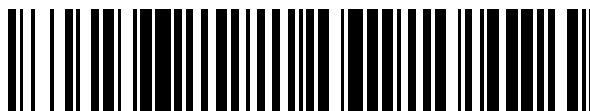


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 428**

51 Int. Cl.:

C07D 211/58 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07C 229/16 (2006.01)
C07C 229/24 (2006.01)
C07C 229/26 (2006.01)
C07C 237/06 (2006.01)
C07D 211/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011 PCT/US2011/060877**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12068176**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011 E 11793580 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2640700**

54 Título: **Reactivos de transfección que contienen amina y métodos para prepararlos y usarlos**

30 Prioridad:

15.11.2010 US 413905 P
28.01.2011 US 201161437503 P
02.02.2011 US 201161438903 P
04.10.2011 US 201161543242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2019

73 Titular/es:

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US

72 Inventor/es:

YANG, ZHIWEI;
ANGRISH, PARUL;
DE MOLLERAT DU JEU, XAVIER;
WIEDERHOLT, KRISTIN y
WU, TAO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 428 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

Reactivos de transfección que contienen amina y métodos para prepararlos y usarlos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esto reivindica el derecho de prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 a U.S. la Solicitud Provisional N.º. de Serie 61/543.242, presentada el 4 de octubre de 2011, y ante la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º. 61/438.903, presentada el 2 de febrero de 2011, y ante la Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º. 61/437.503, presentada el 28 de enero de 2011 y ante la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º. 61/413.905, presentada el 15 de noviembre de 2010.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere en general al campo de los reactivos de transfección para la administración in vitro e in vivo de agentes biológicamente activos. Más específicamente, esta invención se refiere a lípidos biodegradables y biocompatibles, y a complejos de transfección realizados utilizando los mismos, que pueden usarse para introducir ácidos nucleicos u otros agentes biológicamente activos en células in vitro o in vivo.

Antecedentes de la invención

15 La terapia génica, como el tratamiento de enfermedades a través de la aplicación de fármacos basados en nucleótidos, se ha convertido en un importante campo médico. En los últimos años, los virus modificados como vectores de transferencia de genes se han utilizado asiduamente. Sin embargo, algunas preocupaciones sobre los posibles efectos secundarios indeseables, como respuestas inmunes indeseadas cuando se utilizan vectores virales, han dado lugar a ciertos esfuerzos para desarrollar alternativas no virales (por ejemplo, sistemas de administración poliméricos, formulaciones liposómicas e inyecciones de ADN "desnudas"). Si bien estos enfoques alternativos aún
20 no han logrado la efectividad clínica de los vectores virales, la potencial seguridad, el procesamiento y los beneficios económicos que ofrecen estos métodos son prometedores.

25 La solicitud de patente WO 2006/138380 A2 describe lípidos que tienen las fórmulas generales (I)-(IV) y métodos para preparar los lípidos, haciendo reaccionar uno o más equivalentes de acrilato con un equivalente de una amina primaria, diamina o poliamina en condiciones adecuadas. Los lípidos pueden examinarse por su capacidad para transfectar ADN, ARN u otros polinucleótidos en una célula.

La solicitud de patente WO 2010/062322 A2 describe lipoides y composiciones que comprenden lipoides. Las composiciones pueden comprender además un polinucleótido inmunoestimulador. Las composiciones se pueden usar para administrar polinucleótidos inmunoestimulantes a un sujeto.

30 La solicitud de patente WO 2006/082088 A1 describe compuestos tensioactivos gemini unidos a éster de fórmula (I). Los compuestos pueden usarse para facilitar la transferencia de oligonucleótidos y polinucleótidos a células para realizar una terapia génica anti-sentido y la inmunización en organismos completos.

La solicitud de patente WO 2008/042973 A2 describe preparaciones que incluyen un compuesto de poliamina o un resto lipídico. Las composiciones descritas se pueden usar en terapias basadas en ácidos nucleicos.

35 La solicitud de patente WO 98/56423 A1 describe lípidos de fórmula (I) y complejos que comprenden al menos un lípido de fórmula (I) y, al menos, una sustancia terapéuticamente activa para transferir la sustancia a una célula diana. El complejo también se puede utilizar en terapia génica.

La solicitud de patente WO 2009/148955 A2 describe compuestos de amina de múltiples brazos de fórmula (I) y composiciones que incluyen el compuesto de amina, un fármaco, un fármaco peptídico, un agente de ARN o un agente de ARN interferente.

40 La publicación de Yaroshenko et al. ("Synthesis of ethers of aminopolycarbonic acids", Journal of Organic Chemistry, 1974, vol. 10, no. 3, páginas 462-464) describe varios éteres de ácidos aminopolicarbónicos y sus síntesis.

La solicitud de patente US 2.844.629 A describe amidas de alcianoamino-di-ácidos grasos y métodos para producirlos.

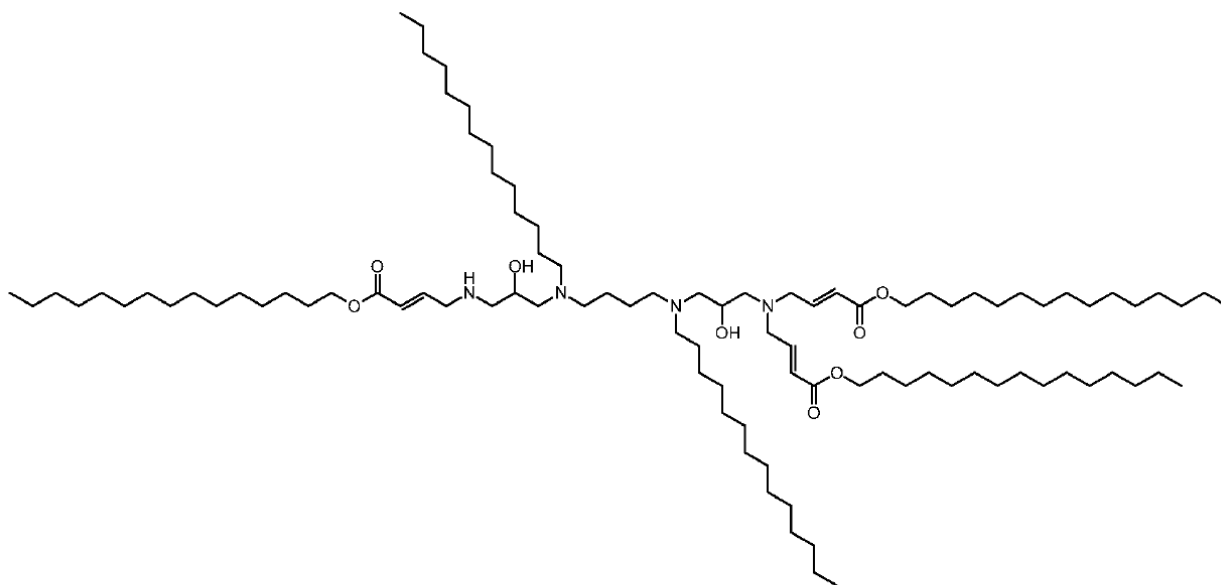
45 Sin embargo, se necesitan mejores lípidos biocompatibles, no tóxicos, biodegradables, que se preparen de manera fácil y económica para transfectar ácidos nucleicos. Tales lípidos tendrían varios usos, incluyendo la administración de ácidos nucleicos en terapia génica así como en el empaquetamiento y/o la administración de agentes de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos. La presente memoria descriptiva describe dichos nuevos reactivos de transfección y los métodos para sintetizarlos.

Resumen

50 La presente invención está dirigida a reactivos de transfección que contienen aminas y a métodos para sintetizar los mismos. Realizaciones adicionales de la presente invención se relacionan con el uso de los reactivos de

transfección que contienen amina para hacer complejos de transfección adecuados y usar en la administración intracelular de uno o más agentes biológicamente activos en células in vitro o en tejidos en seres humanos o animales in vivo.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona el compuesto de transfección que contiene amina 87, o sus sales farmacéuticamente aceptables:



87

El compuesto de transfección que contiene amina de la presente invención puede existir en forma neutra o como un catión. En algunas realizaciones, a un pH neutro o casi, fisiológicamente, neutro (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8), la forma predominante de un compuesto de transfección que contiene amina de acuerdo con las realizaciones actualizadas es un catión. En otras realizaciones, a un pH neutro o casi, fisiológicamente, neutro (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8), la forma predominante del compuesto de transfección que contiene amina, de acuerdo con las realizaciones descritas en la presente, es neutra.

En un conjunto adicional de realizaciones no limitantes, se proporcionan en el presente documento complejos de transfección adecuados para la administración de uno o más agentes biológicamente activos a una célula o un tejido in vitro o in vivo. El complejo de transfección comprende el compuesto 87. En algunas realizaciones, los complejos de transfección pueden prepararse opcionalmente en combinación con uno o más lípidos coadyuvantes, opcionalmente en combinación con uno o más lípidos pegilados, opcionalmente en combinación con uno o más lípidos catiónicos, y opcionalmente en combinación con uno o más restos dirigidos. En algunas realizaciones, la transfección se puede realizar con potenciadores de la transfección peptídicos o no peptídicos, péptidos fusogénicos o agentes no peptídicos, agentes de liberación endosómicos peptídicos o no peptídicos, o agentes de direccionamiento nuclear (como, por ejemplo, un péptido que contenga uno o más secuencias de localización nuclear, tales como serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica sin una experimentación excesiva).

Los lípidos coadyuvantes adecuados para usar en la preparación y formación de los complejos de transfección descritos en el presente documento pueden incluir, aunque no se limitan al colesterol, un derivado del colesterol, uno o más esteroides, incluidos los fitoesteroides, zooesteroides y hopanoides, o cualquiera de los lípidos neutros o catiónicos que se sabe que permiten o facilitan la introducción de moléculas bioactivas exógenas en el interior de una célula o de un tejido. En algunas realizaciones, se puede usar más de un lípido coadyuvante en la formulación de los complejos de transfección descritos en este documento.

Los lípidos neutros o catiónicos ilustrativos, aunque no limitativos, adecuados para su uso como lípidos coadyuvantes de acuerdo con las realizaciones expuestas en el presente documento pueden incluir ésteres alquílicos y alicíclicos saturados e insaturados y ésteres de aminas, amidas o derivados de los mismos. Los grupos alquilo y alqueno de cadena lineal y ramificada de lípidos catiónicos pueden contener de 1 a aproximadamente 25 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alquilo o alqueno de cadena lineal o ramificada tienen seis o más átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alquilo o alqueno de cadena lineal o ramificada tienen de ocho a aproximadamente veinte átomos de carbono. Los grupos alicíclicos pueden contener de

aproximadamente 6 a 30 átomos de carbono, o, en algunas realizaciones, de ocho a veinte átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alicíclicos incluyen colesterol y otros grupos esteroides. Los lípidos catiónicos se pueden preparar con una variedad de contraiones (aniones) que incluyen entre otros: Cl-, Br-, I-, F-, acetato, trifluoroacetato, sulfato, nitrito, triflato y nitrato.

5 Los lípidos neutros o catiónicos ejemplares, aunque no limitativos, contemplados para su uso en la preparación de los complejos de transfección descritos en este documento pueden incluir uno o varios lípidos seleccionados de entre los siguientes: BMOP (bromuro de N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-propanoamónio), DDPES (dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermidamida), DSPC, CTAB:DOPE (formulación de bromuro de cetiltrimetilamonio (CATB) y DOPE), POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DMG, DMAP (4-dimetilaminopiridina), DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina), DOMG, DMA, DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPEPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DODAC (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOSPER (1,3-Di-oleoiloxi-2-(6-carboxiespermidil)-propilamida), DOTMA (bromuro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DDAB (bromuro de didocil metilamonio), DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP•Cl, DC-col (3,β-N,N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol), DOSPA (trifluoroacetato de 2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio), DC-6-14 (cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(alfatrimetilamonioacetil)dietanolamina), DCPE (dicapropilfosfatidiletanolamina), DLRIE (bromuro de dilauril oxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), etil-PC, DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-N,N-di-metil-1-propanamino), DOGS (dioctadecilamidoglicil carboxiespermina), DMRIE (bromuro de N-[1-(2,3-dimiristoloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amonio), DOEPC (dioleoilfosfolina), DOHME (yoduro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N-[1-(2-hidroxietil)]-N,N-dimetilamonio), GAP-DLRIE:DOPE (bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloxi)-1-propanimino/dioleilfosfatidiletanolamina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-[fosfo-rac-(3-lisil(1-glicerol))·Cl], N-lauroilsarcosina, (R)-(+)-limonena, lecitinas (y derivados de los mismos); fosfatidiletanolamina (y derivados de la misma); fosfatidiletanolaminas, dioleoilfosfatidiletanolamina), DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina), DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolamina), dipalmitoilfosfatidiletanolamina) y distearoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilcolina; fosfatidilcolinas, DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidilglicerol; lípidos catiónicos a base de piperazina, fosfatidilgliceroles, tales como DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) y diestearoilfosfatidilglicerol; fosfatidilserina (y sus derivados); fosfatidilserinas, tales como dioleoil- o dipalmitoil-fosfatidilserina; sales de amonio dicuaternario tales como N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina (TmedEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (PropEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina (HexEce), y sus correspondientes análogos saturados de N,N'-dicetilo (TmedAce, PropAce y HexAce), difosfatidilgliceroles; ésteres de ácidos grasos; lípidos de transfección monocatiónicos, tales como 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-xilitol; 1-desoxi-1-[metil(ditetradecil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[metil(dioctadecil)amonio]-D-arabinitol, ésteres de glicerol; esfingolípidos; cardolipina; cerebrosidos; y ceramidas; y mezclas de los mismos. Los lípidos neutros también incluyen colesterol y otros 3βOH-esteroles, así como sus derivados o fosfatidilcolina. También se contempla cualquier mezcla de combinación de los lípidos coadyuvantes enumerados anteriormente.

40 Los lípidos pegilados adecuados para su uso en la preparación y formación de complejos de transfección descritos en este documento pueden ser cualquier lípido o mezcla de lípidos que sean compatibles con la formación de complejos de transfección descritos en el presente documento, y con la administración de los mismos a un animal o a un ser humano in vivo, o a tejidos o células in vitro. Los lípidos pegilados utilizados en la presente invención incluyen un polímero PEG que tiene un peso molecular entre aproximadamente 250 Dalton y aproximadamente 12.000 o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 350 Dalton y aproximadamente 6.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 500 Dalton y aproximadamente 1.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 1.000 Dalton y aproximadamente 2.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 2.000 Dalton y 5.000 Dalton.

50 En algunas realizaciones, los complejos de transfección pueden incluir uno o más agentes biológicamente activos para administrarse a una célula o a un tejido diana in vitro o in vivo. Los agentes biológicamente activos adecuados pueden incluir cualquier molécula que sea capaz de formar un complejo de transfección con los reactivos de transfección que contienen amina descritos en este documento y que provocan una respuesta biológica cuando se administran al interior de una célula o células o a un tejido in vivo o in vitro. Los agentes biológicamente activos contemplados para su uso en las realizaciones descritas en este documento pueden ser agentes catiónicos, neutros o aniónicos. A modo de ejemplo no limitativo, los ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados para la formulación en un complejo de transfección pueden incluir, aunque sin limitación; ácidos nucleicos (que incluyen entre otros, moléculas de ADN lineal o circular de cadena sencilla o doble, incluidas moléculas de ADNc, moléculas de ARN de cadena sencilla o doble, moléculas pequeñas de ARN interferente (ARNi), moléculas de ARN de pequeña horquilla (ARNhc), moléculas de microARN (ARNm), oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos sentido), polipéptidos, anticuerpos, oligopéptidos, péptidos terapéuticos o moléculas de proteínas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), moléculas orgánicas catiónicas, aniónicas o neutras o fármacos, además de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En ciertas realizaciones ilustrativas no limitativas de la presente descripción, se proporcionan complejos de

transfección y métodos que utilizan el compuesto de la presente invención para administrar moléculas de ácido nucleico en células o tejidos in vitro o in vivo, incluida la administración de moléculas de ARN interferente (ARNi) o moléculas de ARN pequeño interferente (ARNip, ARNhc o ARNm) en las células para la inhibición de la expresión génica.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas no limitativas, se proporcionan complejos de transfección y métodos que utilizan los compuestos de la presente invención para administrar moléculas de ARNm en una célula o un tejido in vivo o in vitro para promover la expresión de una proteína o proteínas específicas.

