lisilo, ornitilo, 2,4-diaminobutirilo, histidilo y un resto acilo de acuerdo con la fórmula (II),



en donde m es cualquier entero entre 1 y 3, e

Y⁻ es un anión farmacéuticamente aceptable.

15 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ y R₂ son cada uno e independientemente seleccionados del grupo que comprende laurilo, miristilo, palmitilo y oleilo.

3. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde R₁ es laurilo y R₂ es miristilo;

R₁ es palmitilo y R₂ es oleilo.

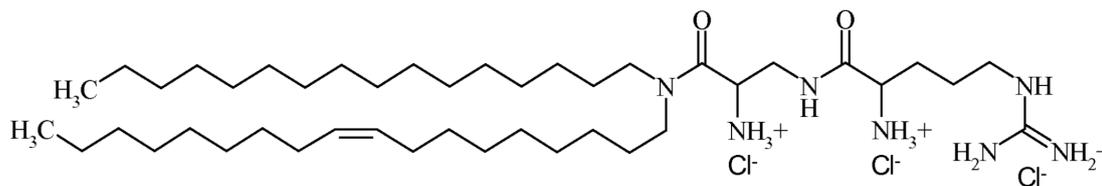
4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde m es 1 o 2.

20 5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el compuesto es un lípido catiónico, preferiblemente en asociación con un anión Y⁻.

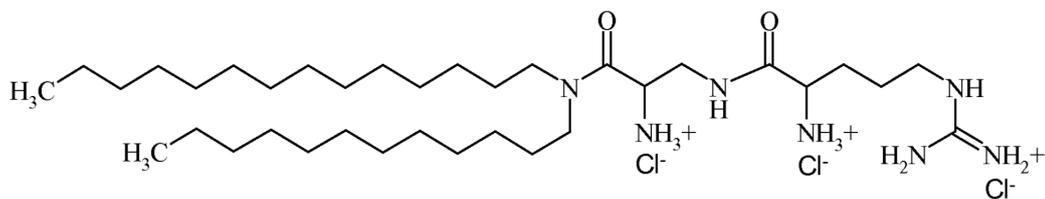
6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Y⁻ se selecciona del grupo que comprende halógenos, acetato y trifluoroacetato.

25 7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto se selecciona del grupo que comprende

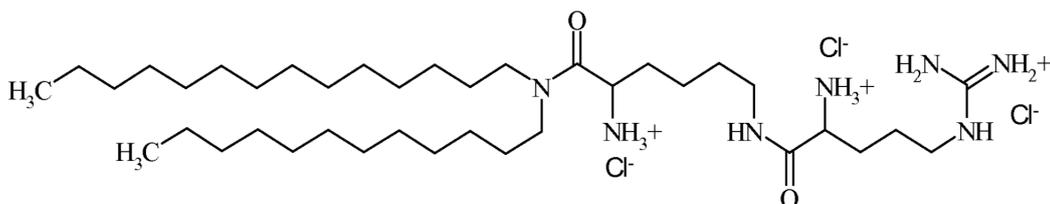
- trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-N-palmitil-N-oleilamida



- trihidrocloruro de β-arginil-2,3-diaminopropionato-N-lauril-N-miristilamida



y

- trihidrocloruro de ϵ -arginil-lisina-*N*-lauril-*N*-miristilamida

- 5 8. Una composición que comprende como componente lipídico, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición comprende un constituyente más.
- 10 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un compuesto farmacéuticamente activo y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos.
- 15 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la proteína es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN, APN y ANB.
- 20 14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico funcional, por lo cual preferiblemente el ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espejómicos.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, que además comprende al menos un componente lipídico auxiliar, por lo cual preferiblemente el componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que comprende fosfolípidos y esteroides.
- 25 16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el componente lipídico auxiliar se selecciona del grupo que comprende 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en donde el contenido del componente lipídico auxiliar es del 20% en moles al 80% en moles del contenido lipídico global de la composición.
- 30 18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el contenido del componente lipídico auxiliar es del 35% en moles al 65% en moles.
19. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el lípido es trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida y el lípido auxiliar es 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.
- 35 20. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el lípido es el 50% en moles y el lípido auxiliar es el 50% en moles del contenido lipídico global de la composición.
21. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20, en donde la composición contiene al menos dos lípidos auxiliares.

22. La composición de acuerdo con la reivindicación 21, en donde al menos un lípido auxiliar comprende un resto que se selecciona del grupo que comprende un resto de PEG, un resto de HEG, un resto de almidón polihidroxietilado (poliHES) y un resto de polipropileno, por lo cual tal resto preferiblemente aporta una masa molecular de 500 a 10.000 Da, más preferiblemente de 2.000 a 5.000 Da.
- 5 23. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 21 o 22, en donde el lípido auxiliar que comprende el resto de PEG se selecciona del grupo que comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dialquil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y ceramida-PEG.
24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el resto de PEG tiene una masa molecular de 500 Da a 10.000 Da, preferiblemente de 2.000 a 5.000 Da, más preferiblemente una masa molecular de 2.000 Da.
- 10 25. La composición de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la composición comprende como componente lipídico el trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, como primer lípido auxiliar la 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y como segundo lípido auxiliar la 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000.
- 15 26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el contenido del segundo lípido auxiliar es del 0,05% en moles al 4,9% en moles, preferiblemente del 1 al 3% en moles.
27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el contenido del lípido es del 45% en moles al 50% en moles, el contenido del primer lípido auxiliar es del 45 al 50% en moles y, siempre y cuando haya un segundo lípido auxiliar PEGilado, el contenido del segundo lípido auxiliar es del 0,1% en moles al 5% en moles, preferiblemente del 1 al 4% en moles, y más preferiblemente del 2%, por lo cual la suma del contenido del lípido, del lípido, del primer lípido auxiliar y del segundo lípido auxiliar es del 100% en moles y por lo cual la suma del primer lípido auxiliar y del segundo lípido auxiliar es del 50% en moles.
- 20 28. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, que contienen:
- a) el 50% en moles de trihidrocloruro de β -arginil-2,3-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el 48% en moles de 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y
- 25 el 2% en moles de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG2000,
- o
- b) el 50% en moles de trihidrocloruro de β -L-arginil-2,3-L-diaminopropionato-*N*-palmitil-*N*-oleilamida, el 49% en moles de 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; y
- 30 el 1% en moles de *N*-(carbonilmetoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, preferiblemente la sal de sodio de la misma.
29. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 28, en donde el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico bicatenario, en donde la composición comprende además un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional que es más preferiblemente un ácido ribonucleico bicatenario y lo más preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, por lo cual preferiblemente la proporción molar del iRNA por el lípido catiónico es de 0 a 0,075, preferiblemente de 0,02 a 0,05 e incluso más preferiblemente 0,037.
- 35 30. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 29, en donde el compuesto y/o el componente lipídico auxiliar está presente como una dispersión en un medio acuoso.
31. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 29, en donde el compuesto y/o el componente lipídico auxiliar está presente como una solución en un solvente hidrosoluble, por lo cual preferiblemente el solvente se selecciona del grupo que comprende etanol y *tert*-butanol.
- 40 32. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 31, en donde el ácido nucleico funcional es un ácido ribonucleico bicatenario, preferiblemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende iRNA, siRNA, siNA, ácido nucleico antisentido y ribozima, y por lo cual preferiblemente la proporción molar de iRNA por lípido catiónico es de 0 a 0,075, preferiblemente de 0,02 a 0,05 e incluso más preferiblemente 0,037.
- 45 33. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 32, preferiblemente 29 a 32, en donde la composición contiene un ácido nucleico, por lo cual la proporción de carga de los fosfatos del esqueleto del ácido nucleico por los átomos de nitrógeno del lípido catiónico es de 1:1,5-7, preferiblemente 1:4.

34. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 33, preferiblemente 29 a 33, en donde el tamaño de las partículas en la dispersión es de 120 nm.
- 5 35. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 34, preferiblemente 29 a 34, en donde la dispersión es una dispersión concentrada que contiene de 1 a 100 μM de siRNA, por lo cual preferiblemente la dispersión concentrada se diluye *in vivo* o *in vitro* por 1:100 a 1:10.000, más preferiblemente 1:1.000.
36. Utilización de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 35 para la fabricación de un medicamento.
37. Utilización de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer y/o enfermedades cardiovasculares relacionadas.
- 10 38. Utilización de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer, por lo cual preferiblemente el cáncer se selecciona del grupo que comprende tumores sólidos y no sólidos, y por lo cual más preferiblemente el tumor sólido se selecciona del grupo que comprende cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon y carcinoma hepatocelular.
- 15 39. Utilización de acuerdo con la reivindicación 37 o 38, en donde el cáncer implica un proceso seleccionado del grupo que comprende angiogénesis y neoangiogénesis.
40. Utilización de acuerdo con la reivindicación 36 o 37, en donde el medicamento es para la administración del ácido nucleico a una célula seleccionada del grupo que comprende células endoteliales, células epiteliales y células tumorales, preferiblemente la célula es una célula endotelial.
- 20 41. Utilización de acuerdo con la reivindicación 40, en donde las células endoteliales son células endoteliales de la vasculatura.
42. Utilización de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la vasculatura es la vasculatura que surge de la neoangiogénesis, preferiblemente neoangiogénesis asociada a tumor, optativamente en donde la vasculatura se selecciona del grupo que comprende vasculatura del hígado, vasculatura del corazón, vasculatura del riñón, vasculatura del páncreas y vasculatura del pulmón.
- 25 43. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en donde el medicamento es para la administración sistémica.
44. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en donde el medicamento es para la administración local.
- 30 45. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 44, en donde el medicamento es un agente diagnóstico.
46. Utilización de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 35, para su utilización *in vitro* como un agente de transferencia.
- 35 47. Utilización de acuerdo con la reivindicación 46, en donde el agente de transferencia transfiere un componente farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula de humano.
48. Utilización de acuerdo con la reivindicación 47, en donde por lo cual la célula es una célula endotelial, preferiblemente una célula endotelial asociada a los vasos.
- 40 49. Un método *in vitro* para transferir un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que comprende las siguientes etapas:
- aportar la célula o la membrana;
 - aportar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
 - aportar el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional; y
- 45 - poner en contacto la célula o la membrana con el compuesto farmacéuticamente activo y/o el constituyente adicional, y el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
50. Un método *in vitro* para transferir un compuesto farmacéuticamente activo y/o un constituyente adicional al interior de una célula o a través de una membrana, preferiblemente una membrana celular, que aporta las etapas siguientes:

- aportar la célula o la membrana;

- aportar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 35; y

- poner en contacto la célula o la membrana con la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 35.

5 51. El método de acuerdo con las reivindicaciones 49 y 50, en donde el compuesto farmacéuticamente activo comprende como etapa adicional:

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

10 52. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 35, para ser usado como un medicamento en el tratamiento de una enfermedad.

53. El compuesto o composición de acuerdo con la reivindicación 52, en donde el medicamento es idóneo para la administración sistémica, preferiblemente la administración sistémica a un vertebrado.