10 En otras realizaciones ilustrativas no limitativas de la presente descripción, se proporcionan complejos de transfección y métodos que utilizan los compuestos de la presente invención para administrar moléculas de ADN (incluidas moléculas de ADNc) en una célula o un tejido in vivo o in vitro para promover la expresión de una proteína específica o varias proteínas o para sintetizar moléculas de ARN específicas, incluidas, entre otras, moléculas de ARNm, o también se proporcionan moléculas de ARNi o ARNm o ARNhc.

15 En algunas realizaciones, los complejos de transfección descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más péptidos fusogénicos o penetrantes de células. Un péptido fusogénico o que penetra en las células es cualquier molécula peptídica capaz de promover la fusión de un complejo que contiene lípidos con una membrana celular (ya sea una membrana plasmática o una membrana endosómica). Una variedad de péptidos fusogénicos o de penetración celular son conocidos en la técnica y están dentro del nivel de habilidad de los profesionales identificar péptidos fusogénicos o penetrantes de células adecuados y el estado para su uso en la presente invención sin una experimentación excesiva.

20 En algunas realizaciones, los complejos de transfección descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más auxiliares de transfección o restos dirigidos. Un resto dirigido puede ser un péptido, un péptido modificado, un anticuerpo, un anticuerpo modificado, una molécula receptora, una molécula receptora modificada, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble modificada, un péptido o aptámero de ácido nucleico, un péptido modificado o aptámero de ácido nucleico, una molécula orgánica, un polisacárido o cualquier otra molécula que sea capaz de dirigir un complejo de transfección a un tejido o tipo de célula específico para la administración dirigida de un agente biológico, tal como el que es evidente para quien tiene un nivel de experiencia profesional en la técnica. En algunas realizaciones, la modificación de un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un aptámero y similares puede incluir la conjugación del péptido, anticuerpo, ácido nucleico, aptámero y similares con un resto de PEG. Alternativamente, la modificación de un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un aptámero y similares puede incluir la conjugación del péptido, anticuerpo, ácido nucleico, aptámero y similares con un resto lipídico de PEG. Se conoce una gran variedad de restos dirigidos para los expertos en la técnica, y todos están contemplados para su uso con las realizaciones descritas en este documento, sin limitación.

35 En algunas realizaciones, los complejos de transfección proporcionados en este documento pueden ser estables hasta en 1 año y pueden ponerse en contacto con las células o los tejidos a transfectar, o administrarse a un animal o ser humano inmediatamente o poco después de formarse u, opcionalmente, se pueden almacenar por un período de tiempo antes de ser puestos en contacto con las células o tejidos, o ser administrados a un animal o a un ser humano. Los complejos de transfección son estables y pueden almacenarse durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año a temperatura ambiente, o a una temperatura superior a la de congelación, hasta aproximadamente la temperatura ambiente. Debe entenderse que la formulación descrita en el presente documento puede incluir uno o más agentes estabilizantes, conservantes, tampones, etc., que ayuden en la estabilización y almacenamiento a largo plazo de la formulación bioactiva, como entenderá cualquier experto en la materia de las artes biológicas y farmacéuticas, y sin requerir excesiva experimentación para lograrlo. También se entiende que el período de almacenamiento puede estar entre cualquiera de estos períodos de tiempo, por ejemplo, entre 31 minutos y 1 hora o entre 1 hora y 24 horas.

50 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para la preparación de complejos de transfección funcionales. Los métodos generalmente incluyen formar un agregado lipídico mediante la encapsulación de un agente biológicamente activo en una composición que comprende el compuesto 87, opcionalmente en combinación con uno o más lípidos coadyuvantes, lípidos estabilizantes, auxiliares de transfección, lípidos pegilados o restos dirigidos. Tales métodos pueden incluir a) mezclar uno o más compuestos de transfección que contienen aminas, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una sal de los mismos, en una solución de alcohol/acuosa en la que la concentración de alcohol es <50%; a2) mezclar uno o más compuestos de transfección que contienen amina, al menos un coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en un porcentaje molar tal que uno o más compuestos de transfección que contienen amina están presentes en 15%-50%; a3) mezclar uno o más compuestos de transfección que contienen aminas, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más que un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en un porcentaje molar tal que los lípidos pegilados

estén presentes a <50 %; y a4) mezclar uno o más compuestos de transfección que contienen aminos, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más que un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en donde el lípido pegilado tiene un peso molecular de polietilenglicol de aproximadamente 2000-12000 y una longitud de cadena de ácido graso de alquilo C₆-C₂₀, o alqueno C₁₀-C₂₀; y complejar el agregado lipídico en una solución de alcohol/acuosa con el agente bioactivo para formar un complejo de transfección, en donde la concentración de alcohol es <50%, preferiblemente menor que 40%. En algunas realizaciones, el método incluye a1) y a2), a2) y a3), a1) y a3), a2) y a4), a3) y a4), a1) y a4), o a1)-a) 4, por ejemplo. En algunas realizaciones, el alcohol es un alcohol C₁-C₄. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol. En algunas realizaciones, el alcohol es un alcohol farmacéuticamente aceptable tal como un alcohol que es líquido a aproximadamente la temperatura ambiente, por ejemplo, etanol, propilenglicol, 2-(2-etoxietoxi)etanol (Transcutol™), alcohol bencílico, glicerol, polietileno glicol 200, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400 o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el alcohol para mezclar es diferente al alcohol para formar complejos.

Otras realizaciones descritas en el presente documento proporcionan métodos para seleccionar grandes cantidades de compuestos de transfección para su administración in vivo. Tales métodos pueden incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección que contienen un compuesto que facilita fácilmente la detección de un marcador en combinación con un compuesto de transfección de prueba, administrar cada uno de la pluralidad de complejos de transfección a un animal de prueba y detectar el marcador.

En algunas realizaciones, un método para seleccionar la administración de un complejo de transfección con sesgo tisular puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con al menos un ácido nucleico que facilite la detección de la administración a un tejido. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARN o una molécula de ADN que codifique una proteína que pueda detectarse directamente (como, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente roja, la luciferasa o similares), o que codifique una proteína que efectúe la expresión de una proteína que puede ser detectada directamente.

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada por el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifica la proteína fluorescente verde. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o en un tejido a un animal de prueba, como un ratón. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del ratón pueden recogerse y la expresión de GFP en varios tejidos puede detectarse mediante examen general, examen histológico o detección molecular (PCR, transferencia de Western o similar) para determinar cuáles son los complejos de transfección de tejido o tejidos que contienen compuestos de transfección específicos que se administran a estos.

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada en el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifica la luciferasa. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o en un tejido a un animal de prueba, como un ratón. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del ratón pueden recogerse y la expresión de la luciferasa en varios tejidos puede detectarse mediante examen general, examen histológico o por detección molecular (PCR, transferencia de Western o similar), o formación de imágenes in vivo utilizando el sistema de imágenes IVIS® (Caliper).

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada en el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifique un factor de transcripción específico. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o a un tejido a un animal transgénico que exprese un gen indicador (como, por ejemplo, la luciferasa) bajo el control del factor de transcripción específico. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del animal transgénico se pueden recolectar y la expresión del gen indicador en varios tejidos se puede detectar mediante examen general, examen histológico o detección molecular (PCR, transferencia de Western o similares). Si el gen indicador es la luciferasa, la detección se puede realizar in vivo utilizando el Sistema de imágenes IVIS® (Caliper).

Estas y otras características de la presente descripción se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción, dibujos y reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico que representa algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con algunos aspectos de la presente descripción;

La figura 2 muestra un gráfico que representa algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con otros aspectos de la presente descripción;

La figura 3 muestra un gráfico que representa algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con otros aspectos de la presente descripción;

La figura 4 muestra un gráfico que representa algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con otros aspectos de la presente descripción; y

5 La figura 5 muestra una gráfica que muestra algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con otros aspectos de la presente descripción.

Las figuras 6A y 6B muestran imágenes de montaje de tejidos completos y de animales completos que representan algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando compuestos de referencia de acuerdo con otros aspectos de la presente descripción.

10 La figura 7A-7F muestra gráficos que representan algunas propiedades de una composición lipídica preparada usando un compuesto de acuerdo con una realización de la presente invención.

Descripción detallada

15 A continuación se hará referencia con detalle a algunas realizaciones de la invención. Si bien la invención se describirá junto con las realizaciones que se analizan a continuación, se entenderá que no se pretende limitar la invención a esas realizaciones.

I. Definiciones y abreviaturas

20 Debe entenderse que la presente invención no está limitada a dispositivos particulares o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen los referentes singulares y plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un lípido" incluye uno o más lípidos. Debe entenderse además que cualquier terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

25 Los términos utilizados a lo largo de esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las realizaciones generales de la invención, así como la forma de hacerlos y usarlos. Se apreciará fácilmente que la misma cosa se puede decir de más de una manera. En consecuencia, se puede usar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos que se analizan en el presente documento, y no debe colocarse ningún significado especial sobre si un término se elabora o discute con mayor detalle en este documento. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. La significación de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta memoria descriptiva, incluidos los ejemplos de los términos discutidos en este documento, es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado.

35 Los compuestos de la presente descripción pueden existir en formas geométricas particulares o estereoisoméricas. La presente descripción contempla todos estos compuestos, incluidos los isómeros cis y trans, los enantiómeros R y S, los diastereoisómeros, los isómeros (D), los isómeros (L), las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, que entran dentro del alcance de la presente descripción. Otros átomos de carbono asimétricos están presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros, así como sus mezclas, están destinados a ser incluidos en la presente descripción.

40 Las mezclas isoméricas que contienen cualquiera de una variedad de relaciones de isómeros se utilizan de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, cuando solo se combinan dos isómeros, las mezclas que contienen las relaciones de isómeros 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1 ó 100:0 están todas contempladas en la presente descripción. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que se contemplen relaciones análogas para mezclas de isómeros más complejas. Si, por ejemplo, se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente descripción, se prepara por síntesis asimétrica, o por derivación con un agente auxiliar quiral, en el que la mezcla diastereomérica resultante se separa y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar los enantiómeros con la pureza deseada. Alternativamente, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico, tal como amino, o un grupo funcional ácido, como carboxilo, se forman sales diastereoméricas con un ácido o base ópticamente activo apropiado, seguido de la resolución de los diastereoisómeros así formados por cristalización fraccionada. o medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y posterior recuperación de los enantiómeros puros.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos, expresiones, definiciones y abreviaturas, como se usan en este documento, tienen los siguientes significados:

55 La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que bloquea temporalmente un resto funcional particular, por ejemplo, O, S o N, para que la reacción se lleve a cabo

selectivamente en otro sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Un grupo protector reacciona selectivamente con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que es estable a las reacciones proyectadas, y el grupo protector se puede eliminar selectivamente con buen rendimiento mediante reactivos fácilmente disponibles que no atacan a los otros grupos funcionales; el grupo protector forma un derivado fácilmente separable; y el grupo protector tiene un mínimo de funcionalidad adicional para evitar sitios de reacción adicionales.

Como se detalla en este documento, se utilizan grupos protectores de oxígeno, azufre, nitrógeno y carbono. Ejemplos no limitativos de grupos protectores de hidroxilo ilustrativos incluyen metilo, metoximetilo (MOM), metiltiommetilo (MTM), t-butiltiommetilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), p-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (p-AOM), guaiacolmetilo (GUM), t-butoximetilo, 4-penteniloxietilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropirano (THP), 3-bromotetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopirano, 4-metoxitetrahidrotiopirano S,S-dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, t-butilo, alilo, p-clorofenilo, p-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, p-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, o-nitrobencilo, p-nitrobencilo, p-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, p-cianobencilo, p-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, 3-metil-2-picolil iV-óxido, difenilmetilo, p,p'-dinitrobenzohidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α -naftidifenilmetilo, p-metoxifenildifenilmetilo, di(p-nietoxifenil)fenilmetilo, tri(p-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5 dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4,4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo) antrilo, 1,3-benzoditioan-2-ilo, benzisotiazolilo S,S-dióxido, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-p-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), t-butilmetoxifenilsililo (TBMPMS), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, acetato de p-clorofenoxi, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenditio)pentanoato (levulinoilditioacetato), pivaloato, adamantanoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, p-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), alquil metilcarbonato, 9-fluorenilmetil carbonato (Fmoc), alquil etil carbonato, alquil 2,2,2-tricloroetilcarbonato (Troc), 2-(trimetilsilil) etilcarbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil) etil carbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio) etil carbonato (Peoc), alquilo isobutil carbonato, alquil vinil carbonato, alquil alilcarbonato, alquil p-nitrofenil carbonato, alquilbencilcarbonato, alquil p-metoxibencil carbonato, alquil 3,4-dimetoxibencil carbonato, alquil o-nitrobencil carbonato, alquil p-nitrobencil carbonato, tiocarbonato de alquil-S-bencilo, carbonato de 4-etoxi-1-naftilo, ditiocarbonato de metilo, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, o-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiommetoxi)etilo, 4-(metiltiommetoxi)butirato, 2-(metiltiommetoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, o-(metoxicarbonil)benzoato, α -naftoato, nitrato, alquil N,N,N,N'-tetrametilfosforodiamidato, alquil N-fenilcarbamato, borato, dimetilfosfinotioilo, alquil 2,4-dinitrofenilsulfonato, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bilsulfonato y tosilato (Ts).

Para la protección de 1,2- o 1,3-dioles, los ejemplos no limitativos de grupos protectores ejemplares incluyen metilenacetato, etilidenacetato, 1-t-butiletilidenacetato, 1-feniletilidenacetato, (4-metoxifenil)etilidenacetato, 2,2,2-tricloroetilidenacetato, acetonida, ciclopentilidenacetato, ciclohexilidenacetato, cicloheptilidenacetato, bencilidenacetato, p-metoxibencilidenacetato, 2,4-dimetoxibencilidenacetato, 3,4-dimetoxibencilidenacetato, 2-nitrobencilidenacetato, metoximetilenacetato, etoximetilenacetato, orto éster de dimetoximetileno, orto éster de 1-metoxietilideno, orto éster de 1-etoxietilidina, orto éster de 1,2-dimetoxietilideno, orto éster de α -metoxibencilideno, derivado de 1-(N,N-dimetilamino) etilideno, derivado de α -(N,N'-dimetilamino)bencilideno, orto éster de 2-oxaciclopentilideno, grupo di-t-butilsilileno (DTBS), derivado de 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno) (TIPDS), derivado de tetra-t-butoxidisiloxano 1,3-diilideno (TBDS), carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos, boronato de etilo y boronato de fenilo.

Ejemplos no limitativos de grupos protectores de amino ilustrativos incluyen carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, carbamato de 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, 2,7-di-t-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrohidroxioxantil)]metilcarbamato (DBD-Tmoc), 4-metoxifenacil carbamato (Phenoc), carbamato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2-feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-t-BOC), carbamato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo (TCBOC), carbamato de 1-metil-1-(4-bifenil)etilo (Bpoc), carbamato de 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletilo (t-Bumeoc), 2-(2'- y 4'-piridil) etil carbamato (Pyoc), 2-(N,N-diciclohexilcarboxamido)etil carbamato, t-butil carbamato (BOC), 1-adamantil carbamato (Adoc), vinil carbamato (Voc), alil carbamato (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocimiamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de N-hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de p-metoxibencilo (Moz), carbamato de p-nitrobencilo, carbamato de p-bromobencilo, carbamato de p-clorobencilo, 2,4-diclorobencilo carbamato, 4-metilsulfonilbencil carbamato (MsZ), 9-antrilmetil carbamato, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2-metiltoetilo, carbamato de 2-metilsulfoniletilo, 2-(p-toluenosulfonil) etil carbamato, [2-(1,3-ditilanil)]metil carbamato (Dmoc), 4-metiltiofenil carbamato (Mtpc), 2,4-dimetiltiofenil carbamato (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc),

5 carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de m-cloro-p-aciloxibencilo, carbamato de p-(dihidroxiborilo) bencilo, 5-bencisoxazolimetil carbamato, carbamato de 2-(trifluorometil)-6-cromonimetilo (Tcroc), carbamato de m-nitrofenilo, 3,5-dimetoxibencil carbamato, carbamato de o-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, fenil(o-nitrofenil)metil carbamato, derivado de fenotiazinil-(10)-carbonilo, derivado de N'-p-toluensulfonilaminocarbonilo, derivado de N'-fenilaminotiocarbonilo, carbamato de t-amilo, tiocarbamato de S-bencilo, carbamato de p-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, ciclohexil carbamato, ciclopentil carbamato, ciclopropilmetil carbamato, p-deciloxibencil carbamato, 2,2-dimetoxicarbonilvinil carbamato, carbamato de o-(N,N-dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de 1,1-dimetil-3-(N,N-dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1-dimetilpropinilo, carbamato de di(2-piridil)metilo, carbamato de 2-furanilmetilo, carbamato de 2-yodoetilo, carbamato de isoborinilo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato de p-(p'-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1-metilciclobutilo, carbamato de 1-metilciclohexilo, carbamato de 1-metil-1-ciclopropilmetilo, carbamato de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, 1-metil-1-(p-fenilazofenil)etil carbamato, 1-metil-1-feniletil carbamato, carbamato de 1-metil-1-(4-piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de p-(fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6-tri-t-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo, carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de N-benzoilfenilalanilo, benzamida, p-fenilbenzamida, o-nitrofenilacetamida, o-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (N'-ditiobenciloxicarbonilamino)acetamida, 3-(p-hidroxifenil)propanamida, 3-(o-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(o-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(o-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, o-nitrocinaamida, derivado de N-acetilmetionina, o-nitrobenzamida, o-(benzoiloximetil)benzamida, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, N-ftalimida, N-ditiasuccinimida (Dts), N-2,3-difenilmaleimida, N-2,5-dimetilpirrol, aducto de N-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituido, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituido, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituido, N-metilamina, N-alilamina, N-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), N-3-acetoxipropilamina, N-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolidin-3-il) amina, sales de amonio cuaternario, N-bencilamina, N-di(4-metoxifenil)metilamina, N-5-dibenzosuberilamina, N-trifenilmetilamina (Tr), N-[(4-metoxifenil) difenilmetil] amina (MMTr), N-9-fenilfluorenilamina (PhF), N-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilamina, N-ferrocenilmetilamina (Fcm), N-2-picolilamina N'-óxido, N-1,1-dimetiltiometilamina, N-bencilidenamina, N-p-metoxibencilidenamina, N-difenilmetilamina, N-[(2-piridil)mesitil]metilamina, N-(N',N'-dimetilaminometil)amina, N,N'-isopropilidenodiamina, N-p-nitrobencilidenamina, N-salicilidenamina, N-5-clorosalicilidenamina, N-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilamina, N-ciclohexilidenamina, N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de N-borano, derivado de ácido N-difenilborínico, N-[fenil(pentacarbonilcromo o tungsteno)carbonil]amina, quelato de N-cobre, quelato de N-zinc, N-nitroamina, N-nitrosoamina, N-óxido de amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetilfosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamido de dibencilo, fosforamido de difenilo, bencenosulfonamida, o nitrobencenosulfonamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfonamida, pentaclorobencenosulfonamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfonamida, trifenilmetilsulfonamida, 3-nitropiridinsulfonamida (Npys), p-toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilmecroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4', 8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMB S), bilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida, y fenacilsulfonamida.

El término "sustituido", ya sea usado solo o precedido por el término "opcionalmente", y los sustituyentes contenidos en las fórmulas de la presente descripción, se refieren al reemplazo de radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente específico. Cuando más de una posición en una estructura dada se sustituye con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. El término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los heteroátomos pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en este documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Además, esta invención no pretende limitarse de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. Las combinaciones de sustituyentes y variables son aquellas que resultan en la formación de compuestos estables.

El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que poseen una estabilidad suficiente para permitir la fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para ser detectado y preferiblemente durante un período de tiempo suficiente para que sean útiles para los propósitos detallados en este documento.

El término "alifático" incluye tanto hidrocarburos alifáticos, saturados como insaturados, de cadena lineal (es decir, no ramificados), ramificados, acíclicos, cíclicos o policíclicos, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales. El término "alifático" incluye, entre otros, restos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno y cicloalquino.

El término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales, ramificados y cíclicos. Una convención análoga se aplica a otros términos genéricos como "alqueno" o "alquino". Los términos "alquilo", "alqueno" y "alquino" abarcan tanto los grupos sustituidos como los no sustituidos. Los grupos alquilo, alqueno y alquino empleados en la presente

descripción contienen 1-20 átomos de carbono alifáticos. "Alquilo inferior" se usa para indicar aquellos grupos alquilo (cíclicos, acíclicos, sustituidos, no sustituidos, ramificados o no ramificados) que tiene 1-6 átomos de carbono.

Los grupos alifáticos ejemplares incluyen, entre otros, restos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, -CH₂-ciclopropilo, vinilo, alilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, ciclobutilo, -CH₂-ciclobutilo, n-pentilo, sec-pentilo, isopentilo, terc-pentilo, ciclopentilo, -CH₂-ciclopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, ciclohexilo y -CH₂-ciclohexilo que tienen uno o más sustituyentes. Los grupos alquenoil ejemplares incluyen, entre otros, etenilo, propenilo, butenilo y 1-metil-2-buten-1-ilo. Los grupos alquinilo representativos incluyen, entre otros, etinilo, 2-propinil(propargilo) y 1-propinilo.

El término "alquilo" se refiere a radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada derivados de un resto hidrocarburo que contiene entre uno y veinte átomos de carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. Los radicales alquilo ejemplares incluyen, entre otros, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, y dodecilo.

El término "alquenoil" se refiere a un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarburo que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. Los grupos alquenoil ejemplares incluyen, entre otros, etenilo, propenilo, butenilo y 1-metil-2-buten-1-ilo.

El término "alquinilo" se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, entre otros, etinilo, 2-propinil(propargilo) y 1-propinilo, y similares.

Los términos "alcoxi" y "tioalquilo" se refieren a un grupo alquilo, como se definió previamente, unido a la molécula parental a través de un átomo de oxígeno o a través de un átomo de azufre, respectivamente. En ciertas realizaciones, los grupos alquilo, alquenoil y alquinilo contienen 1-20 átomos de carbono alifáticos. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, entre otros, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, terc-butoxi, neopentoxi y n-hexoxi. Los grupos tioalquilo ejemplares incluyen, entre otros, metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio y n-butiltio.

El término "alquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura -NHR', en donde R' es alifático, como se define anteriormente, que contiene 1-20 átomos de carbono alifáticos. Los ejemplos de grupos alquilamino incluyen, entre otros, metilamino, etilamino, n-propilamino, isopropilamino, ciclopropilamino, n-butilamino, terc-butilamino, neopentilamino, n-pentilamino, hexilamino y ciclohexilamino.

El término "dialquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura -NRR₁, en donde R y R₁ son cada uno un grupo alifático, como se define en el presente documento, que contiene 1-20 átomos de carbono alifáticos. R y R₁ son iguales o diferentes o están unidos para formar una estructura cíclica aromática o no aromática. Los grupos dialquilamino ejemplares incluyen, entre otros, dimetilamino, metil etilamino, dietilamino, metilpropilamino, di(n-propil)amino, di(isopropil)amino, di(ciclopropil)amino, di(n-butil)amino, di(terc-butil)amino, di(neopentil)amino, di(n-pentil)amino, di(hexil)amino y di(ciclohexil)amino. Los ejemplos de grupos diaminoalquilo cíclicos incluyen, entre otros, aziridinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, pirrolilo, imidazolilo, 1,3,4-trianolilo y tetrazolilo.

La expresión "ácido carboxílico" se refiere a un compuesto que comprende un grupo de fórmula -COOH.

Algunos ejemplos de sustituyentes de los restos alifáticos descritos anteriormente y otros de los compuestos de la invención incluyen, entre otros, grupos alifáticos, heteroalifáticos, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alcoxi, ariloxi, heteroalcoxi, heteroariloxi, alquiltio, ariltio, heteroalquiltio, heteroariltio, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -NO₂, -CN, -CF₃, -CH₂CF₃, -CHCl₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -C(O)R_x, -CO₂(R_x), -CON(R_x)₂, -OC(O)R_x, -OCO₂R_x, -OCON(R_x)₂, -N(R_x)₂, -S(O)₂R_x y -NR_x(CO)R_x, en el que cada aparición de R_x incluye independientemente, entre otros, un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y en este documento están sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, son cíclicos o acíclicos, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en este documento está sustituido o no sustituido.

Los términos "arilo" y "heteroarilo" se refieren a restos insaturados mono- o policíclicos, heterocíclicos, policíclicos y poli-heterocíclicos estables que tienen 3-14 átomos de carbono, cada uno de los cuales está sustituido o no sustituido. Los sustituyentes incluyen, entre otros, cualquiera de los sustituyentes citados anteriormente para restos alifáticos. El término "arilo" incluye sistemas de anillos carbocíclicos mono o bicíclicos que tienen uno o dos anillos aromáticos que incluyen, entre otros, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, e indanilo. El término "heteroarilo" incluye radicales aromáticos cíclicos que tienen de cinco a diez átomos del anillo, de los cuales 1-3 átomos del anillo se seleccionan de S, O y N, y los átomos del anillo restantes son carbono, uniéndose el radical al resto de la molécula a través de cualquiera de los átomos del anillo, como por ejemplo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo o isoquinolinilo.

Los grupos arilo y heteroarilo están sin sustituir o sustituidos, en donde la sustitución incluye el reemplazo de uno, dos, tres o más de los átomos de hidrógeno en los mismos, independientemente, con uno o más de los siguientes restos que incluyen, entre otros, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alcoxi, ariloxi, heteroalcoxi, heteroariloxi, alquiltio, ariltio, heteroalquiltio, -F, Cl, -Br, -I, -OH, -NO₂, -CN, -CF₃, -CH₂CF₃, -CHCl₂, -

CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -C(O)R_x, -CO₂(R_x), -CON(R_x)₂, -OC(O)R_x, -OCO₂R_x, -OCON(R_x)₂, -N(R_x)₂, -S(O)₂R_x y -NR_x(CO)R_x, en donde cada aparición de R_x incluye independientemente, entre otros, a un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y que no están sustituidos, no están sustituidos, ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, en este documento, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente, y en el presente documento, está sustituido o no sustituido.

El término "cicloalquilo" se refiere específicamente a grupos que tienen de tres a siete, preferiblemente de tres a diez átomos de carbono. Los cicloalquilos adecuados incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con sustituyentes, incluidos, entre otros, grupos alifáticos, heteroalifáticos, arílicos, heteroarílicos, arilalquilo, heteroarilalquilo, alcoxi, ariloxi, heteroalcoxi, heteroariloxi, alquiltio, ariltio, heteroalquiltio, heteroariltio, -F, -Cl -Br, -I, -OH, -NO₂, -CN, -CF₃, -CH₂CF₃, -CHCl₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -C(O)R_x, -CO₂(R_x), -CON(R_x)₂, -OC(O)R_x, -OCO₂R_x, -OCON(R_x)₂, -N(R_x)₂, -S(O)₂R_x y -NR_x(CO)R_x, en donde cada aparición de R_x incluye independientemente, entre otros, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y está sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, es cíclico o acíclico, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en este documento está sustituido o no sustituido en este documento.

El término "heteroalifático" se refiere a restos alifáticos que contienen uno o más átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, por ejemplo, en lugar de átomos de carbono. Los restos heteroalifáticos son ramificados, no ramificados, cíclicos o acíclicos e incluyen heterociclos saturados e insaturados, tales como morfolino, pirrolidinilo, etc. Los restos heteroalifáticos están sustituidos por la sustitución independiente de uno o más de los átomos de hidrógeno sobre ellos con uno o más restos que incluyen, entre otros, un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alcoxi, ariloxi, heteroalcoxi, heteroariloxi, alquiltio, ariltio, heteroalquiltio, heteroariltio, -F, -Cl -Br, -I, -OH, NO₂, -CN, -CF₃, -CH₂CF₃, -CHCl₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -C(O)R_x, -CO₂(R_x), -CON(R_x)₂, -OC(O)R_x, -OCO₂R_x, -OCON(R_x)₂, -N(R_x)₂, -S(O)₂R_x y -NR_x(CO)R_x, donde cada aparición de R_x incluye independientemente, entre otros, un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y en este documento está sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, es cíclico o acíclico, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en este documento está sustituido o no sustituido.

Los términos "halo" y "halógeno" se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "haloalquilo" denota un grupo alquilo, como se define anteriormente, que tiene uno, dos o tres átomos de halógeno unidos al mismo y se ejemplifica mediante grupos tales como clorometilo, bromoetilo y trifluorometilo.

El término "heterocicloalquilo" o "heterociclo" se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 ó 7 miembros o un grupo policíclico, que incluye, entre otros, un grupo bi- o tri-cíclico, que comprende anillos de seis miembros fusionados que tienen entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno, en donde (i) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 1 enlaces dobles y cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 enlaces dobles, (ii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, (iii) el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, y (iv) cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores se fusiona a un anillo de benceno. Los heterociclos representativos incluyen, entre otros, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo y tetrahidrolurínilo. El término "sustituido", en un grupo heterocicloalquilo o heterociclo "sustituido", se refiere a un grupo heterocicloalquilo o heterociclo, como se definió anteriormente, sustituido por el reemplazo independiente de uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno que incluye, entre otros, un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alcoxi, ariloxi, heteroalcoxi, heteroariloxi, alquiltio, ariltio, heteroalquiltio, heteroariltio, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, NO₂, -CN, -CF₃, -CH₂CF₃, -CHCl₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -C(O)R_x, -CO₂(R_x), -CON(R_x)₂, -OC(O)R_x, -OCO₂R_x, -OCON(R_x)₂, -N(R_x)₂, -S(O)₂R_x y -NR_x(CO)R_x, donde cada aparición de R_x incluye independientemente, entre otros, un grupo alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y en el presente documento está sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, es cíclico o acíclico, y en donde cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento está sustituido o no sustituido.