15 54. El compuesto o composición de acuerdo con la reivindicación 53, por lo cual el vertebrado es un mamífero, más preferiblemente un mamífero seleccionado del grupo que comprende ratón, rata, conejillo de Indias, gato, perro, mono y hombre.

Figura 1

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

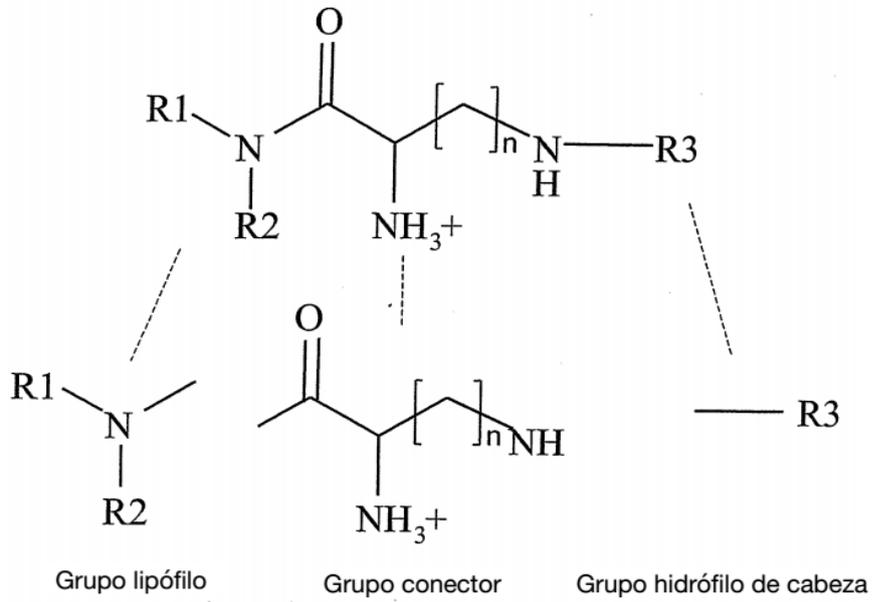
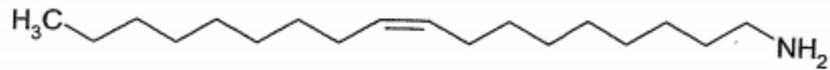
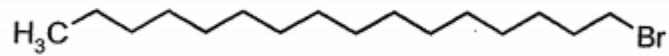


Figura 2

Material de partida: oleilamina
 Grado técnico de Fluka $\geq 70\%$ (GC)
 ~30% de aminas con cadenas alquílicas diferentes



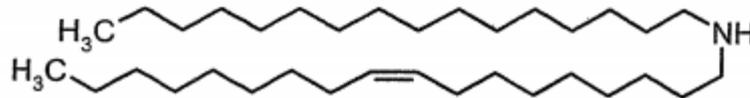
+



1-Bromohexadecano (bromuro de palmitilo)

30 min,
 100-120°C
 puro

(83%)



***N*-oleilpalmitilamina**

Figura 3

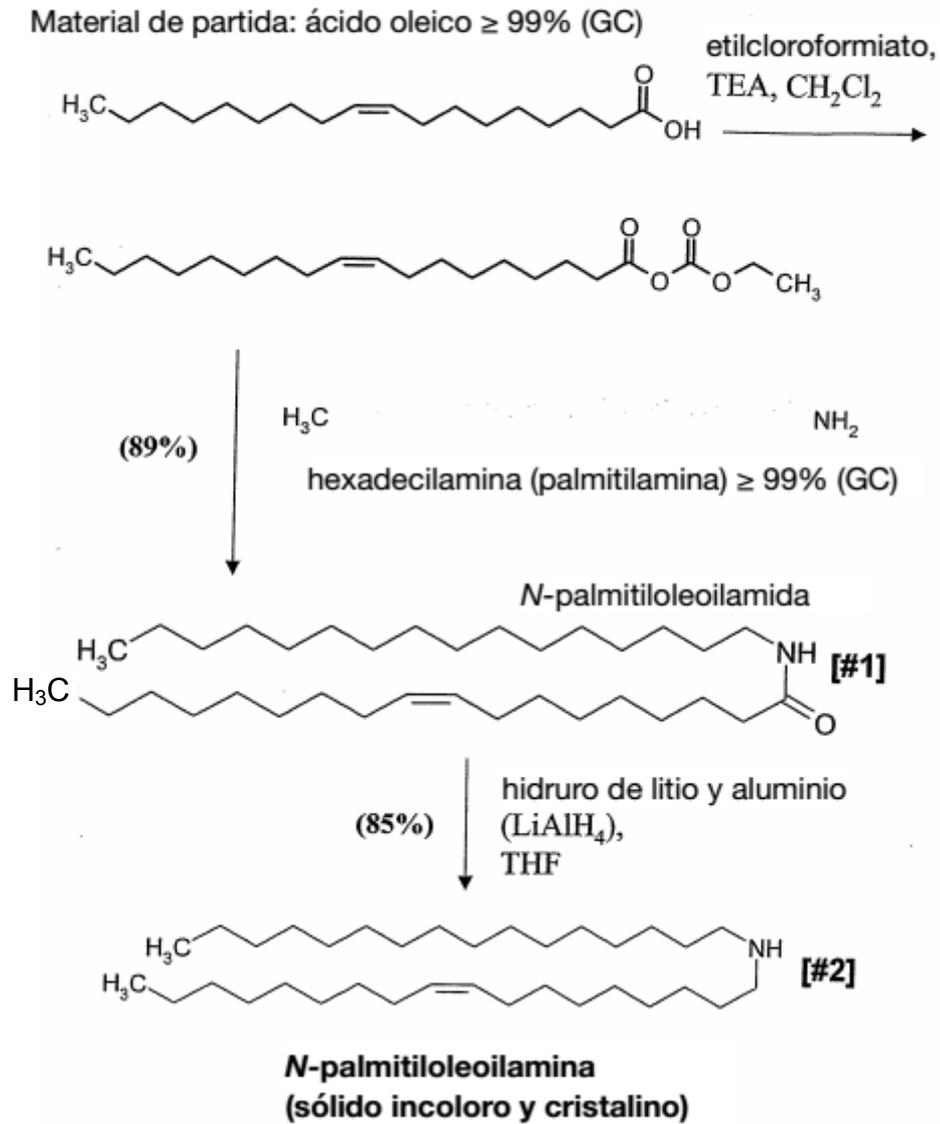


Figura 4

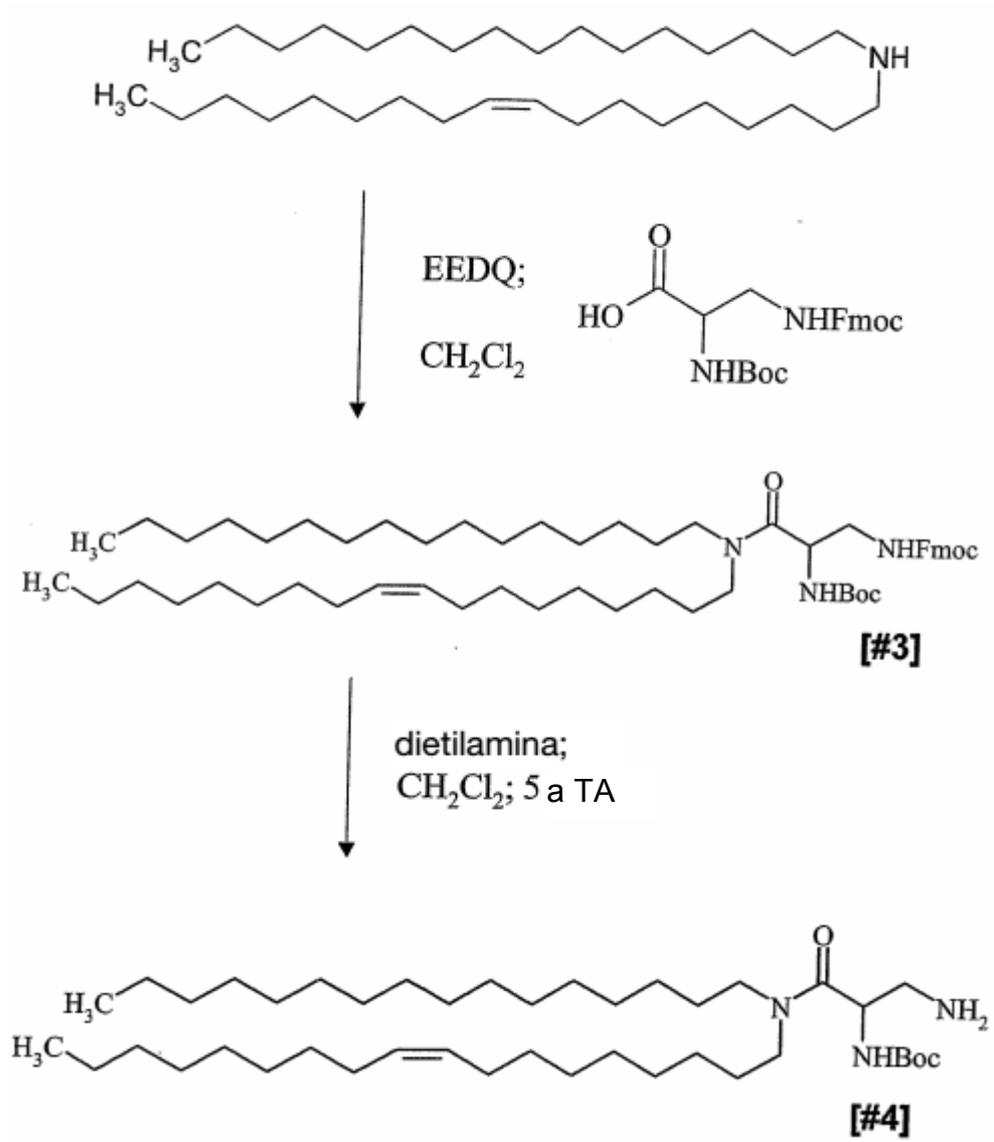


Figura 6

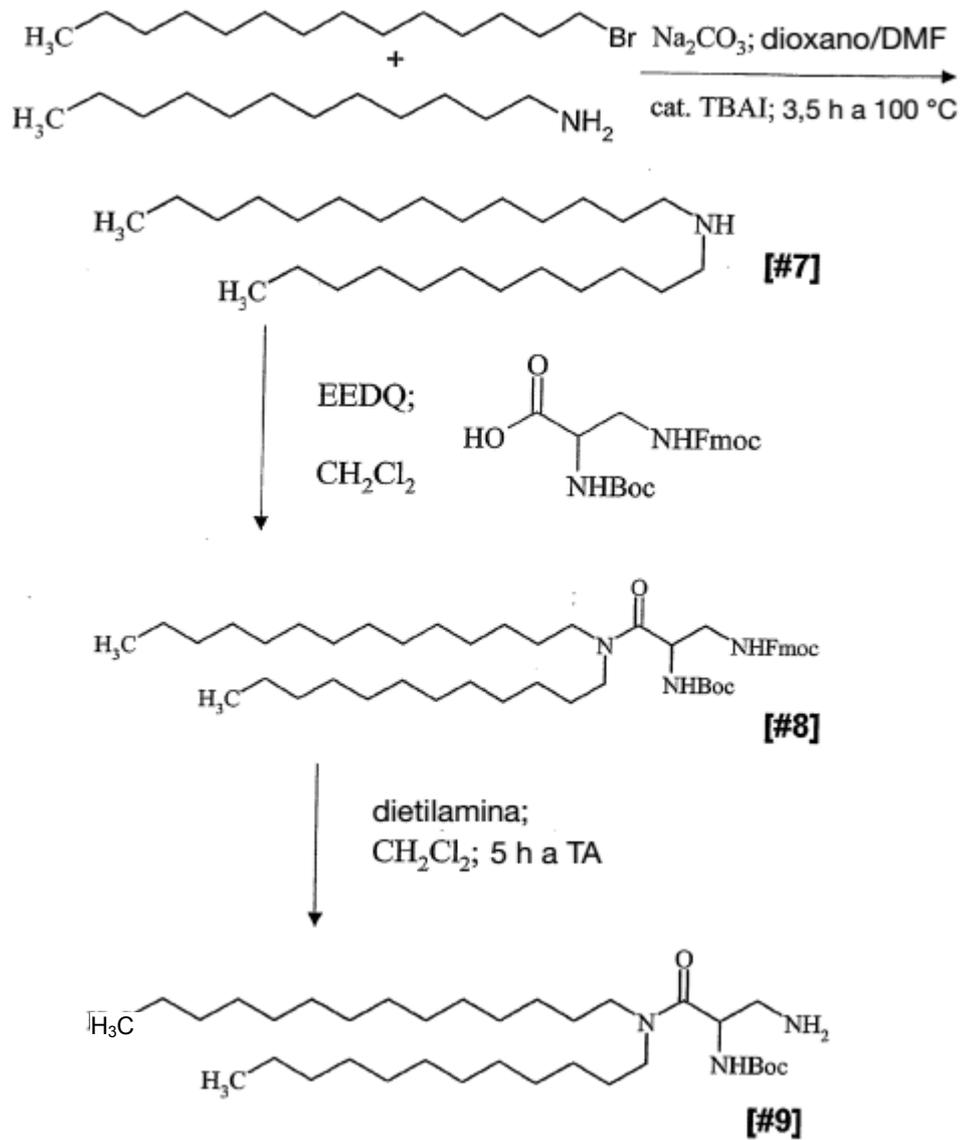


Figura 7

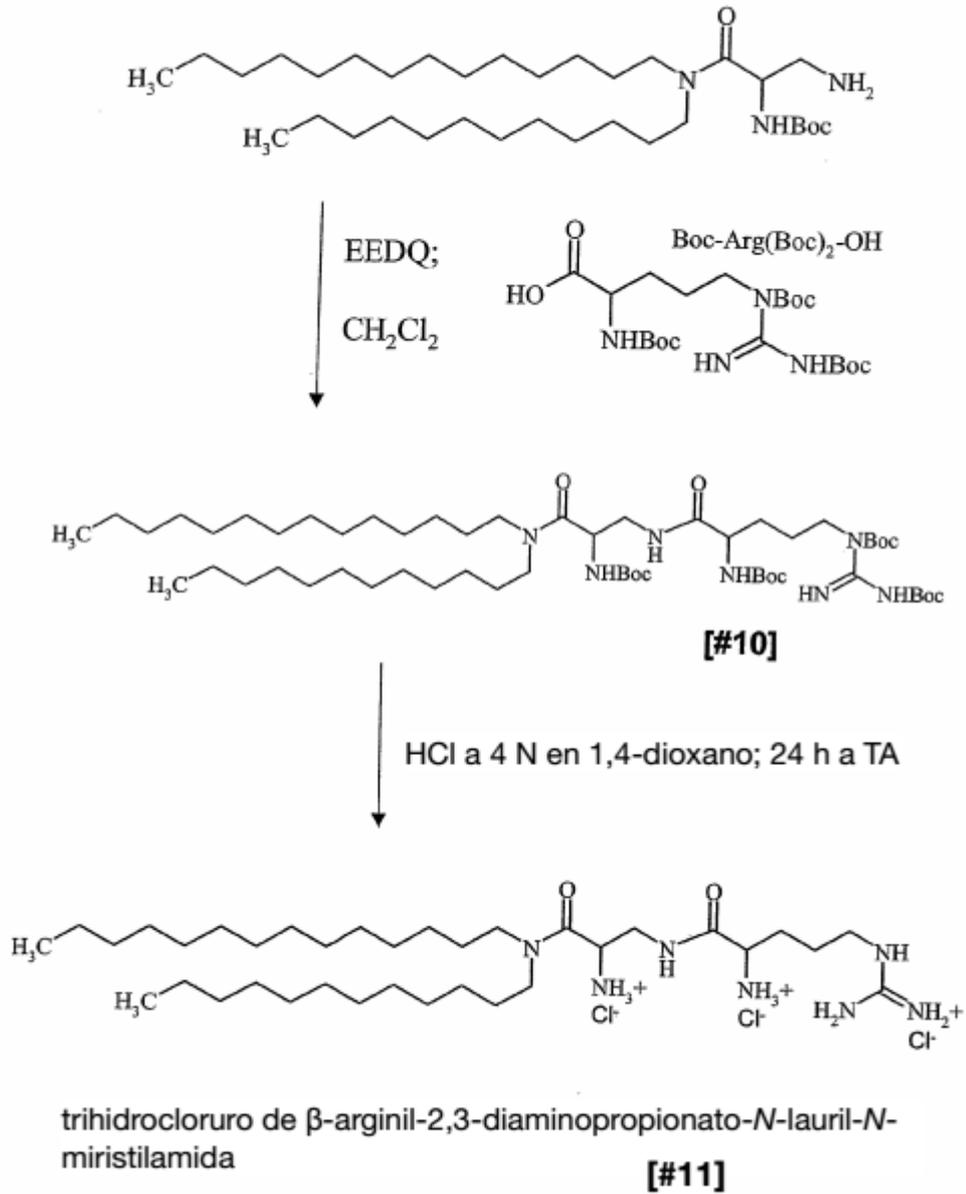


Figura 8