Los grupos heterocíclicos y aromáticos no limitativos a modo de ejemplo incluyen 3-metil-4-(3-metilfenil)piperazina, 3-metilpiperidina, 4-(bis-(4-fluorofenil)metil)piperazina, 4-(difenilmetil)piperazina, 4-(etoxicarbonil)piperazina, 4-(etoxicarbonilmetil)piperazina, A-(fenilmetil)piperazina, 4-(1-feniletíl)piperazina, 4-(1,1-dimetiletóxicarbonil)piperazina, 4-(2-(bis-(2-propenil)amino)etil)piperazina, 4-(2-(dietilamino)etil)piperazina, 4-(2-clorofenil)piperazina, 4-(2-cianofenil)piperazina, 4-(2-etoxifenil)piperazina, 4-(2-etilfenil)piperazina, 4-(2-fluorofenil)piperazina, 4-(2-hidroxietil)piperazina, 4-(2-metoxietil)piperazina, 4-(2-metoxifenil)piperazina, 4-(2-metilfenil)piperazina, 4-(2-metiltofenil)piperazina, 4-(2-nitrofenil)piperazina, 4-(2-nitrofenil)piperazina, 4-(2-feniletíl)piperazina, A-(2-piridil)piperazina, 4-(2-pirimidinil)piperazina, 4-(2,3-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,4-difluorofenil)piperazina, 4-(2,4-dimetoxifenil)piperazina, 4-(2,4-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,5-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,6-dimetilfenil)piperazina, 4-

(3-clorofenil)piperazina, 4-(3-metilfenil)piperazina, 4-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 4-(3,4-diclorofenil)piperazina, 4-(3,4-dimetoxifenil)piperazina, 4-(3,4-dimetilfenil)piperazina, 4-(3,4-metilendioxifenil)piperazina, 4-(3,4,5-trimetoxifenil)piperazina, 4-(3,5-diclorofenil)piperazina, 4-(3,5-dimetoxifenil)piperazina, 4-(4-(fenilmetoxi)fenil)piperazina, 4-(4-(3,1-dimetiletil)fenilmetil)piperazina, 4-(4-cloro-3-trifluorometilfenil)piperazina, 4-(4-clorofenil)-3-metilpiperazina, 4-(4-clorofenil)piperazina, 4-(4-clorofenil)piperazina, 4-(4-clorofenilmetil)piperazina, 4-(4-fluorofenil)piperazina, 4-(4-metoxifenil)piperazina, 4-(4-metilfenil)piperazina, 4-(4-nitrofenil)piperazina, 4-(4-trifluorometilfenil)piperazina, 4-ciclohexilpiperazina, 4-etilpiperazina, 4-hidroxi-4-(4-clorofenil)metilpiperidina, 4-hidroxi-4-fenilpiperidina, 4-hidroxipirrolidina, 4-metilpiperazina, 4-fenilpiperazina, 4-piperidinilpiperazina, 4-(2-furanil)carbonil)piperazina, 4-((1,3-dioxolan-5-il)metil)piperazina, 6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-metilquinolina, 1,4-diazacilcloheptano, 2,3-dihidroindolilo, 3,3-dimetilpiperidina, 4,4-etilendioxipiperidina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, azaciclooctano, decahidroquinolina, piperazina, piperidina, pirrolidina, tiomorfolina y triol.

El término "carbociclo" se refiere a un anillo aromático o no aromático en el que cada átomo del anillo es un átomo de carbono.

La expresión "seleccionado independientemente" se usa para indicar que los grupos son idénticos o diferentes.

15 El término "marcado" pretende significar que un compuesto tiene al menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto mediante el uso de un marcador de isótopos radioactivos o pesados, o un marcado inmunitario tal como un anticuerpo o antígeno o un marcador derivado de un tinte coloreado, luminiscente, fosforescente o fluorescente.

20 El marcado de fotoafinidad que emplea, por ejemplo, o-, m- y p-azidobenzoilos, sustituidos con uno o más restos halógenos, que incluye, entre otros, ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico, se utiliza para la elucidación directa de las interacciones intermoleculares en sistemas biológicos.

El término "animal" puede referirse a seres humanos así como a animales no humanos, que incluyen, por ejemplo, mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo), aves, reptiles, anfibios y peces.

25 El término "célula" generalmente se refiere a células eucariotas de cualquier tipo y de cualquier fuente. Los tipos de células eucariotas incluyen células epiteliales, fibroblásticas, neuronales, hematopoyéticas y similares de células primarias, células tumorales o líneas celulares inmortalizadas. Las fuentes de tales células incluyen cualquier animal tal como un ser humano, canino, ratón, hámster, gato, bovino, porcino, mono, oveja, pez, insecto, hongo, y cualquier planta, incluyendo plantas de cultivo, algas, plantas ornamentales y árboles.

30 "Administración" se utiliza para denotar un proceso mediante el cual un compuesto deseado se transfiere a una célula diana de tal manera que el compuesto deseado finalmente se ubica dentro de la célula diana o en la membrana de la célula diana, o sobre ésta. En muchos usos de los compuestos de la descripción, el compuesto deseado no se capta fácilmente por la célula diana y se administra a través de agregados de lípidos o complejos de transfección, un medio para suministrar el compuesto deseado al compartimiento celular apropiado dentro de una célula. En ciertos usos, especialmente en condiciones in vivo, es preferible la administración a un tipo específico de célula diana y ésta puede ser facilitada por los compuestos de la invención.

"Medicamento" se refiere a cualquier tipo de agente terapéutico o profiláctico, distinto de los alimentos, que se utiliza en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de enfermedades en el hombre o los animales.

40 "Kit" se refiere a kits de transfección o de expresión de proteínas que incluyen el compuesto de la presente invención. Dichos kits pueden comprender un medio de transporte que esté compartimentado para recibir en confinamiento cercano uno o más medios recipientes tales como viales, tubos de ensayo y similares. Cada uno de dichos medios contenedores comprende componentes o una mezcla de componentes necesarios para realizar la transfección. Dichos kits pueden incluir uno o más componentes seleccionados de ácidos nucleicos (preferiblemente uno o más vectores), células, el compuesto de la presente invención, compuestos formadores de agregados lipídicos, potenciadores de la transfección, sustancias biológicamente activas, etc.

La expresión "asociado con", cuando se utiliza en el contexto de las interacciones moleculares, se refiere a dos entidades vinculadas por una interacción covalente o no covalente directa o indirecta, como el enlace de hidrógeno, las interacciones de van der Waals, las interacciones hidrofóbicas, las interacciones magnéticas y las interacciones electrostáticas, etc.

50 El término "biocompatible" se refiere a compuestos que no son tóxicos para las células. Los compuestos son biocompatibles si su adición a las células in vitro da como resultado una muerte celular menor o igual al 20%, y su administración in vivo no induce inflamación u otros efectos adversos similares.

55 El término "biodegradable" se refiere a compuestos que, cuando se introducen en las células, se descomponen en componentes que las células pueden reutilizar o eliminar sin un efecto tóxico significativo en las células (es decir, menos de aproximadamente el 20% de las células se destruyen cuando los componentes se agregan a las células in vitro). Los componentes no inducen inflamación u otros efectos adversos in vivo. Las reacciones químicas en las que

se basan para descomponer los compuestos biodegradables normalmente no se catalizan. La expresión "cantidad efectiva", como se usa en este documento con respecto a un agente activo, se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. La cantidad efectiva de un agente o dispositivo puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente a administrar, la composición de la matriz de encapsulación, el tejido objetivo, etc. La administración de una "cantidad efectiva de una molécula" es la administración de la molécula en una célula en cantidades suficientes para que la molécula provoque una respuesta biológica, por ejemplo, modulando la expresión de uno o más genes en la célula. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva de una molécula se administra a una célula de tal manera que puede obtenerse una mejora o alivio en una enfermedad, afección o trastorno relacionado con la célula. La administración de una "cantidad efectiva de ARNip" o una "cantidad efectiva o ARNi" es la administración de ARNi u otro ARNi en una célula en cantidades suficientes para causar una reducción en la expresión del gen diana en la célula.

Los términos "agente biológicamente activo", "agentes bioactivos" o similares, generalmente se refieren a una composición, complejo, compuesto o molécula que tiene un efecto biológico o que modifica, causa, promueve, mejora, bloquea o reduce un efecto biológico, o que aumenta o limita su producción o actividad, reacciona y/o se une a una segunda molécula que tiene un efecto biológico. La segunda molécula puede, pero no es necesario, ser una molécula endógena (por ejemplo, una molécula, como una proteína o un ácido nucleico, normalmente presente en la célula diana). Un efecto biológico puede ser, entre otros, uno que estimule o cause una respuesta inmunorreactiva; uno que provoque un proceso biológico en una célula, tejido u organismo (por ejemplo, en un animal); uno que provoque un proceso biológico en un patógeno o parásito; uno que genere o haga que se genere una señal detectable; uno que regule la expresión de una proteína o polipéptido; uno que detenga o inhiba la expresión de una proteína o polipéptido; o uno que cause o mejore la expresión de una proteína o polipéptido. Las composiciones, los complejos, los compuestos o las moléculas biológicamente activas se pueden usar en métodos y composiciones de investigación, agentes terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico, y, en general, actúan para activar algún proceso.

La expresión "lípidos catiónicos" se refiere a cualquier lípido catiónico que se pueda usar para la transfección y que, en condiciones fisiológicas, posea, al menos, una carga positiva. Si bien debe entenderse que algunos de los agentes de transfección que contienen aminas de la presente descripción también existen como cationes en condiciones fisiológicas, la expresión también se extiende sin limitación a cualquier lípido coadyuvante catiónico que pueda usarse para preparar conjuntamente la fórmula de complejos de transfección como se describe en el presente documento. Otros lípidos catiónicos distintos de los nuevos agentes de transfección que contienen amina descritos en este documento pueden incluir, entre otros, DOSPA, DOTMA, DMRIE, DOT AP, DOGS y TMTPS, así como cualquiera de los lípidos catiónicos descritos en este documento como "lípidos ayudantes".

"Célula diana" o "tejido diana" se refiere a cualquier célula o tejido al que se administra un compuesto deseado, utilizando un agregado de lípidos o un complejo de transfección como vehículo para el compuesto deseado.

La transfección se usa en este documento para indicar la administración de cualquier ácido nucleico, proteína u otra macromolécula a una célula o tejido diana in vitro o in vivo (es decir, en un animal, una planta o un ser humano), de modo que el ácido nucleico, la proteína u otra macromolécula se exprese, confiera un fenotipo, o tenga una función biológica en la célula.

La expresión "ácido nucleico expresable" incluye tanto ADN como ARN sin tener en cuenta el peso molecular, y el término "expresión" significa cualquier manifestación de la presencia funcional del ácido nucleico dentro de la célula, incluyendo, sin limitación, tanto la expresión transitoria como la expresión estable.

La expresión "complejo de transfección", como se usa en el presente documento, generalmente, se refiere a una composición formulada para la administración de un agente biológicamente activo, como un ácido nucleico, una proteína, una macromolécula o similares, a una célula o a un tejido in vivo o in vitro. Los complejos de transfección, como se usan, en este documento pueden incluir el compuesto de transfección que contiene amina en combinación con el compuesto biológicamente activo que se administrará, opcionalmente en combinación con uno o más lípidos coadyuvantes, uno o más lípidos pegilados, uno o más restos de reconocimiento, además del agente bioactivo que se va a administrar. Para los fines descritos en el presente documento, la expresión "complejo de transfección" puede considerarse como un lipoplex o un agregado de lípidos en contacto con un agente bioactivo. Por lo tanto, en algunos casos, en la siguiente descripción, se pueden usar términos como lipoplex, agregado lipídico y similares para hacer referencia a un complejo de transfección que carece de uno o más agentes bioactivos o "carga útil".

La expresión "lípidos coadyuvantes", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a un lípido que es adecuado para usar en la preparación y formación de complejos de transfección descritos en el presente documento. Los lípidos coadyuvantes adecuados pueden incluir, entre otros, a colesterol, derivados del colesterol, esteroides, incluidos los fitoesteroides, zooesteroides y hopanoides, o cualquiera de los lípidos neutros o catiónicos que se sabe que permiten o facilitan la introducción de moléculas bioactivas exógenas en el interior de una célula o de un tejido. En algunas realizaciones, se puede usar más de un lípido coadyuvante en la formulación de los complejos de transfección descritos en el presente documento. Los lípidos neutros o catiónicos ejemplares, aunque no limitativos, contemplados para uso en la preparación de los complejos de transfección descritos en este documento pueden incluir uno o más lípidos seleccionados de entre los siguientes: BMOP (N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3)-

bis(9-octadeceniloxi)-propano bromuro mínimo), DPES (dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida), DSPC, CTAB:DOPE (formulación de bromuro de cetiltrimetilamonio (CATB) y DOPE), POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DMG, DMAP (4-dimetilaminopiridina), DMPE (Dimiristoilfosfatidiletanolamina), DOMG, DMA, DOPC (Dioleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPEPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DODAC (cloruro de dioleoil-dimetilamonio), DOSPER (1,3-Di-oleoil-2-(6-carboxiespermil)-propilamida), DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DDAB (bromuro de didocil metilamonio), DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetil-amonio), DOTAP·Cl, DC-col (3,β-N,N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol), DOSPA (trifluoroacetato de 2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetil-amonio), DC-6-14 (cloruro de O,O'-Ditetradecanoil-N-(alfatrimetilaminoacetil)dietanolamina), DCPE (dicapropilfosfatidiletanolamina), DLRIE (bromuro de dilauril oxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), etil-PC, DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoil-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-N,N-di-metil-1-propanamino), DOGS (dioctadecilamidoglicil carboxiespermina), DMRIE (bromuro de N-[1-(2,3-dimiristilo)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amonio), DOEPC (dioleoilfosfocolina), DOHME (yoduro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N-[1-(2-hidroxietil)]-N,N-dimetilamonio), GAP-DLRIE:DOPE (bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodecilo)xi)-1-propanimino/dioleoilfosfatidiletanolamina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosforac-(3-lisil(1-glicerol))-Cl], N-lauroilsarcosina, (R)-(+)-limonena, lecitinas (y derivados de los mismos); fosfatidiletanolamina (y derivados de la misma); fosfatidiletanolaminas, dioleoilfosfatidiletanolamina), DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina), DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolamina), dipalmitoilfosfatidiletanolamina) y distearoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilcolina; fosfatidilcolinas, DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidilglicerol; lípidos catiónicos a base de piperazina, fosfatidilglicerol, tales como DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) y diestearoilfosfatidilglicerol; fosfatidilserina (y sus derivados); fosfatidilserinas, tales como dioleoil- o dipalmitoilfosfatidilserina; sales de amonio dicuaternario tales como N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina (TmedEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (PropEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina (HexEce), y sus correspondientes análogos saturados de N,N'-dicetilo (TmedAce, PropAce y HexAce), difosfatidilglicerol; ésteres de ácidos grasos; lípidos de transfección monocatiónicos, tales como 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-xilitol; 1-desoxi-1-[metil(ditetradecil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[metil(dioctadecil)amonio]-D-arabinitol, ésteres de glicerol; esfingolípidos; cardiolipina; cerebrósidos; y ceramidas; y mezclas de los mismos. Los lípidos neutros también incluyen colesterol y otros 3βOH-esterol, así como sus derivados o fosfatidilcolina. También se contempla cualquier mezcla de combinación de los lípidos coadyuvantes enumerados anteriormente. Los siguientes documentos de patente, solicitudes de patente o referencias se mencionan en particular para la descripción de los agentes de transfección que contienen lípidos auxiliares catiónicos y neutros: patentes de EE. UU. 6.075.012; 6.020.202; 5.578.475; 5.736.392; 6.051.429; 6.376.248; 5.334.761; 5.316.948; 5.674.908; 5.834.439; 6.110.916; 6.399.663; 6.716.882; 5.627.159; PCT/US/2004/000430, publicado como el documento WO 04063342 A2; PCT/US/9926825, publicado como el documento WO 0027795 A1; PCT/US/04016406, publicado como el documento WO 04105697; y PCT/US2006/019356, publicado como el documento WO 07130073 A2.

La expresión "lípidos pegilados", como se usa en este documento, generalmente se refiere a un lípido que está conjugado covalentemente a uno o más restos de polietilenglicol. Los lípidos pegilados para las realizaciones de lipoplex en el presente documento incluyen lípidos pegilados basados en fosfatidiletanolamina (PE) como, por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-MW], donde MW se refiere al MW promedio del resto de polietilenglicol. Dichos lípidos de dimiristoil-PEG-PE se designan comúnmente como PEG (MW) PE 14:0. El MW promedio del resto de polietilenglicol puede ser 25, 350, 550, 750, 1000, 2000, 3000, 5000, 6000, 8000 ó 12000, por ejemplo. Las cadenas de ácidos grasos de los lípidos pegilados basados en fosfatidiletanolamina pueden incluir, por ejemplo, un grupo 1,2-dioleoil tal como para PEG (MW) PE 18:1, un grupo 1,2-dipalmitoil tal como para PEG (MW) PE 16:0, o un grupo 1,2-diestearoil, tal como para PEG (MW) PE 18:0. Los lípidos pegilados a base de fosfatidiletanolamina (PE) incluyen, por ejemplo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[MOD(polietilenglicol)-MW], también denominado DSPE-MOD PEG (MW), donde MOD se refiere a un resto funcional tal como un resto amina, biotina, ácido carboxílico, folato, maleimida, PDP o carboxifluoresceína. El MW puede ser 2000 ó 5000, por ejemplo. Los lípidos pegilados para las realizaciones descritas en el presente documento también incluyen lípidos pegilados a base de ceramidas como, por ejemplo, N-octanoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)MW]}, designado C8 PEG (MW) ceramida, donde MW es 750, 2000 ó 5000, por ejemplo. Alternativamente, el resto de ácido graso puede tener un grupo N-palmitoil (C16) tal como para ceramida C16 PEG (MW).

Una "composición liposómica" generalmente es una formulación que incluye uno o más liposomas. En algunos casos, la expresión "composición liposómica" se puede usar indistintamente con la expresión "complejo de transfección". Estas formulaciones son típicamente coloides, pero también pueden ser formulaciones secas. Un liposoma es una partícula coloidal vesicular compuesta por moléculas anfífilas autoensambladas. Las composiciones liposómicas de la presente invención incluyen típicamente al menos uno o más lípidos catiónicos solos u, opcionalmente, en combinación con uno o más lípidos coadyuvantes (es decir, un lípido neutro, un colesterol o un derivado del colesterol, un lípido catiónico) que se procesan utilizando métodos estándar para formar una suspensión coloide que contiene liposomas. Las composiciones liposómicas de la presente invención son aquellas que contienen uno o más lípidos de transfección que contienen amina, uno o más lípidos coadyuvantes,

uno o más lípidos pegilados, opcionalmente, en combinación con uno o más lípidos neutros y/o auxiliares o grupos de tratamiento dirigidos que se tratan por cualquiera de los métodos estándar conocidos en la técnica sin limitación para formar liposomas. Las composiciones liposómicas se pueden distinguir entre sí por medidas de tamaño de partícula. Diferentes composiciones exhibirán diferencias en el tamaño de las partículas y la uniformidad del tamaño de las partículas, por ejemplo, el tamaño promedio de las partículas y la polidispersidad. Diferentes composiciones exhibirán diferencias en la extensión de la composición que está en forma de liposomas. En algunas realizaciones no limitantes, las composiciones liposómicas exhibirán un tamaño de partícula en el intervalo de 120 nm y 800 nm y exhibirán una polidispersidad generalmente más baja. El tamaño de partícula de Lipoplex (con ARNip u otra carga) puede variar de aproximadamente 40 nm a 135 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de partícula de lipoplex es de 50 nm a 120 nm, de 50 nm a 100 nm, de 60 nm a 90 nm, de 70 nm a 90 nm, o de aproximadamente 85 nm.

La expresión "agregado lipídico" o "lipoplex" es un término genérico que incluye liposomas de todos los tipos, tanto unilamelares como multilamelares, así como también vesículas, micelas y más agregados amorfos. Un agregado lipídico catiónico es un agregado lipídico que comprende una combinación de uno o más compuestos catiónicos, opcionalmente en combinación con lípidos no catiónicos (incluidos los lípidos neutros), de modo que el agregado lipídico tenga una carga neta positiva. El compuesto de transfección que contiene amina de la presente invención puede formar un agregado lipídico, opcionalmente con un lípido coadyuvante y, opcionalmente, con uno o más lípidos pegilados y/o uno o más restos dirigidos, que pueden formar un complejo de agente lipídico cuando se ponen en contacto con un agente bioactivo adecuado. Las expresiones "agregado lipídico" o "lipoplex" se usan generalmente en el presente documento para referirse a un complejo de transfección "desnudo", es decir, un complejo de transfección que generalmente carece de una carga útil de agente bioactivo para ser administrado a una célula o a un tejido *in vitro* o *in vivo*.

La expresión "agente lipídico bioactivo" generalmente se refiere a la asociación no covalente entre un lípido o agregado lipídico y un agente bioactivo, tal como un ácido nucleico, un polipéptido y similares.

Como se usa en este documento, "ácido nucleico" y sus equivalentes gramaticales incluirán la gama completa de polímeros de nucleótidos de cadena sencilla o doble e incluyen ácidos nucleicos (incluidas las moléculas híbridas de ADN, ARN y ADN-ARN) que se aíslan de una fuente natural; que se preparan *in vitro*, utilizando técnicas como la amplificación por PCR o la síntesis química; que se preparan *in vivo*, por ejemplo, a través de tecnología de ADN recombinante; o que se preparan u obtienen por cualquier método conocido. Un ácido nucleico se refiere típicamente a una molécula polinucleotídica compuesta por una cadena lineal de dos o más nucleótidos (desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos) o variantes, derivados y/o análogos de los mismos. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que, a su vez, dependen de las últimas condiciones de uso, como es bien conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos de la presente descripción incluyen, sin limitación, cebadores, sondas, oligonucleótidos, vectores, constructos, plásmidos, genes, transgenes, ADN genómico, ADNc, ARN, ARNi, ARNhc, stARN, productos de PCR, fragmentos de restricción, oligonucleótidos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" incluye cualquier unidad monomérica de ADN o ARN que contiene un resto de azúcar (pentosa), un fosfato y una base heterocíclica nitrogenada y también puede incluir formas de mono-, di- y trifosfato de dichos nucleótidos. La base generalmente está unida al resto de azúcar a través del carbono glicosídico (en el carbono 1' de la pentosa) y esa combinación de base y azúcar se denomina "nucleósido". La base caracteriza el nucleótido con las cuatro bases habituales de ADN que son adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La inosina (I) es un ejemplo de una base sintética que se puede usar para sustituir cualquiera de las cuatro bases naturales (A, C, G o T). Las cuatro bases de ARN son A, G, C y uracilo (U). Por consiguiente, un ácido nucleico puede ser una secuencia de nucleótidos que comprende una matriz lineal de nucleótidos conectados por enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de pentosas adyacentes. Otros nucleótidos modificados son conocidos y pueden ser usados en la práctica de la descripción. El término nucleótido incluye trifosfatos de ribonucleósido ATP, UTP, ITP, CTG, GTP y trifosfatos de desoxirribonucleósidos, tales como dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP o derivados de los mismos. Tales derivados incluyen, por ejemplo, [α S]dATP, 7-deaza-dGTP y 7-deaza-dATP, y derivados de nucleótidos que confieren resistencia a la nucleasa en la molécula de ácido nucleico que los contiene. El término nucleótido como se usa en el presente documento también se refiere a trifosfatos de didesoxirribonucleósido (ddNTP) y sus derivados. Los ejemplos ilustrados de trifosfatos de didesoxirribonucleósido incluyen, entre otros, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP y ddTTP. De acuerdo con la presente invención, un "nucleótido" puede estar marcado de forma detectable, o no, mediante técnicas muy conocidas. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y marcadores de enzimas. Se pueden emplear diversos métodos de marcado conocidos en la técnica en la práctica de la presente descripción.

"ARN" o "molécula de ARN" se refiere a cualquier molécula de ARN o porción funcional de la misma, de cualquier tamaño y que tenga cualquier secuencia, de cualquier fuente, incluido el ARN de organismos virales, procarionóticos y eucarióticos. La molécula de ARN puede ser modificada químicamente y en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitarse a, lineal o circular, y de cadena sencilla o doble. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARN incluyen ARNr, ARNt, ARNm, mtARN, tmARN, ARNi, ARNi, ARNhc y ARNst. En algunas realizaciones, las moléculas de ARNi útiles en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, las descritas en los números de solicitud de patente de EE. UU. 10/357.529 publicado como U.S. 2004/0014956, 10/357.826 publicado como U.S. 2004/0054155, 11/049.636 publicado como U.S. 2006/0009409, 11/776.313 publicado como U.S. 2009/0023216, y 12/062.380

presentado el 3 de abril de 2008; y como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US03/03223 publicadas como WO 2003/064626, y PCT/US03/03208 publicadas como WO 03/064625. Otras moléculas de ARNi útiles en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, las descritas en la solicitud de patente PCT PCT/US2008/076675 publicada como WO 2009/039173 el 26 de marzo de 2009.

5 Los términos "péptido", "polipéptido" o "proteína" se refieren a una cadena de al menos tres aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los términos "proteína" y "péptido" se puede usar indistintamente, aunque en general se entiende que un "polipéptido" o "proteína" es más grande que un péptido. "Péptido" puede referirse a un péptido individual o una colección de péptidos.

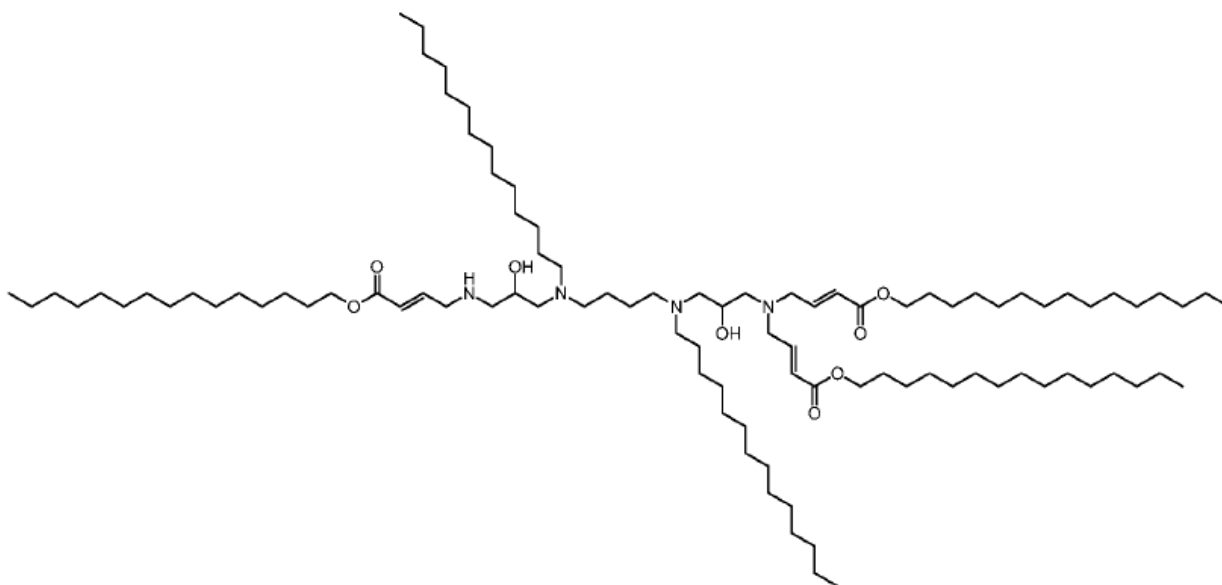
10 Los términos "polinucleótido" u "oligonucleótido" se refieren a un polímero de nucleótidos. Típicamente, un polinucleótido comprende al menos tres nucleótidos. El polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirina, 3-metil adenosina, C5-propinilcitidina, C5-propiniluridina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-metilcitidina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxocenosina y O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa), o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidita).

15 El término "lípidos" se refiere a compuestos orgánicos hidrófobos o anfífilos que incluyen grasas, aceites y triglicéridos.

20 II. Realizaciones de la presente descripción.

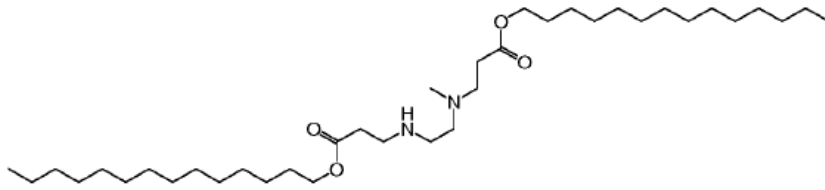
Compuestos de transfección que contienen amina

La presente descripción describe un compuesto que contiene amina útil como reactivos de transfección y métodos para sintetizarlos. Más particularmente, según algunas realizaciones de la invención, se proporciona el compuesto 87 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

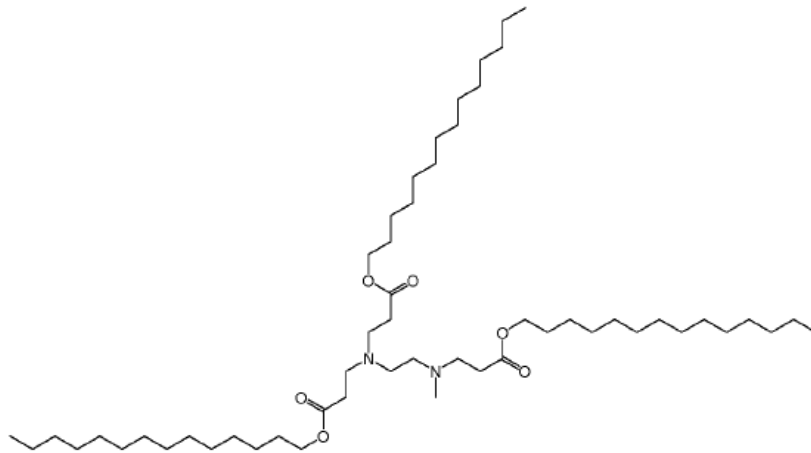


87

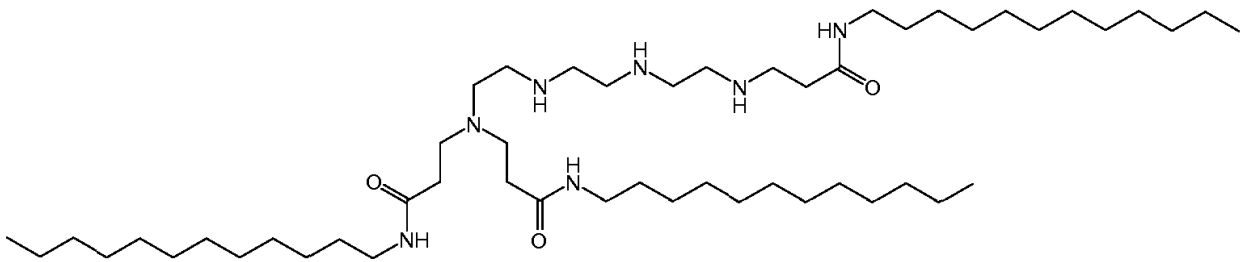
En la presente descripción se mencionan algunos compuestos de referencia:



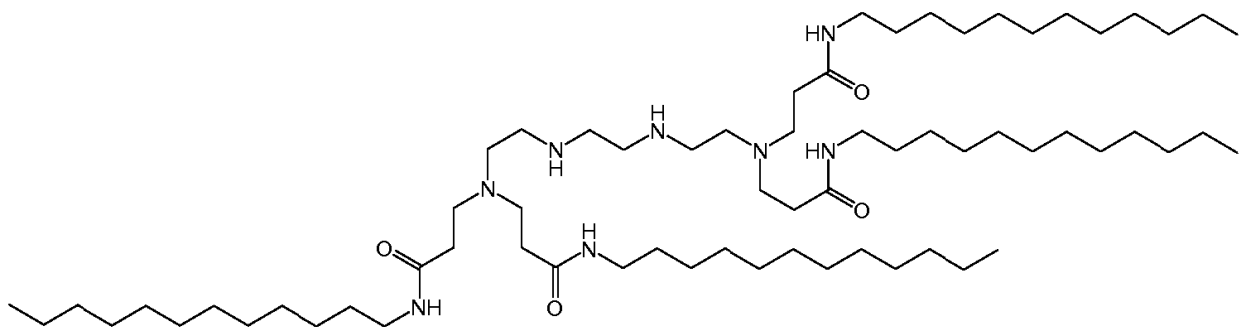
1



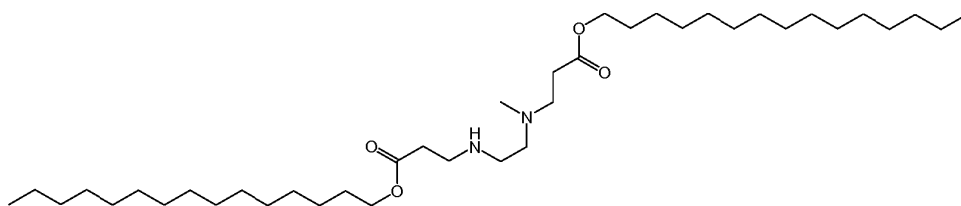
2



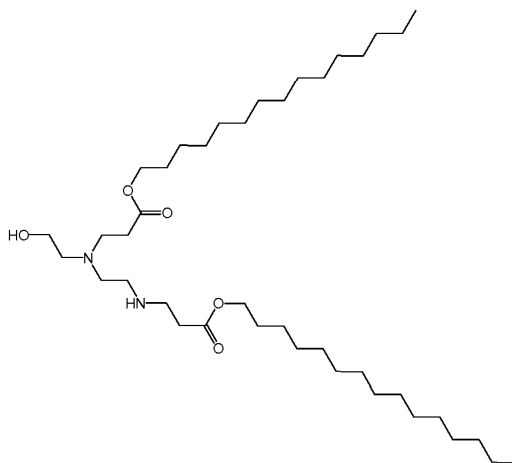
3



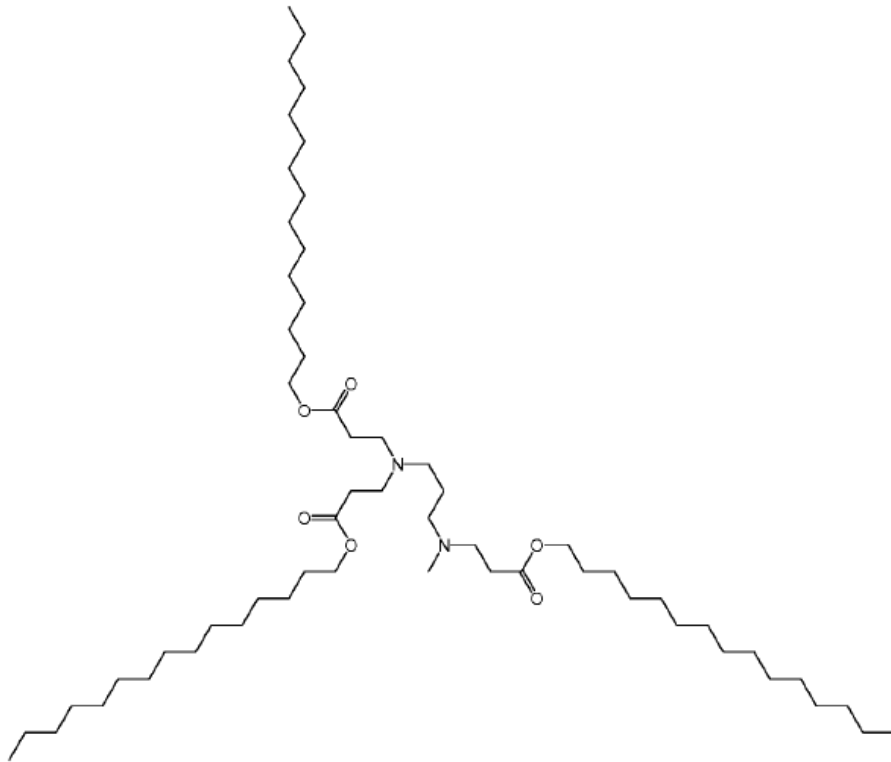
4



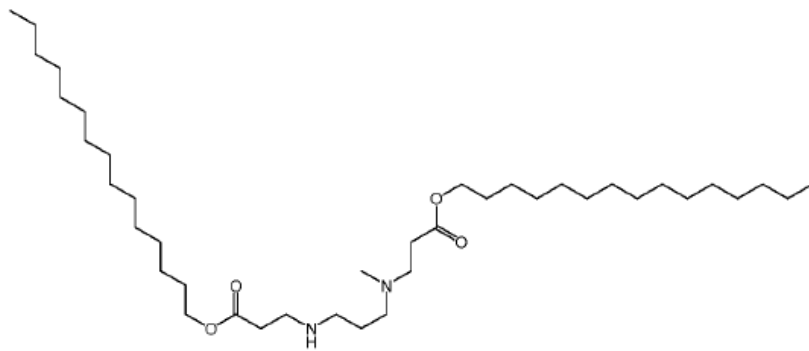
5



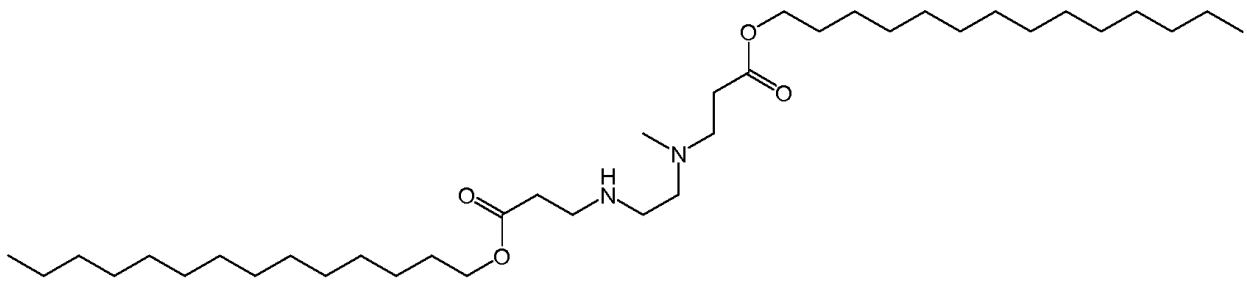
6



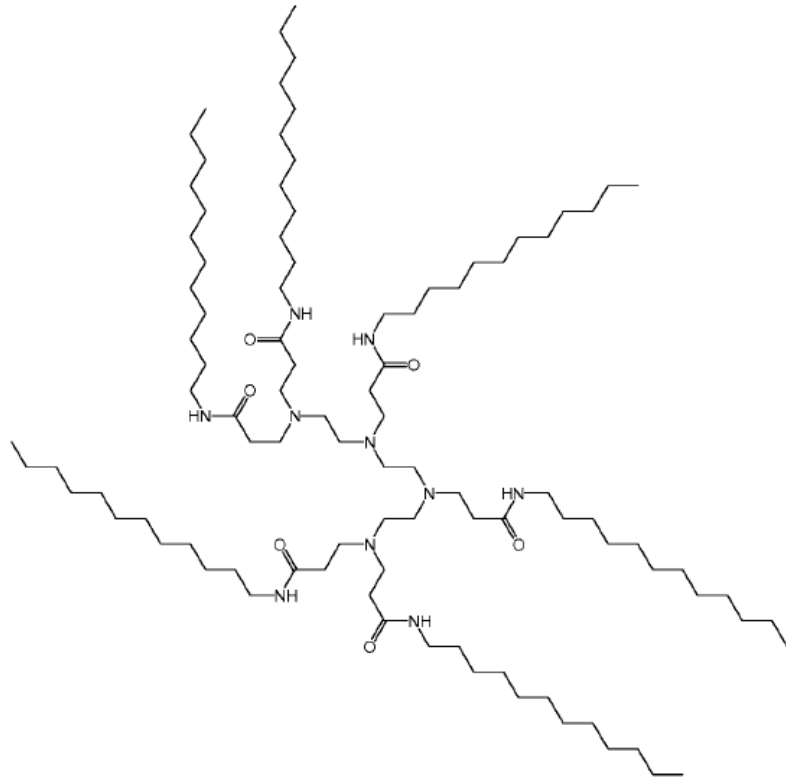
7



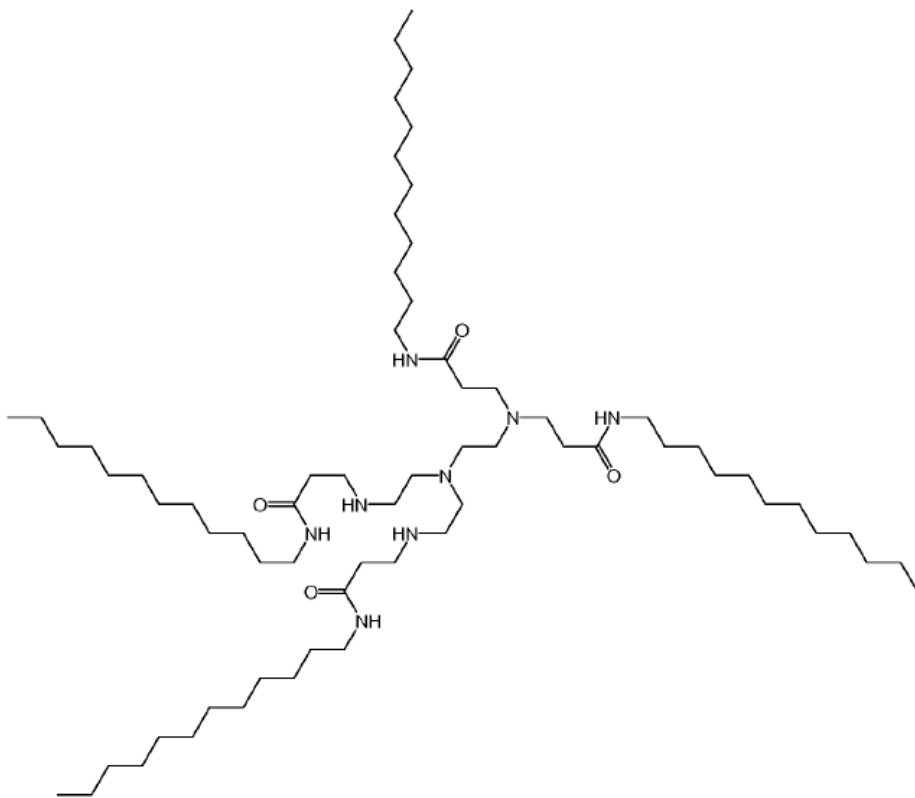
8



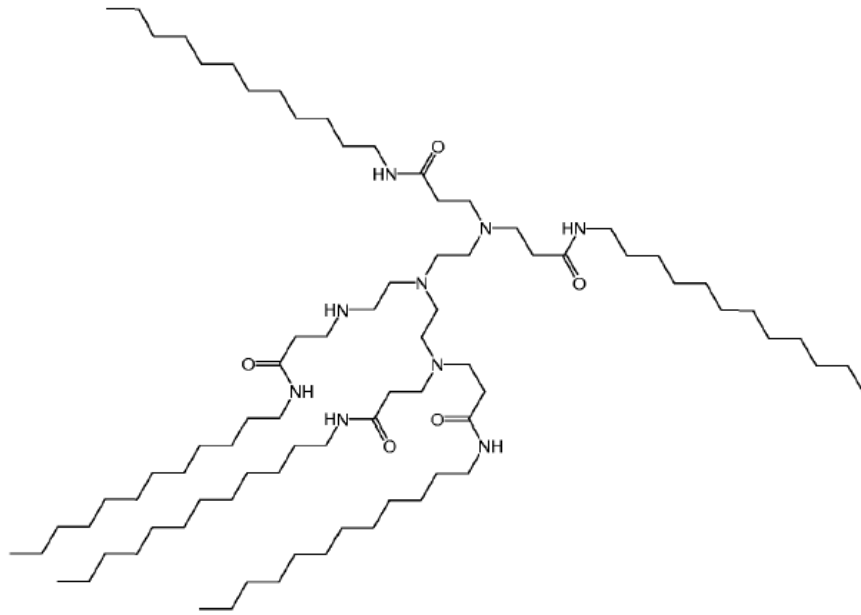
9



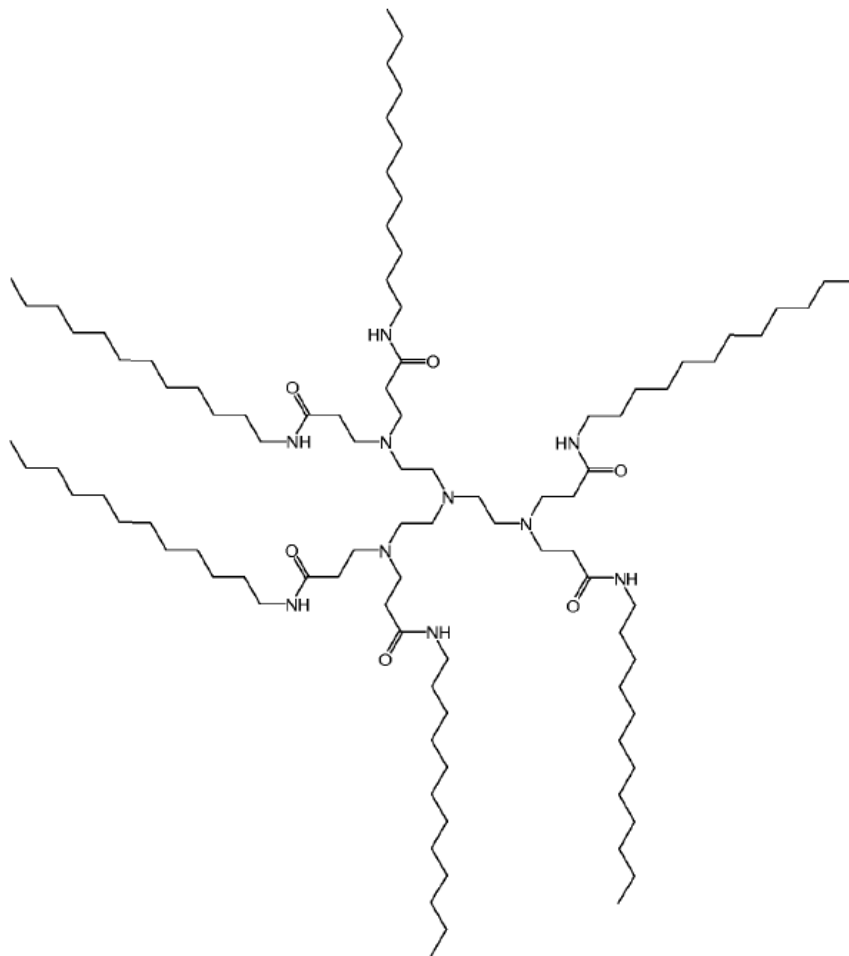
10