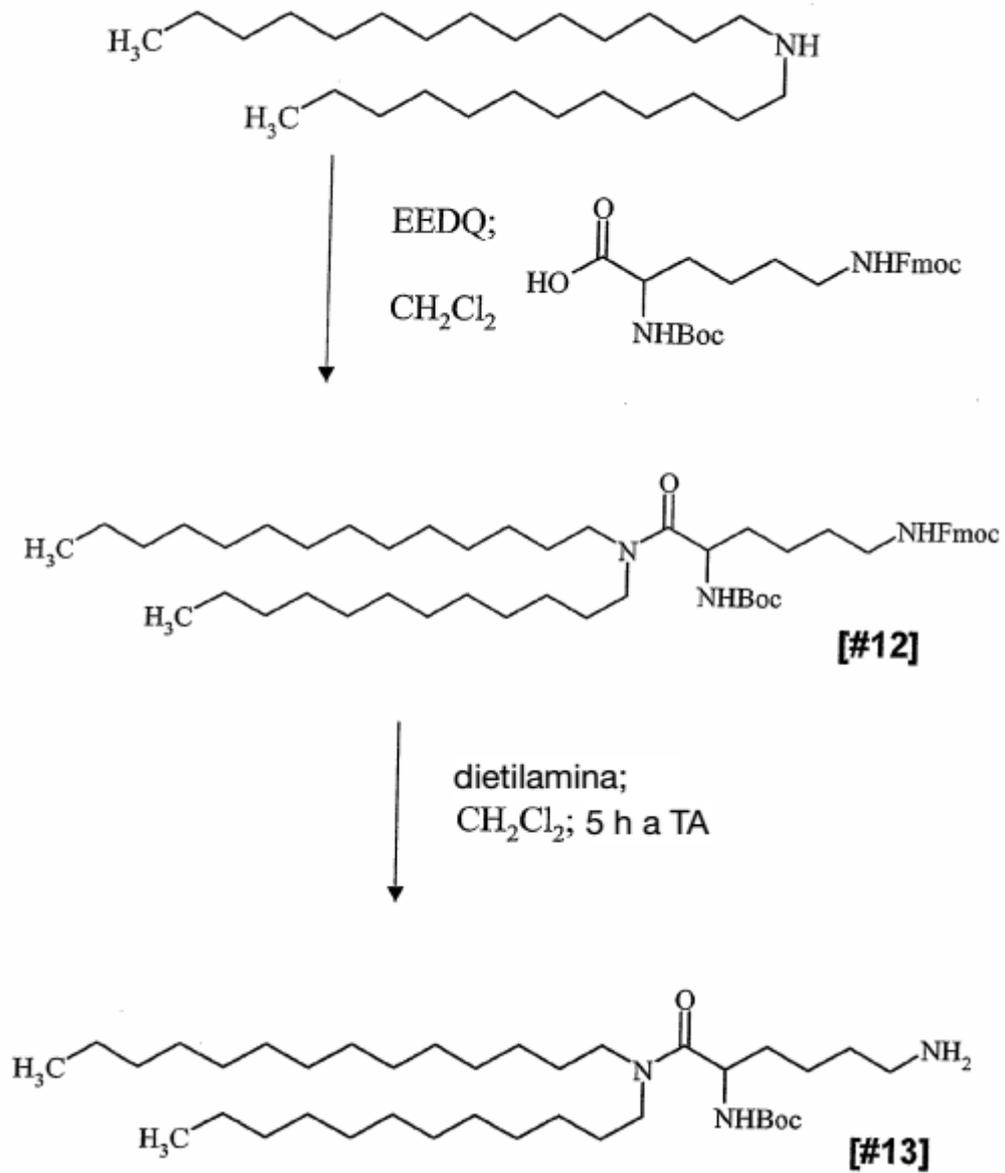


Figura 9

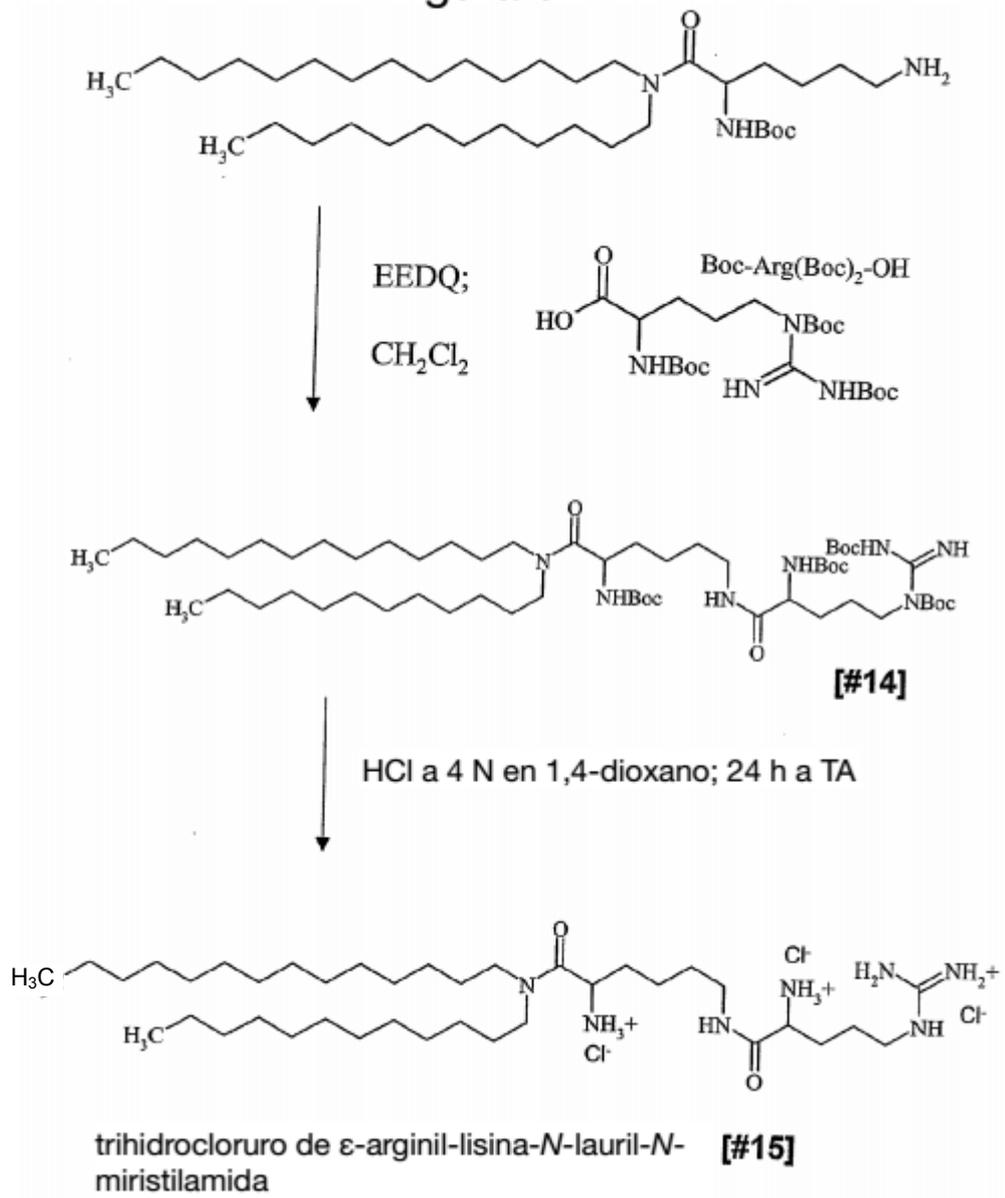
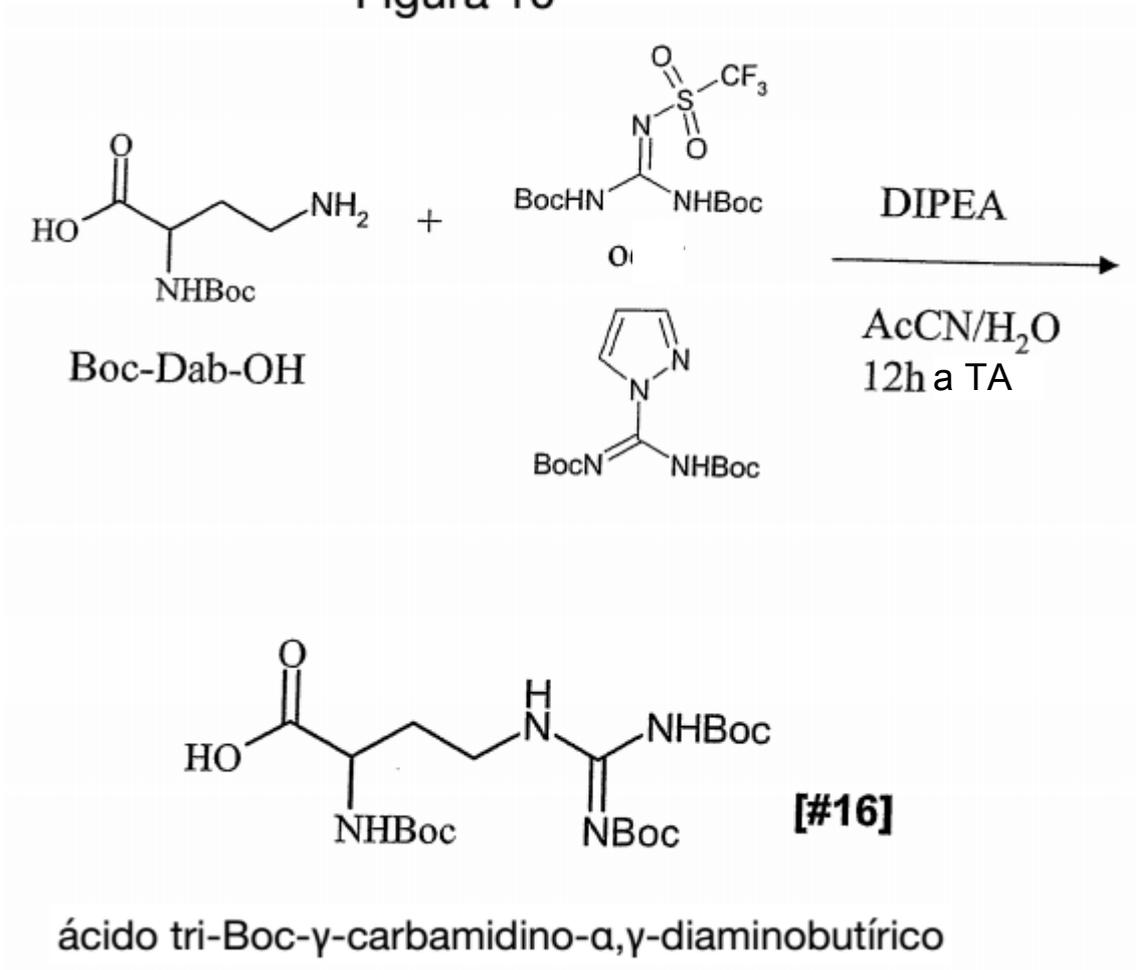


Figura 10



Vía de síntesis alternativa

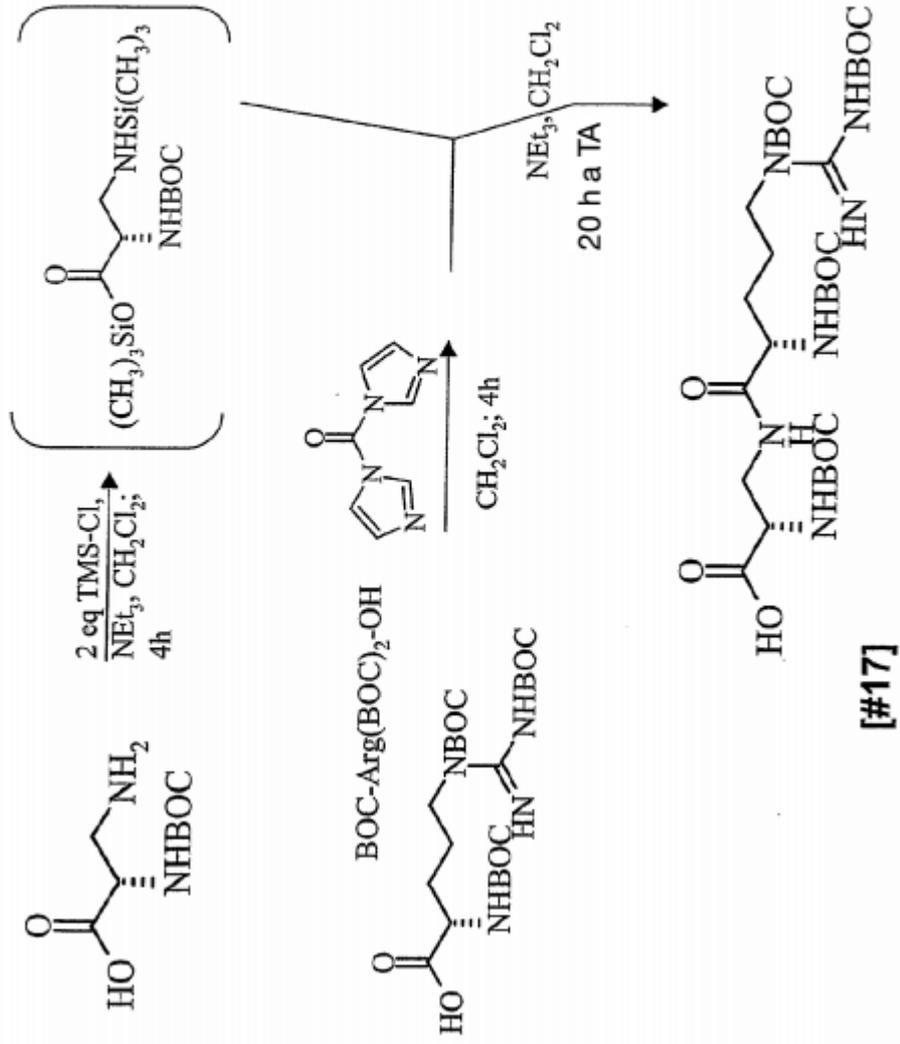
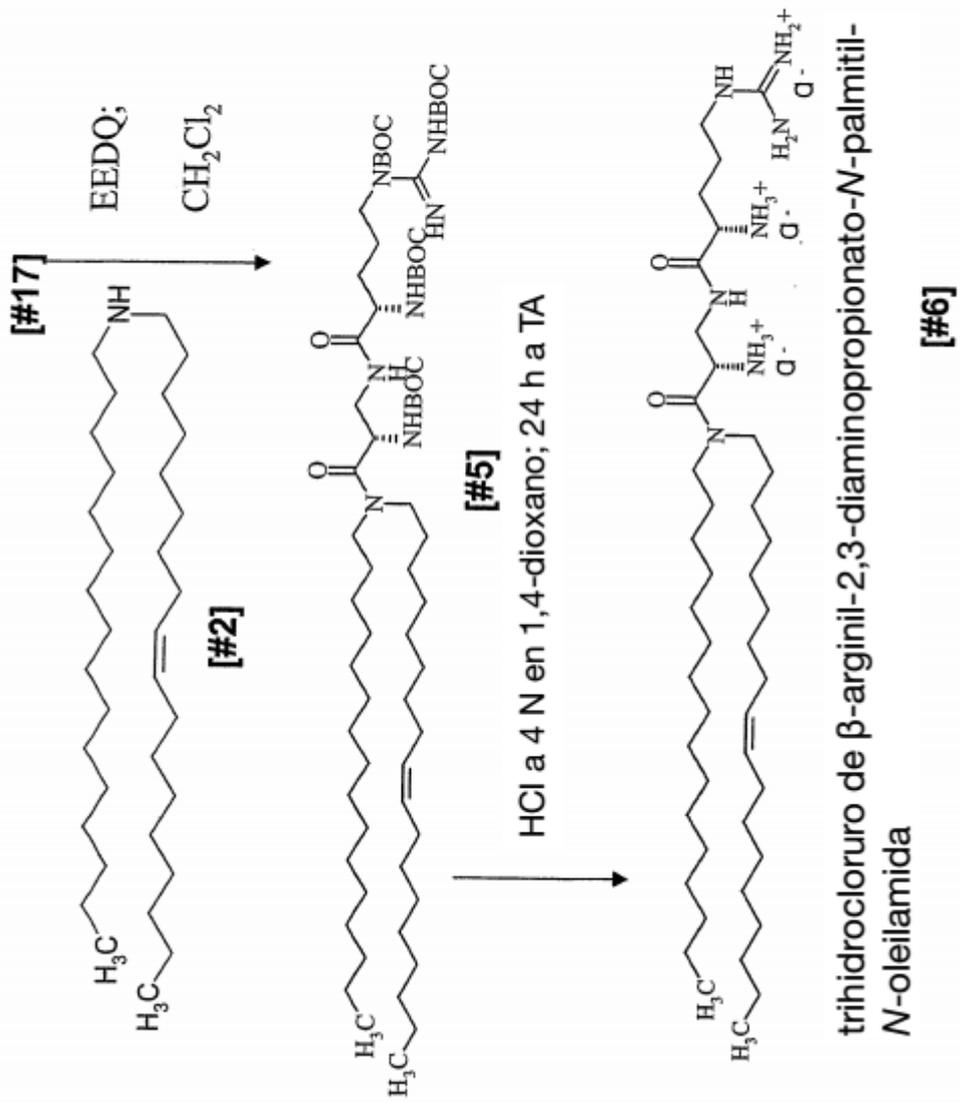


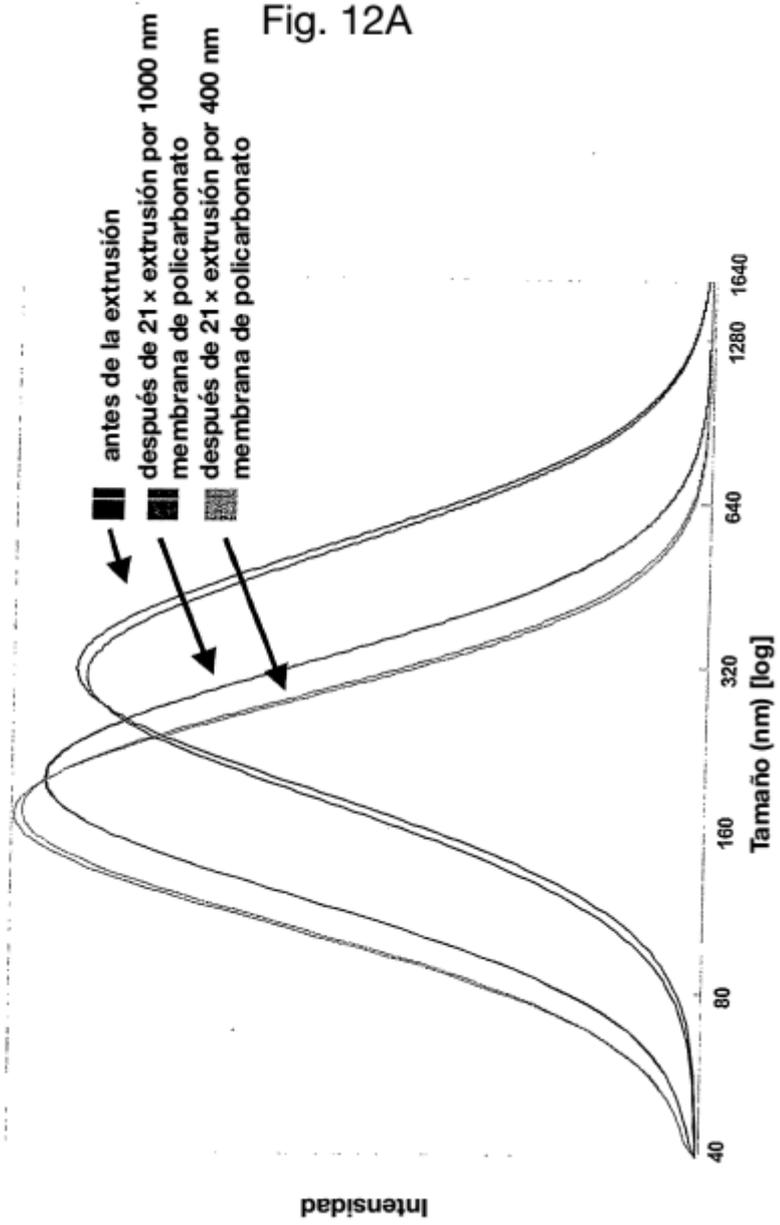
Fig. 11 - parte 1

Fig. 11 – parte 2



atuFect-liposomas: dimensionado por extrusión
según se determina mediante espectroscopia de correlación de fotones
con el analizador de partículas submicrométricas Beckman-Coulter N5

Superposición de la distribución unimodal para 90,0°



atuFect-liposomas: dimensionado por homogeneización a alta presión

según se determina mediante espectroscopia de correlación de fotones
con el analizador de partículas submicrométricas Beckman-Coulter N5