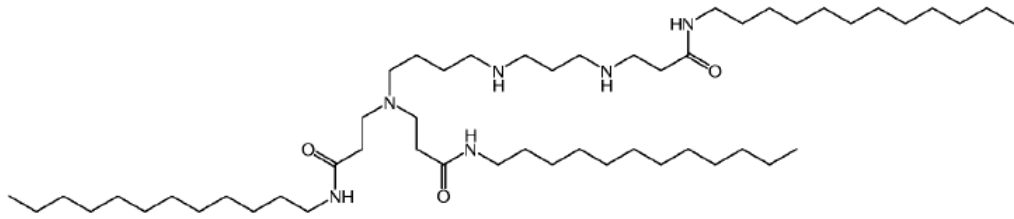
11



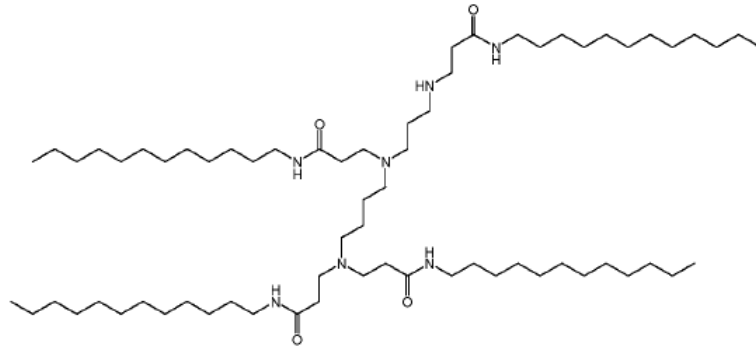
12



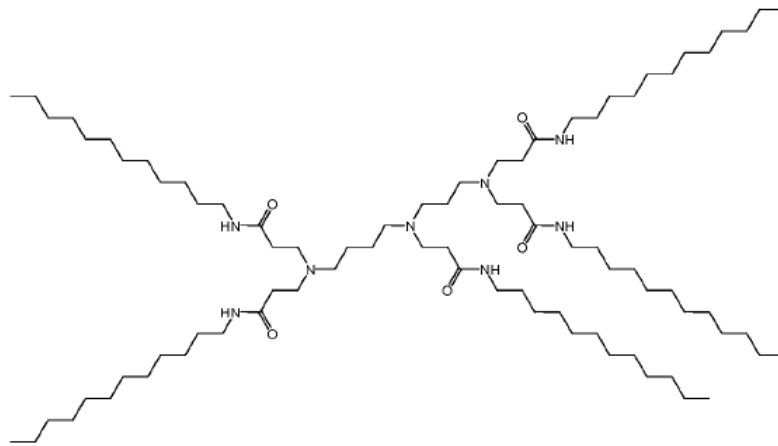
13



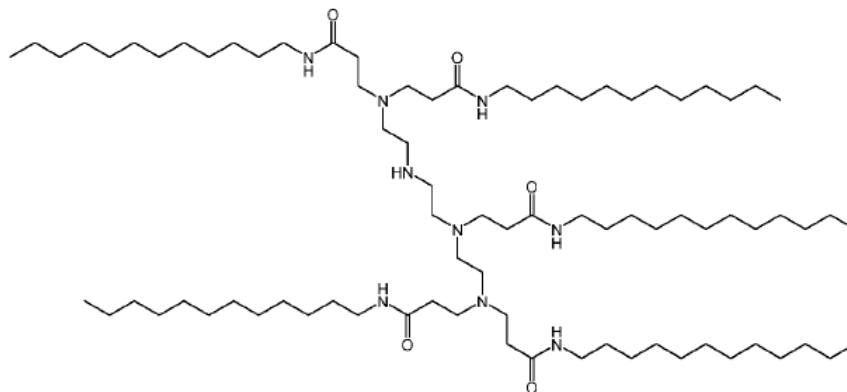
14



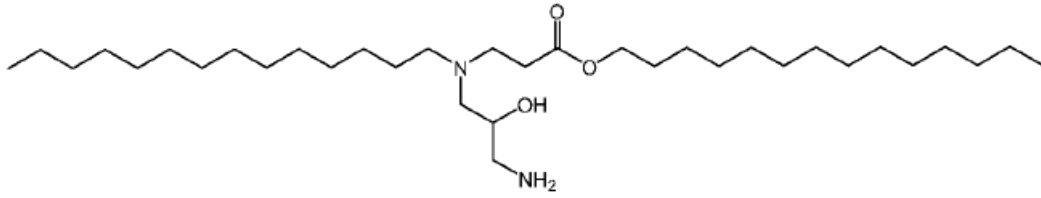
15



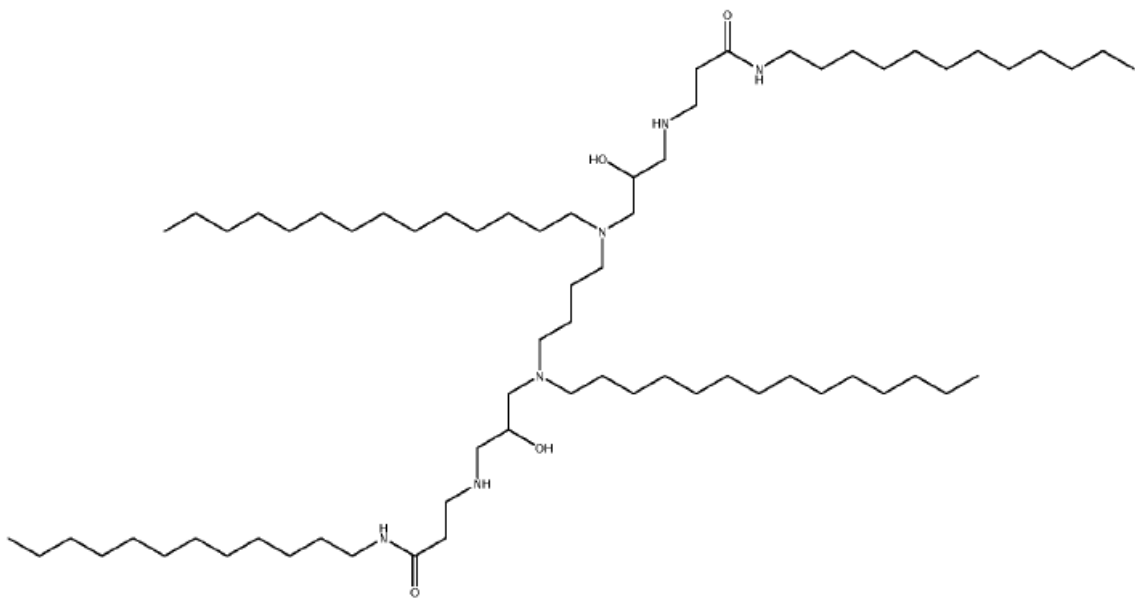
16



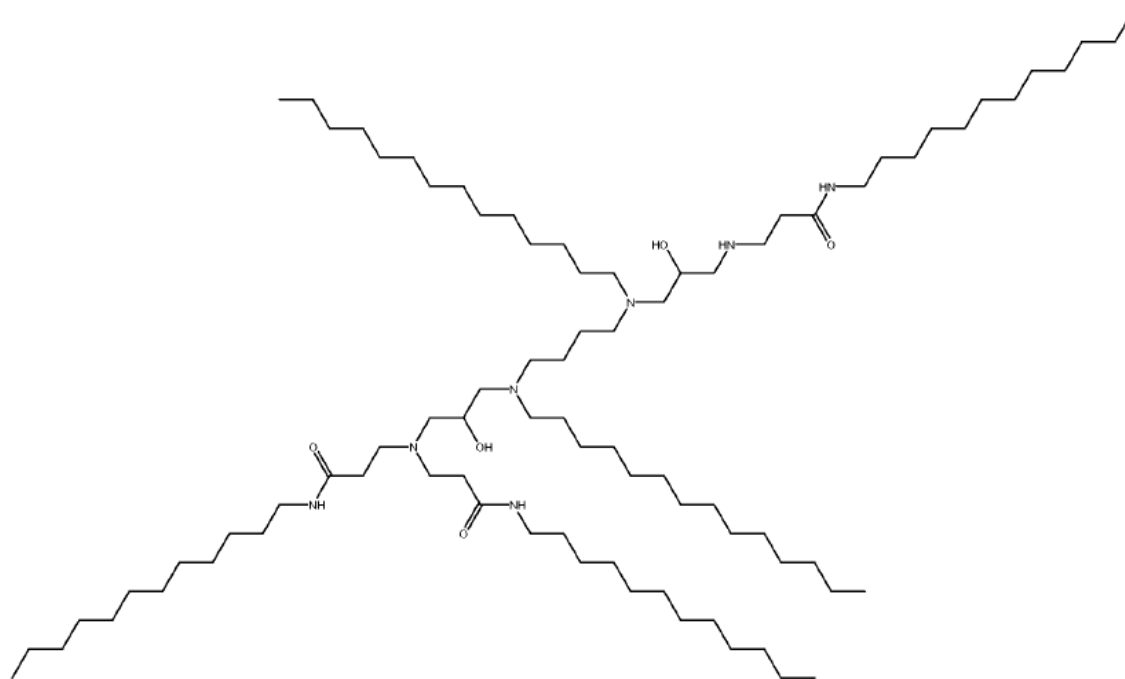
17



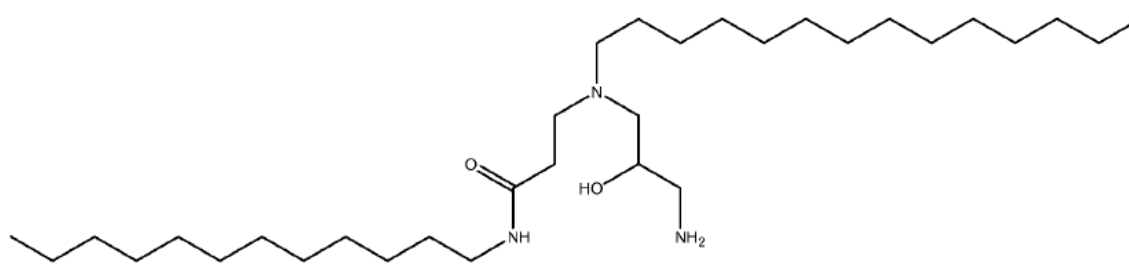
18



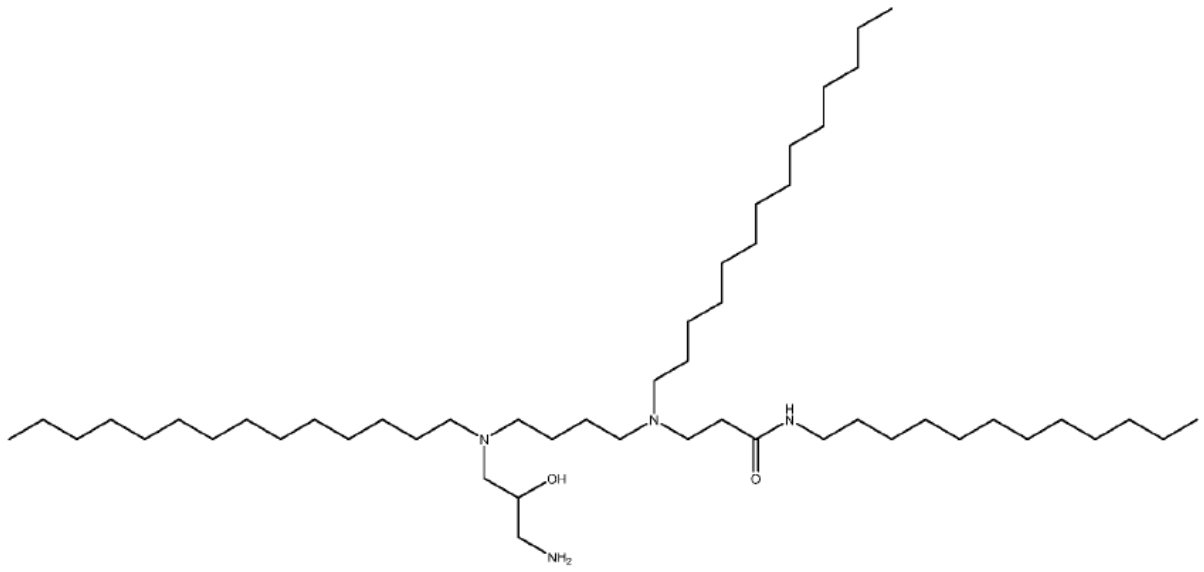
19



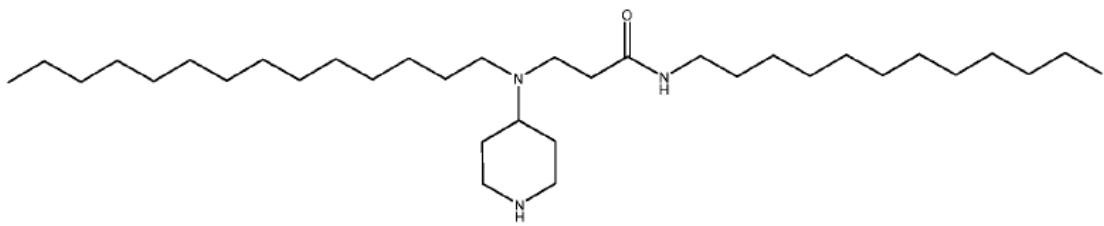
20