Superposición de la distribución unimodal para 90,0°

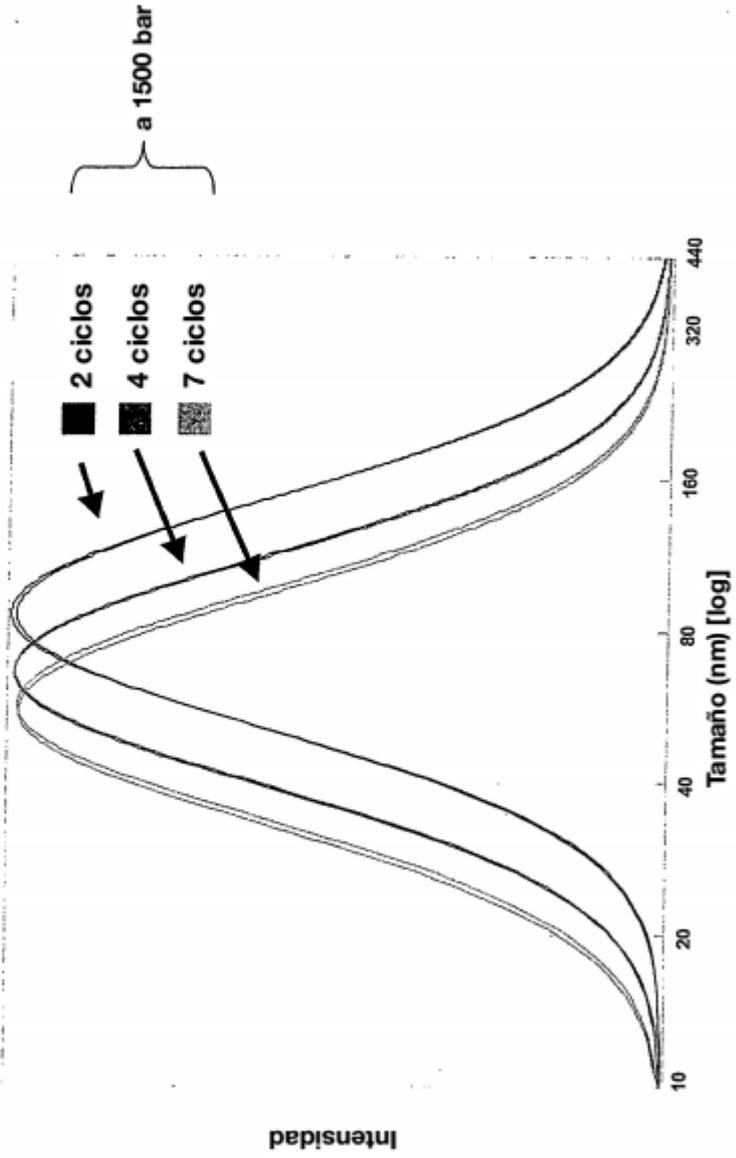


Fig. 13

Medio de almacenamiento sacarosa 300mM / Almacenamiento durante 7 días

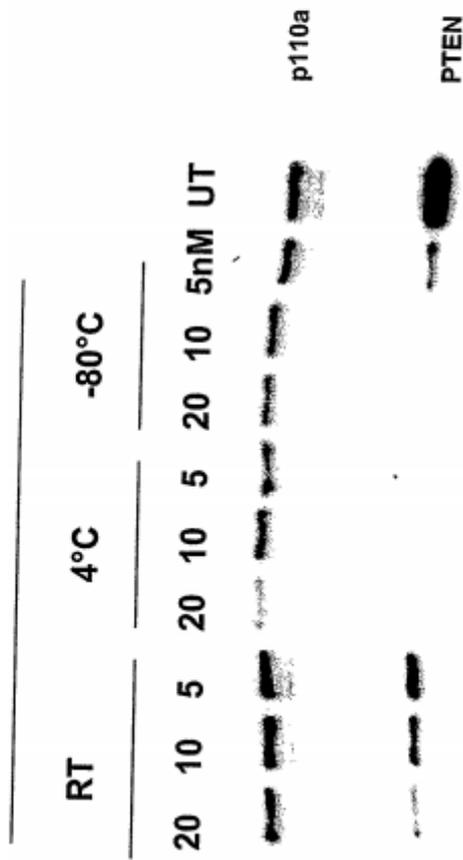
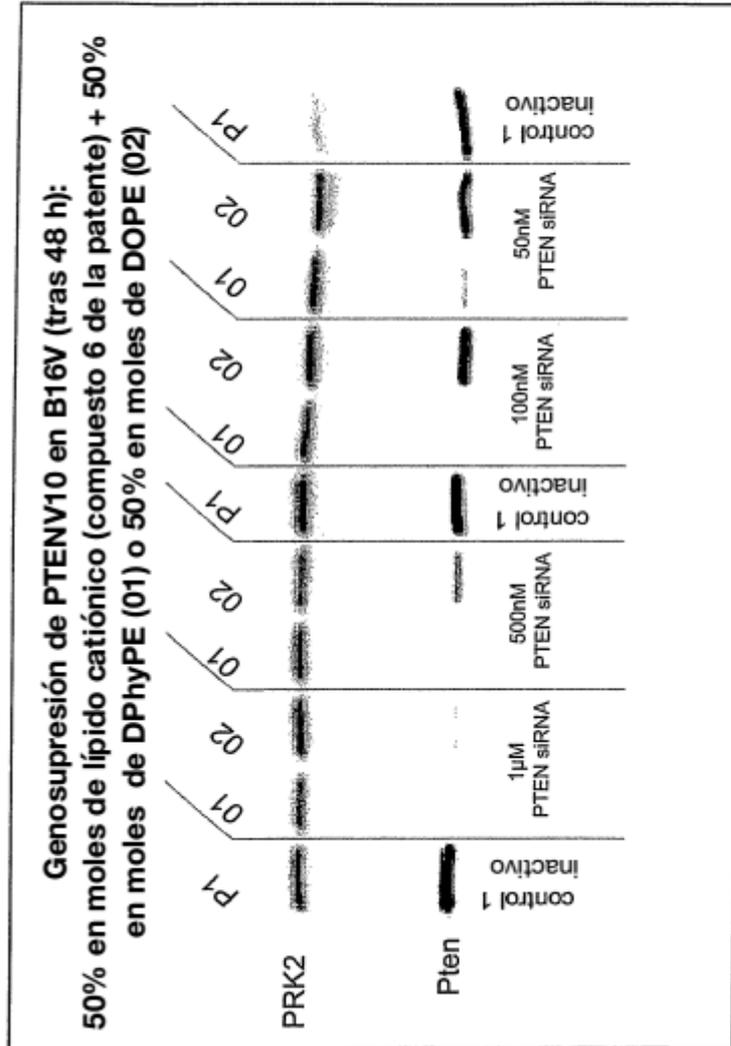
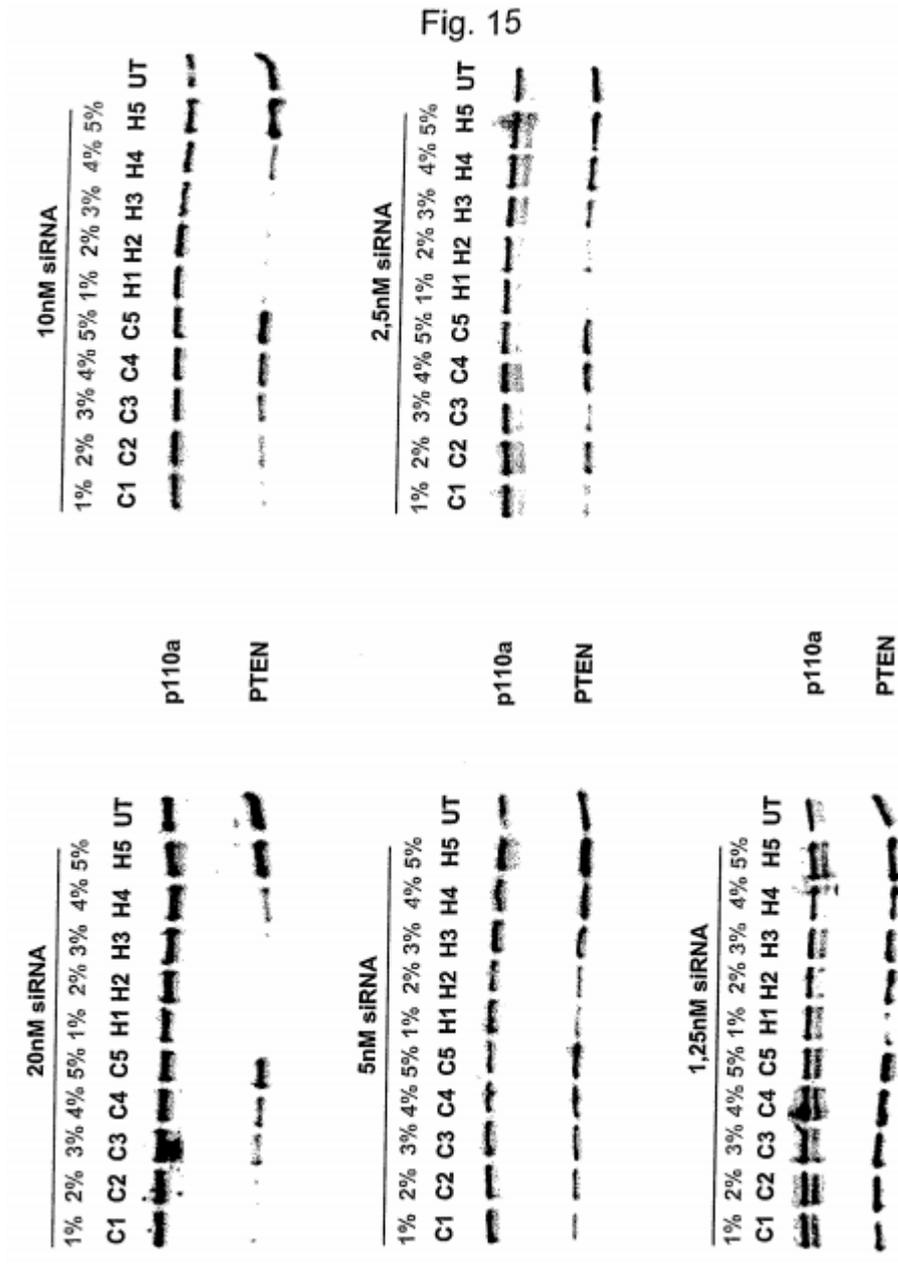
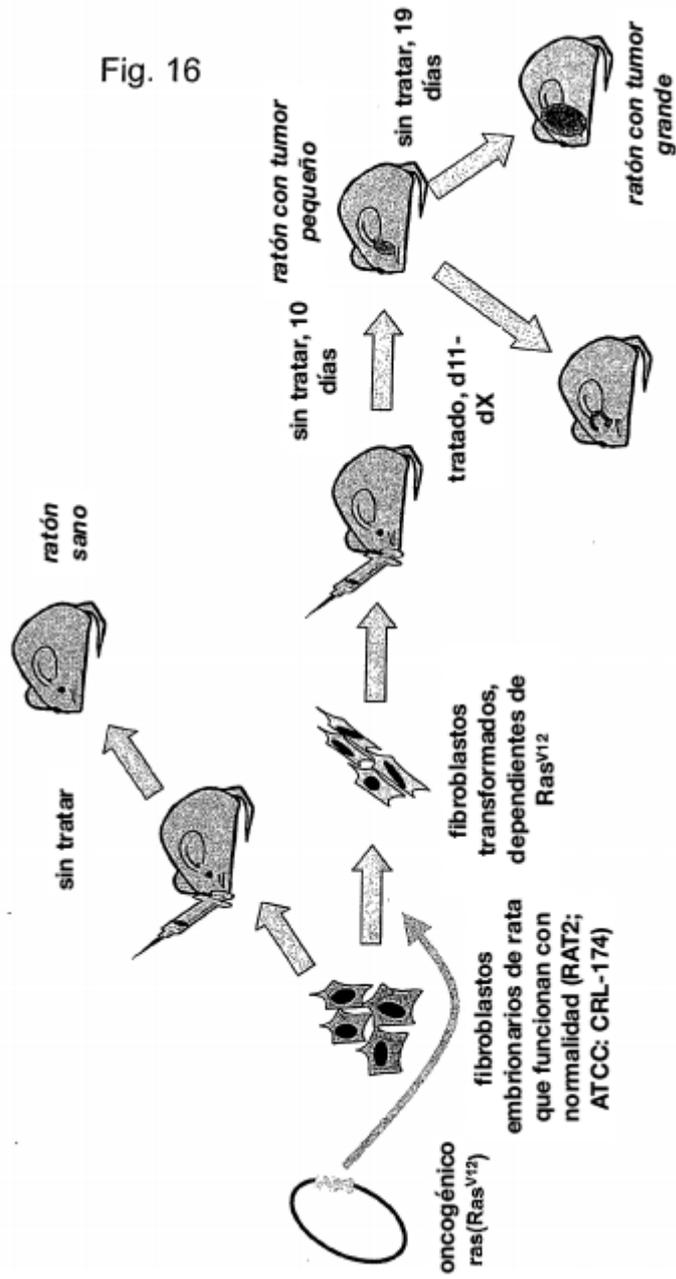


Fig. 14







Modelo de tumor dependiente de Ras y modificado genéticamente para analizar la eficacia de las distintas formulaciones, donde el crecimiento del tumor es estrictamente dependiente de la expresión de Ras^{V12}

Fig. 17 A

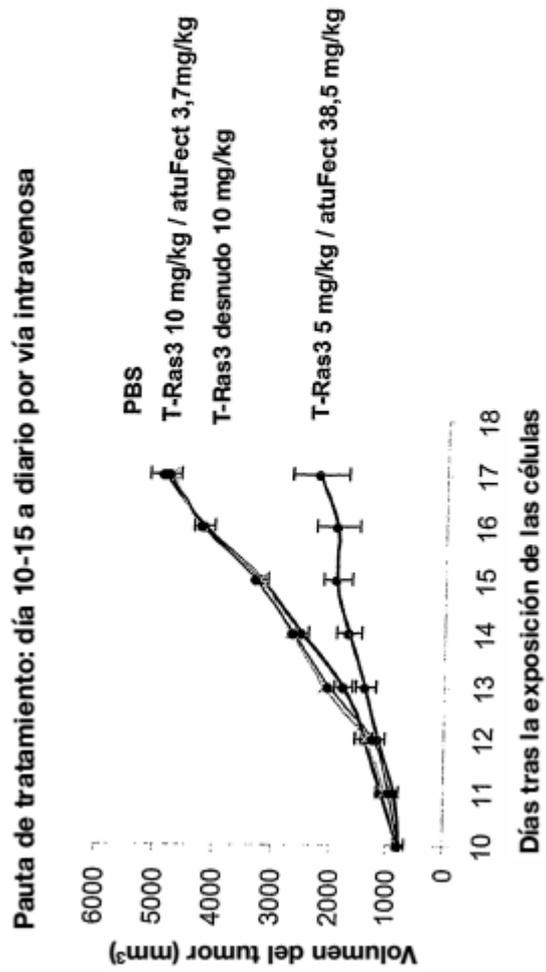
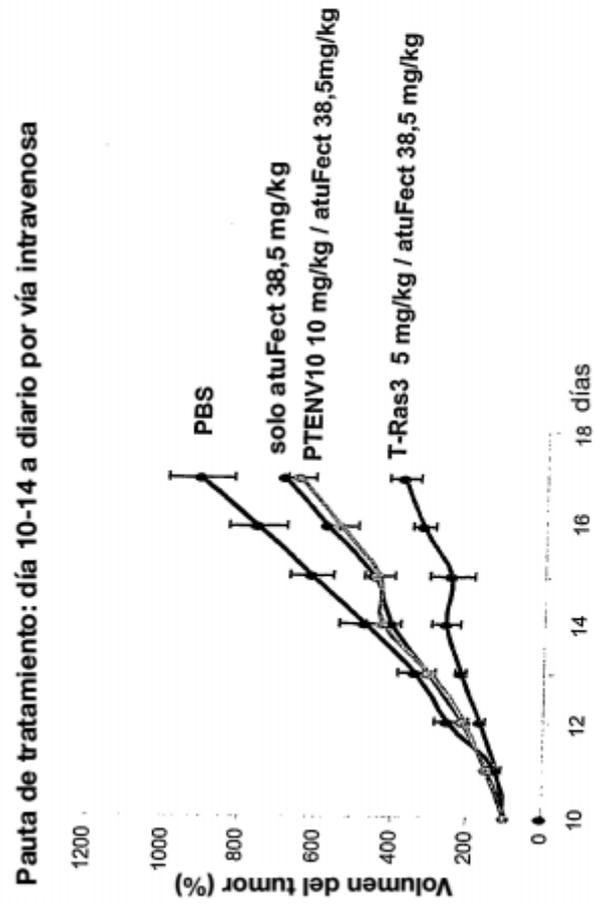


Fig. 17B



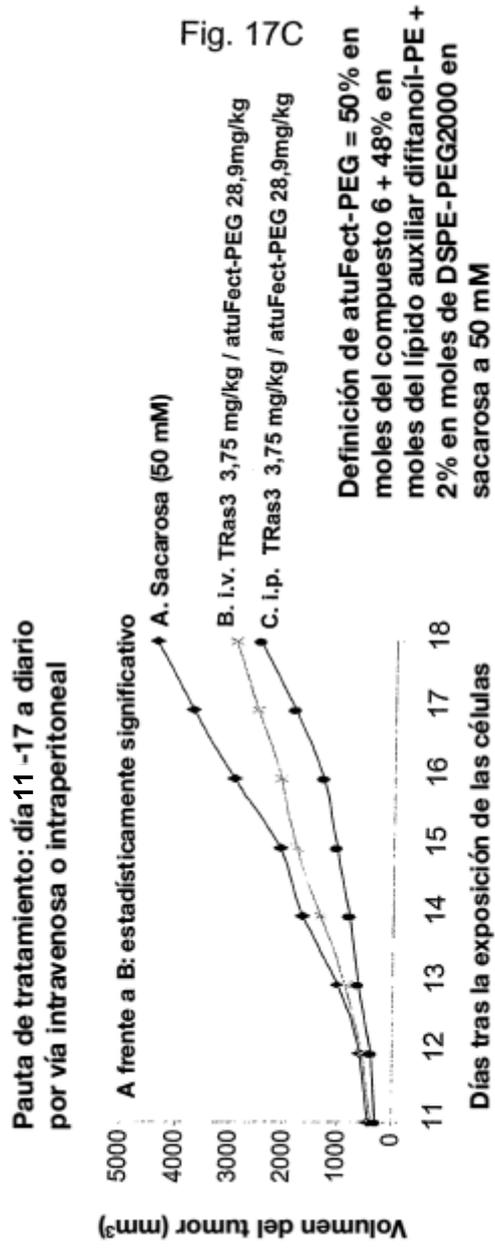


Figura 18/1

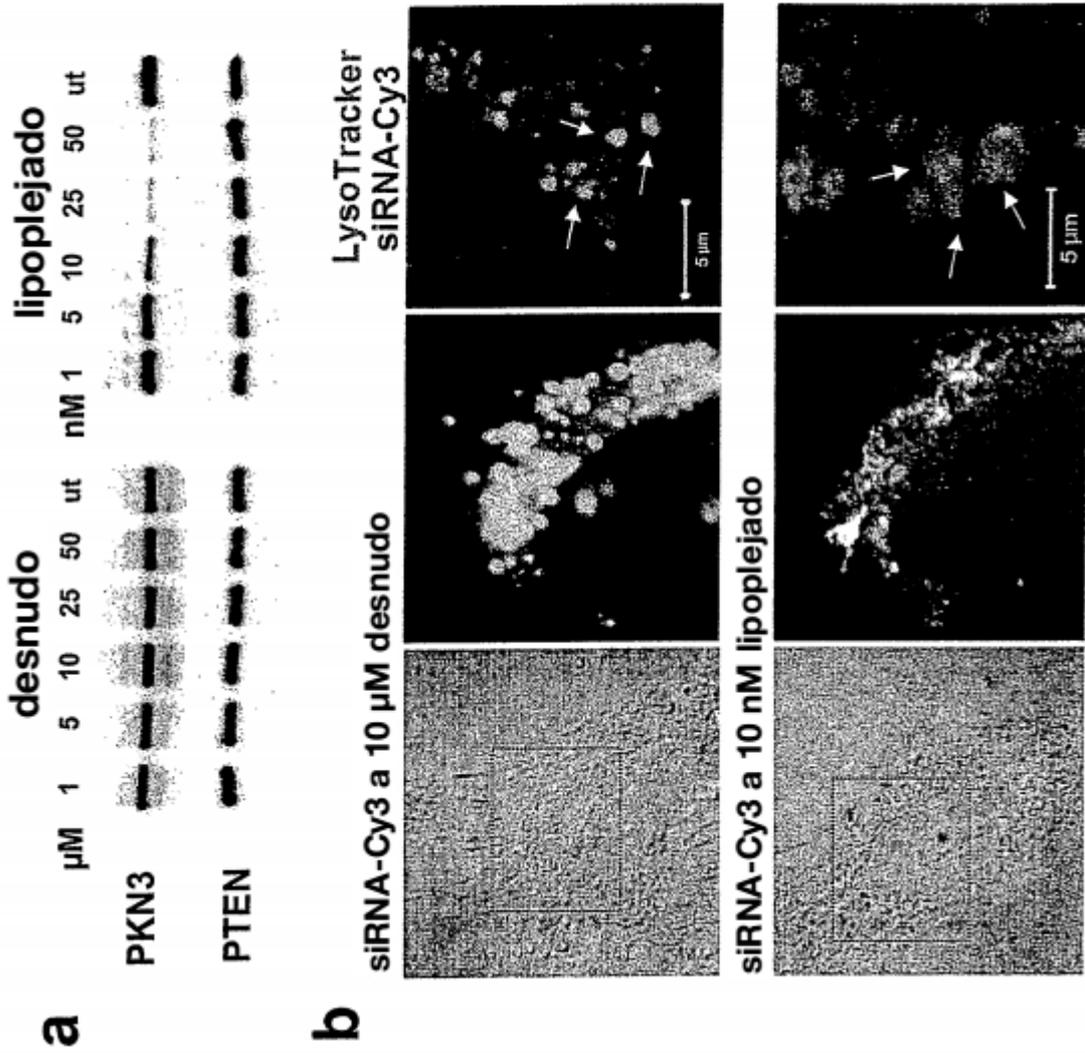
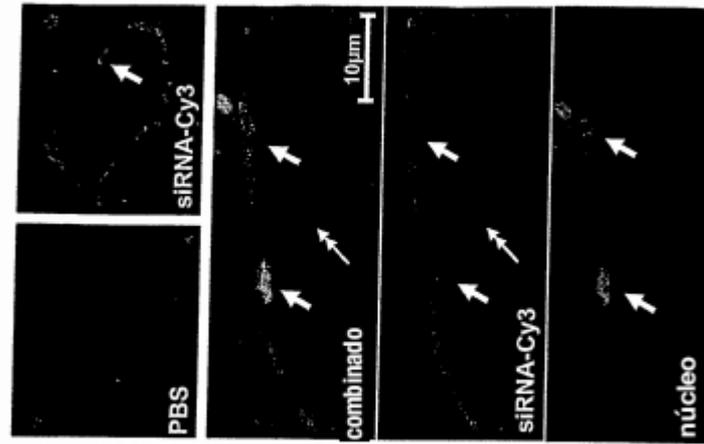
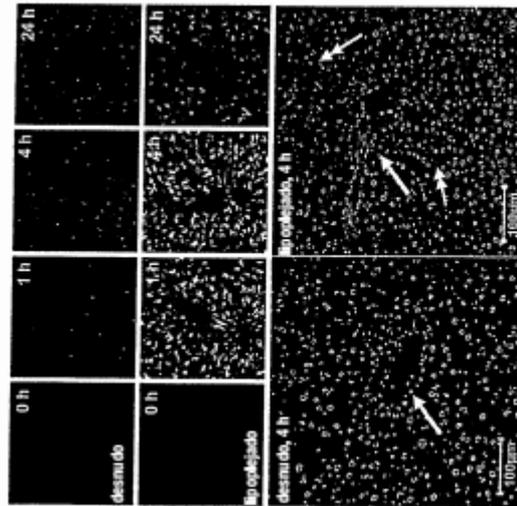


Figura 18/2



d



c

Figura 18/3

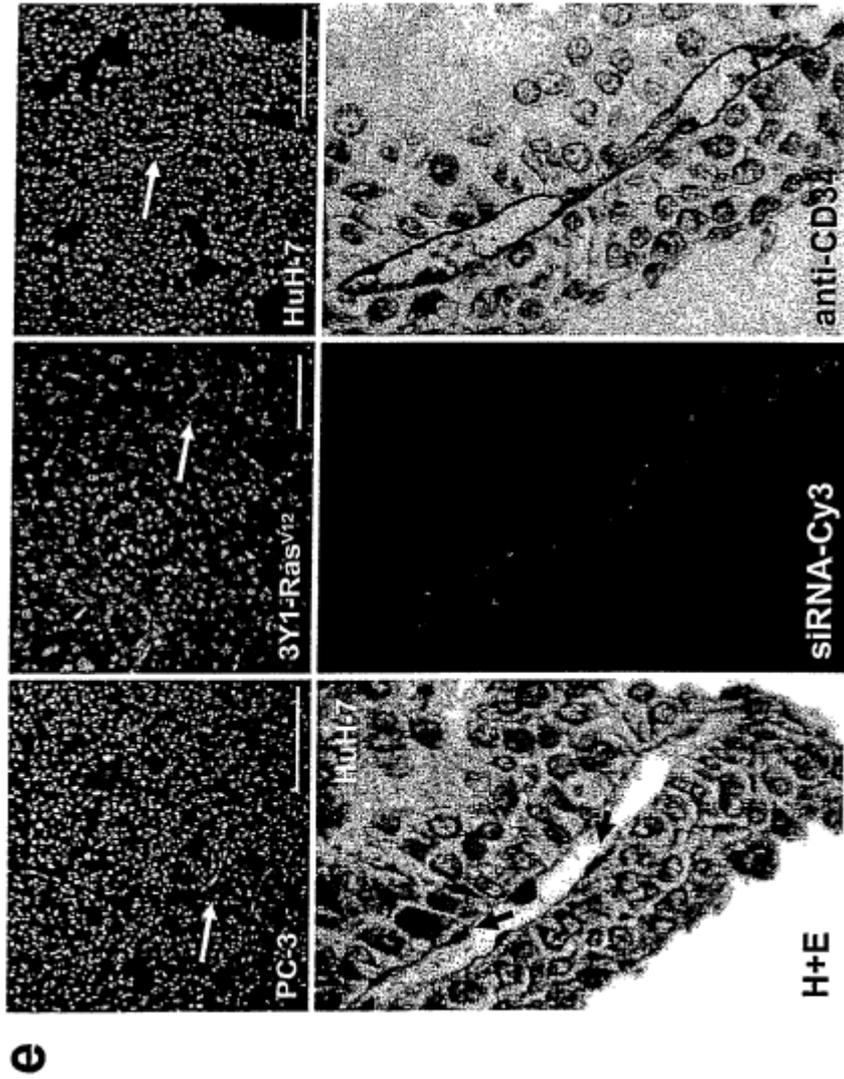


Figura 19/1

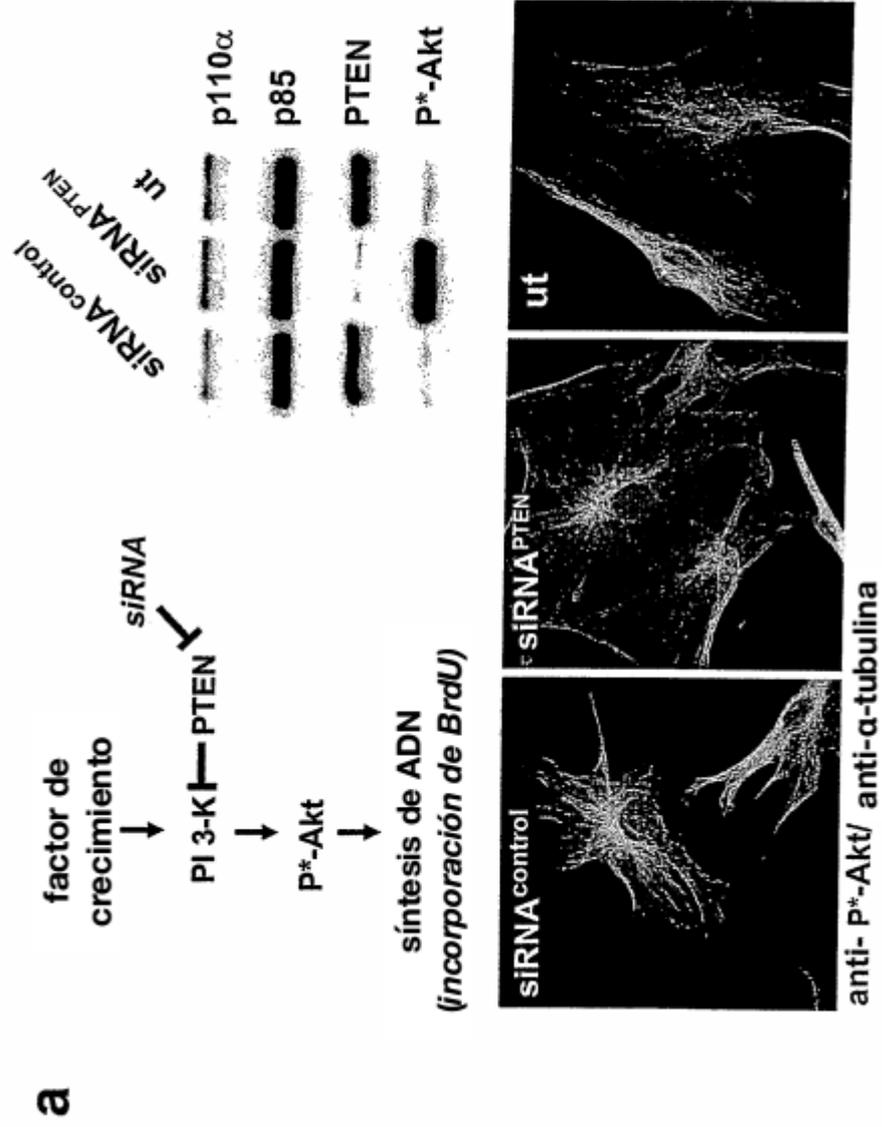
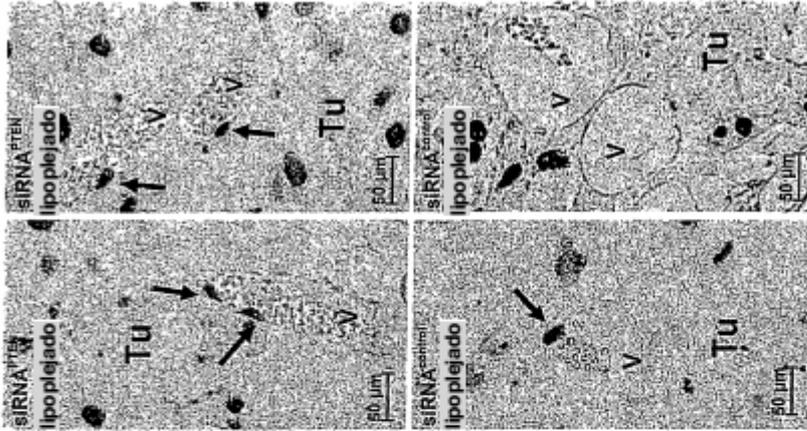
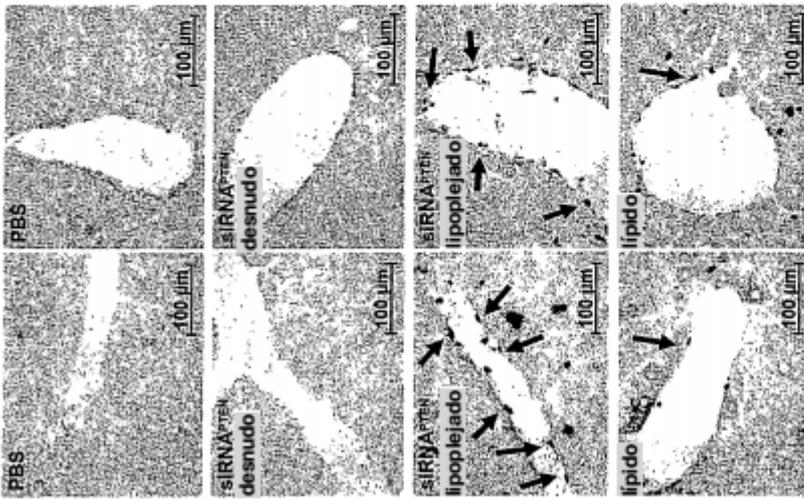
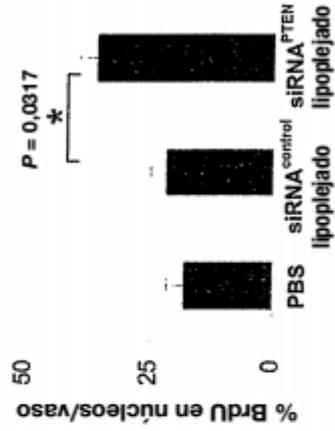


Figura 19/2



C



b

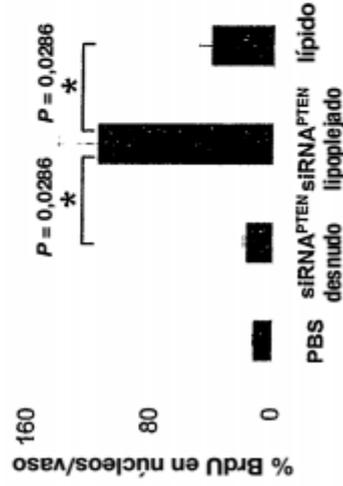


Figura 20/1

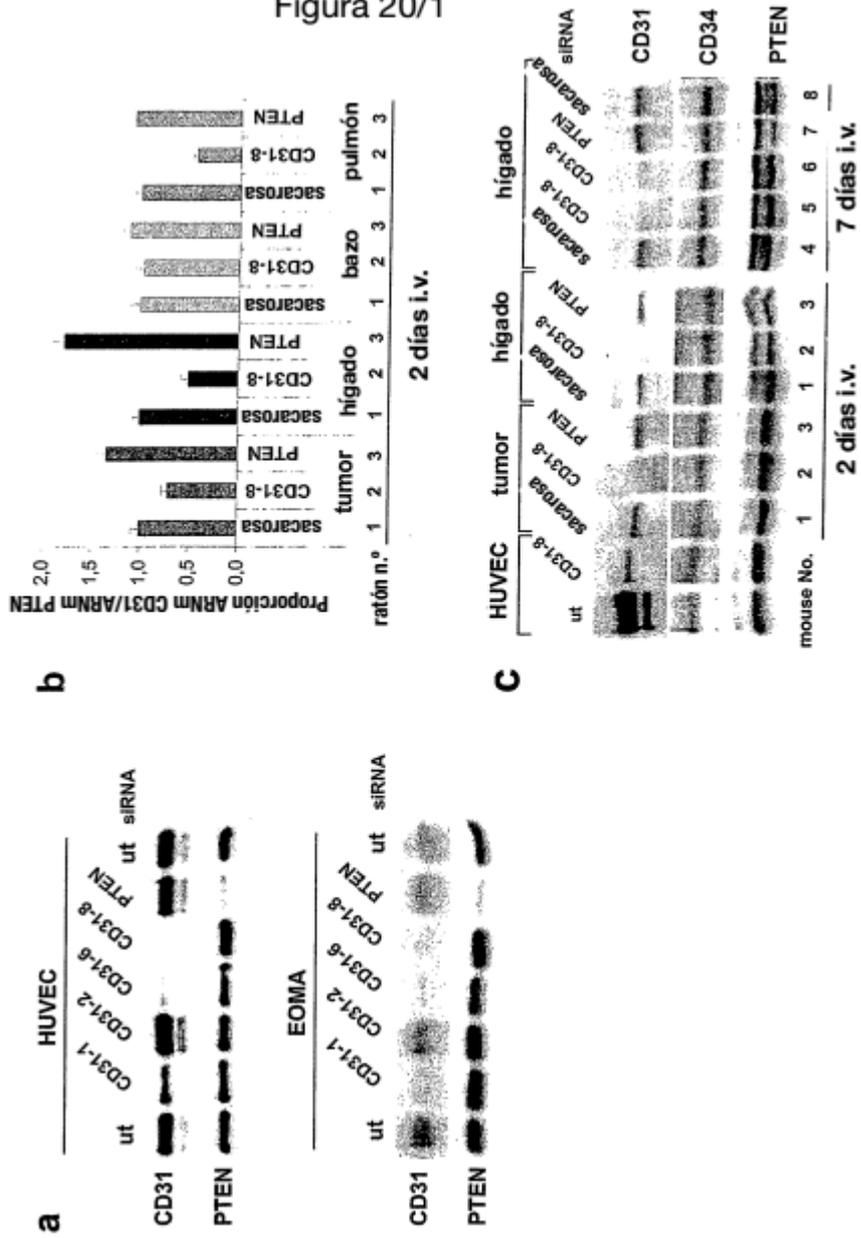


Figura 20/2