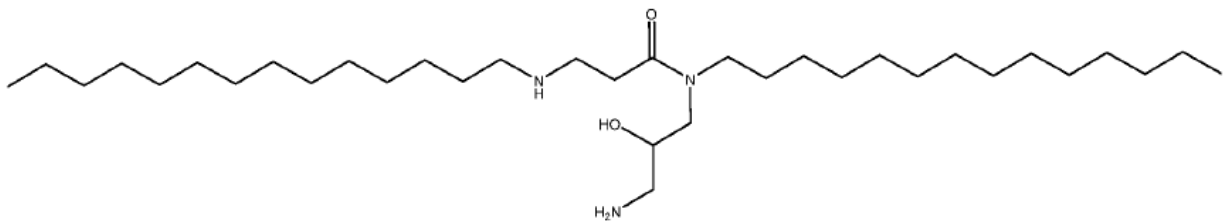
21



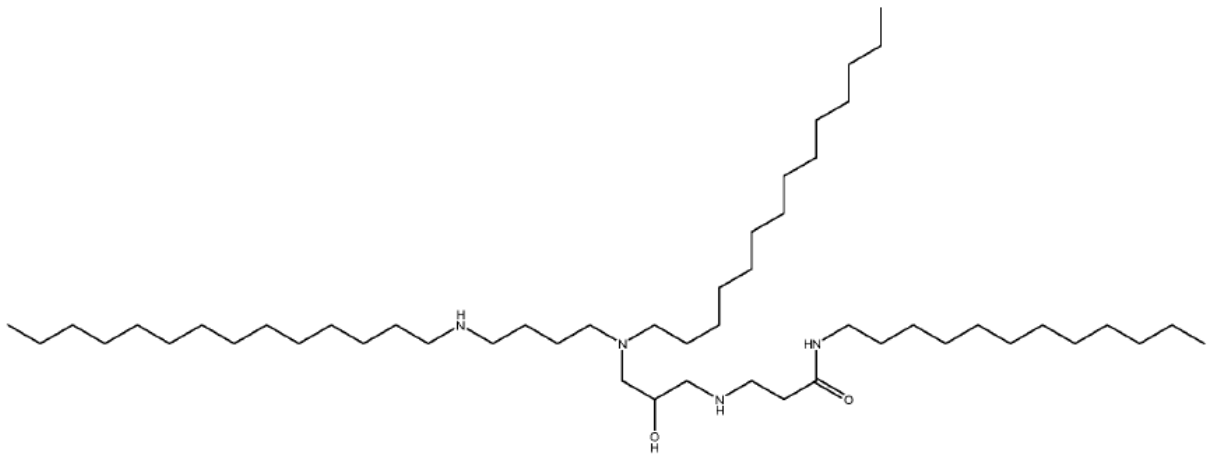
22



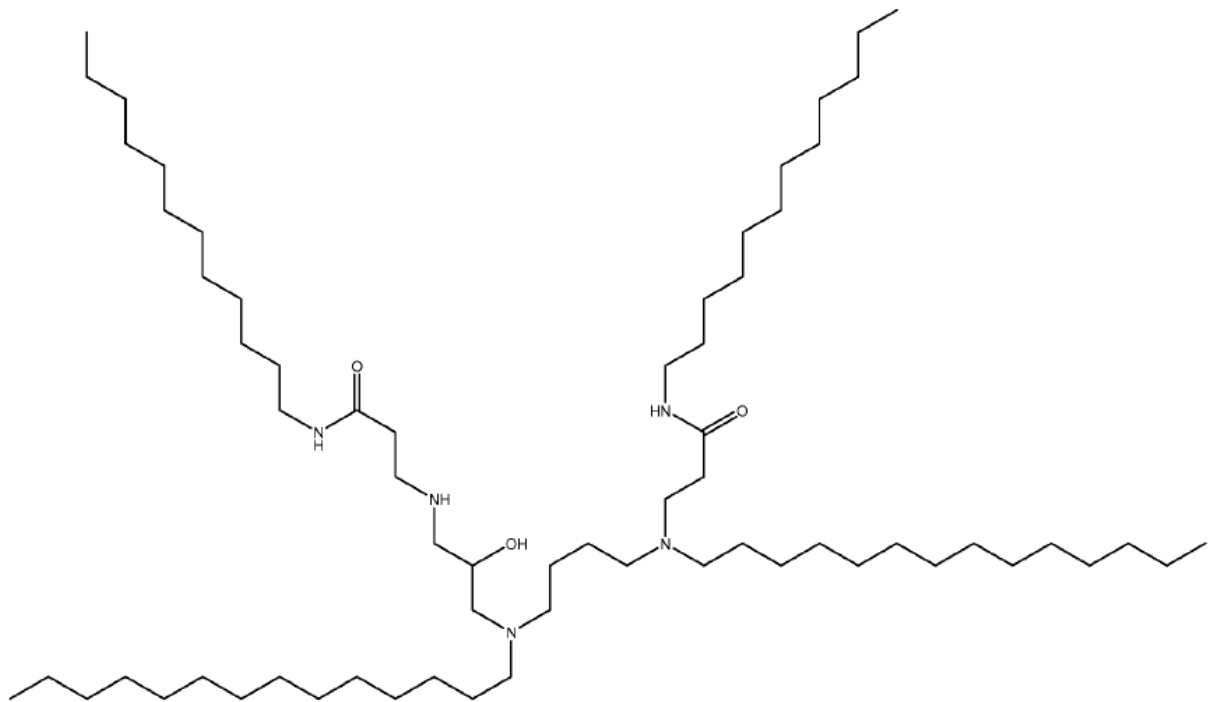
23



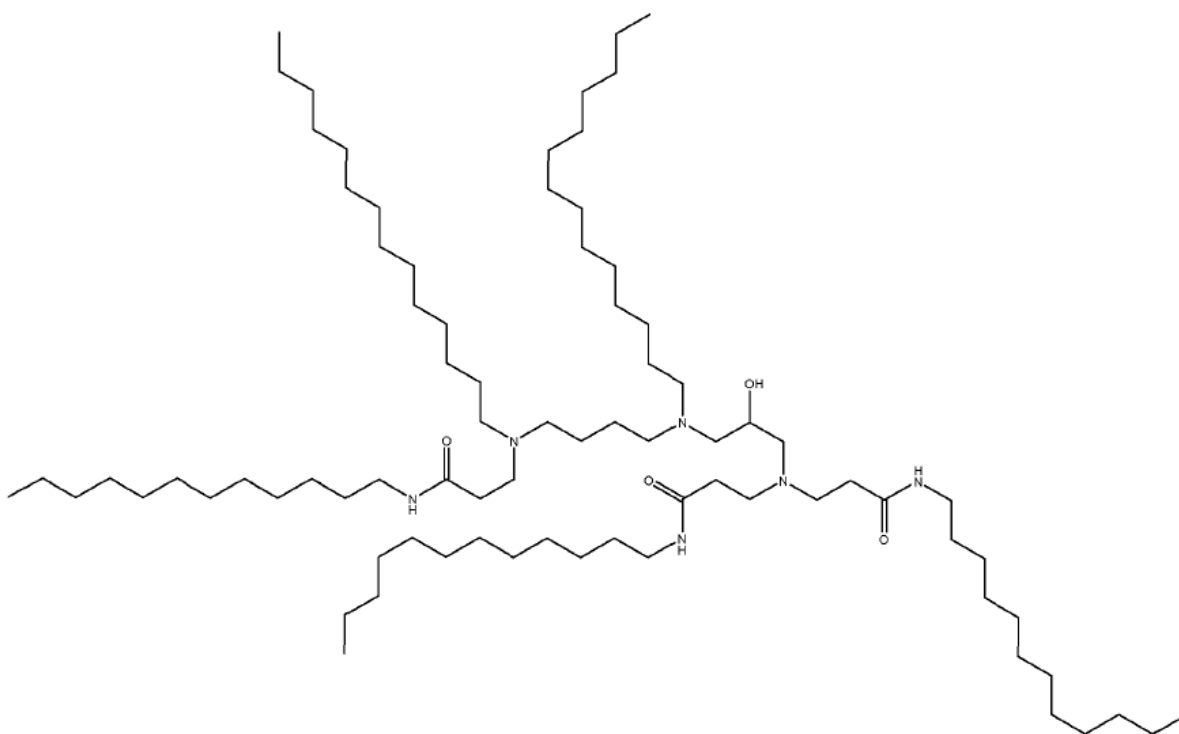
24



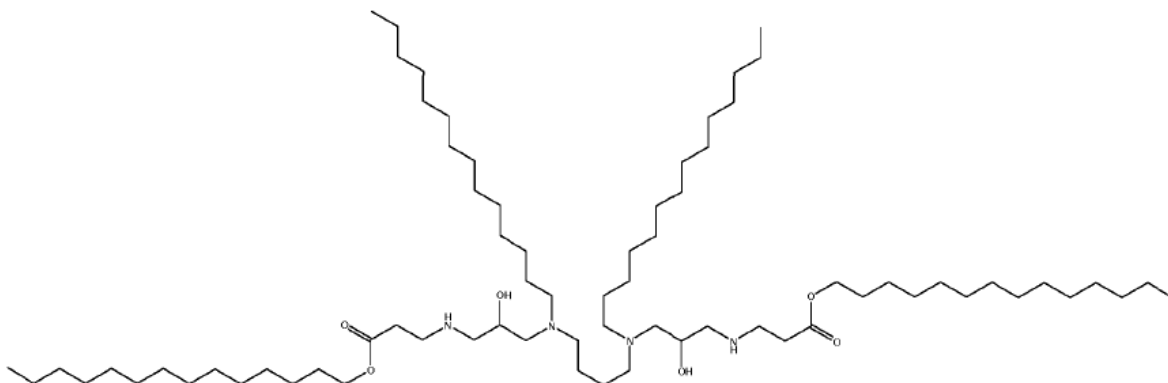
25



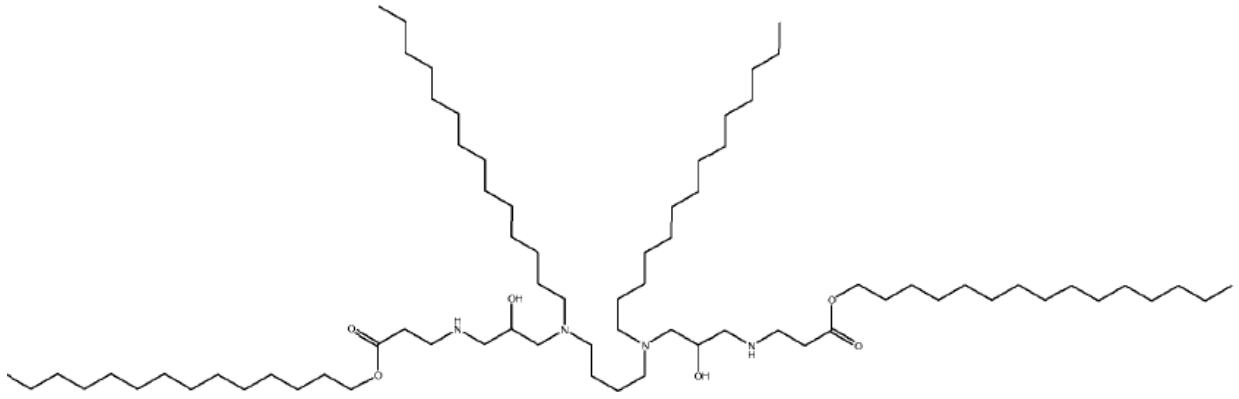
26



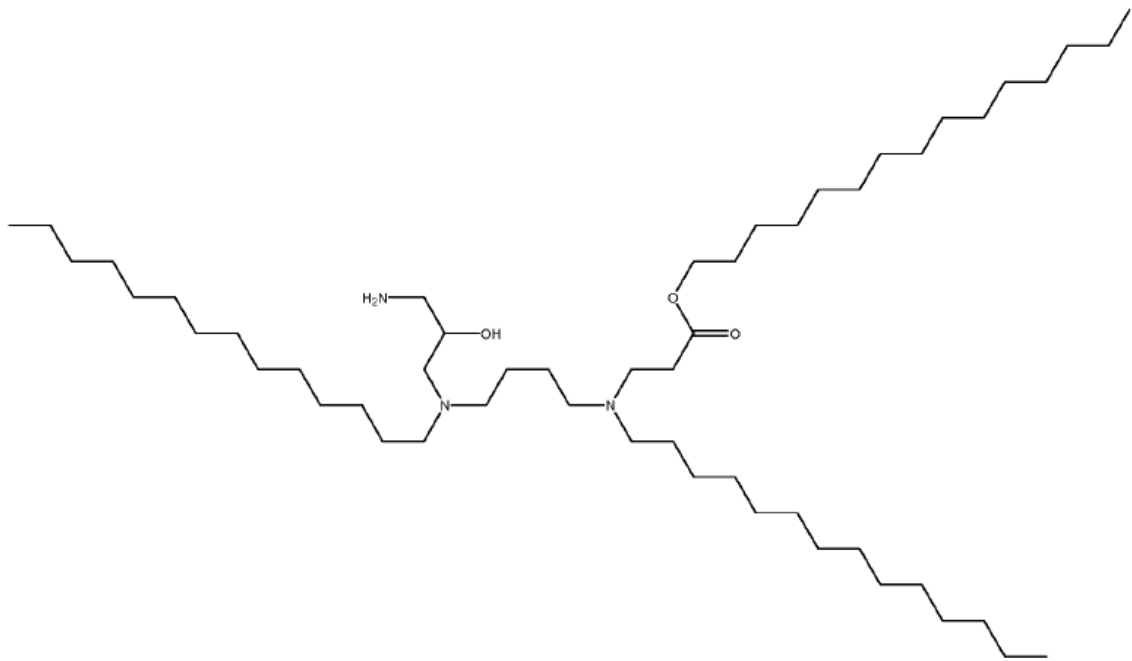
27



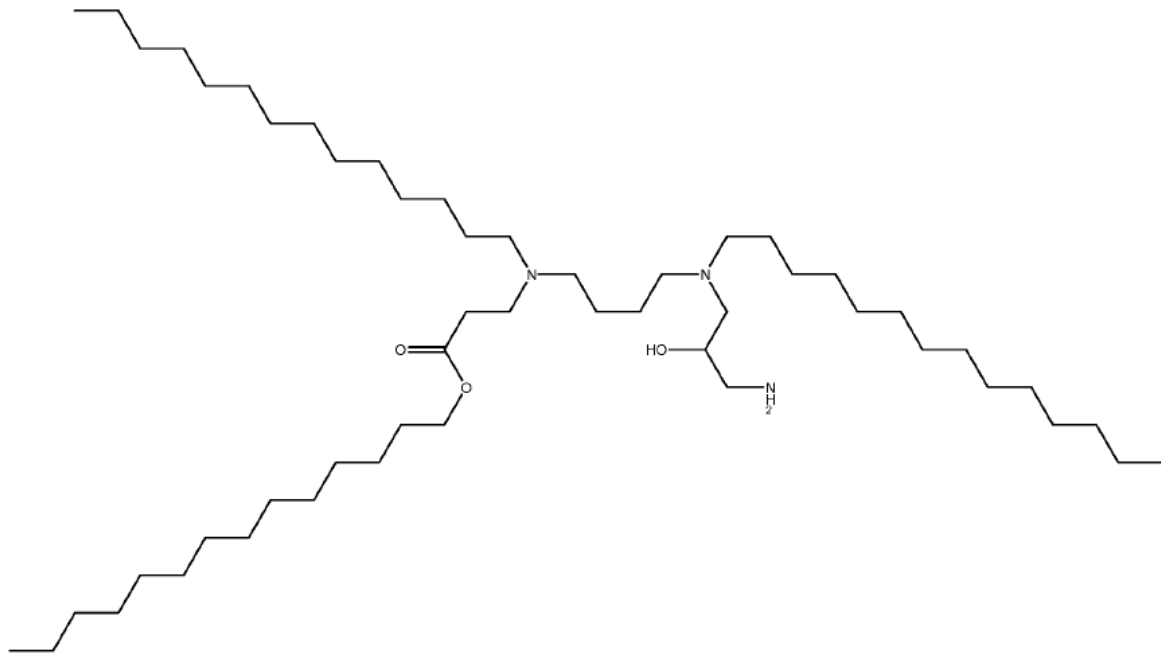
28



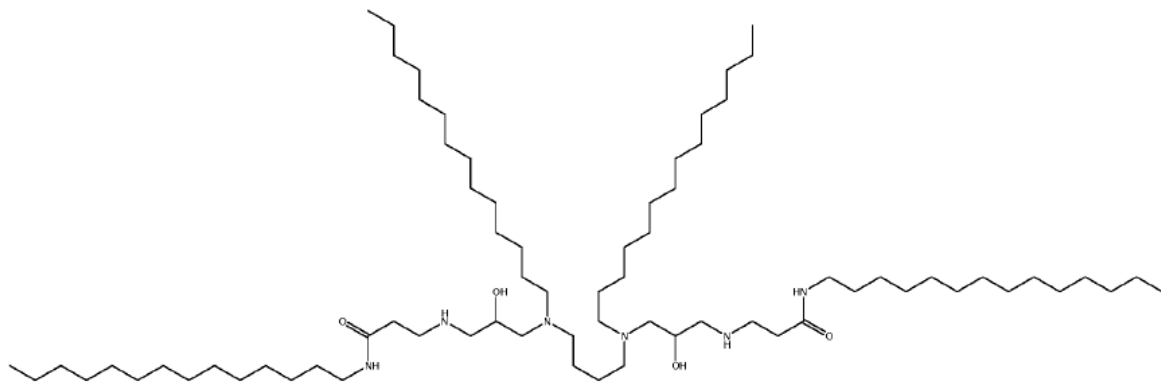
29



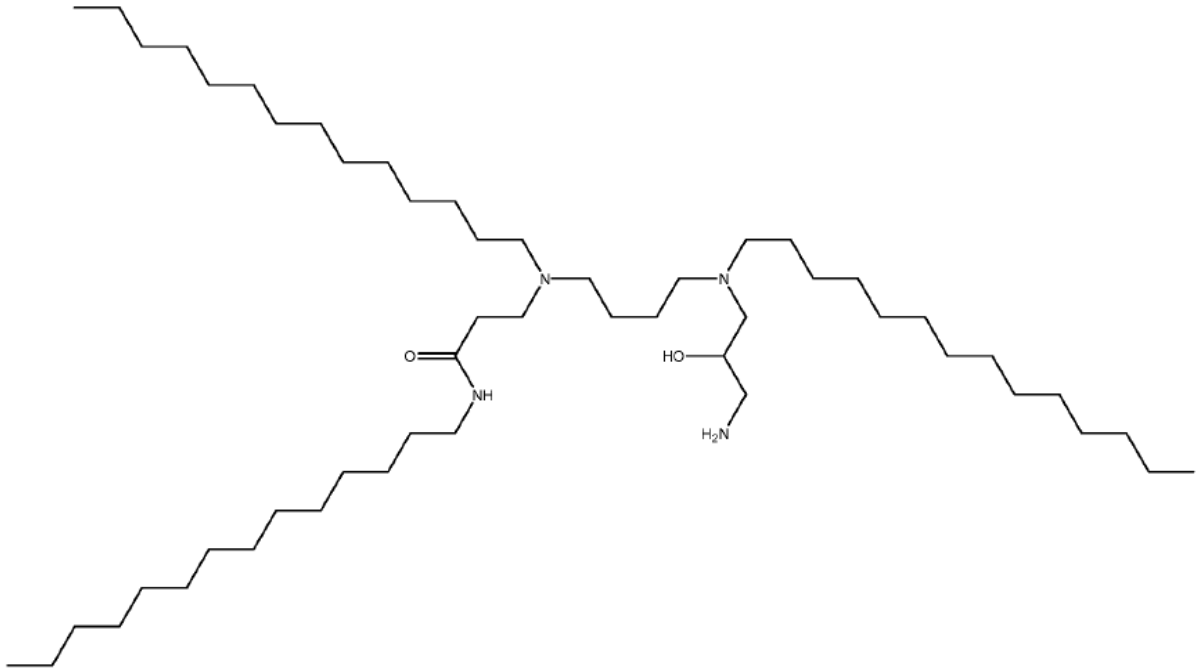
30



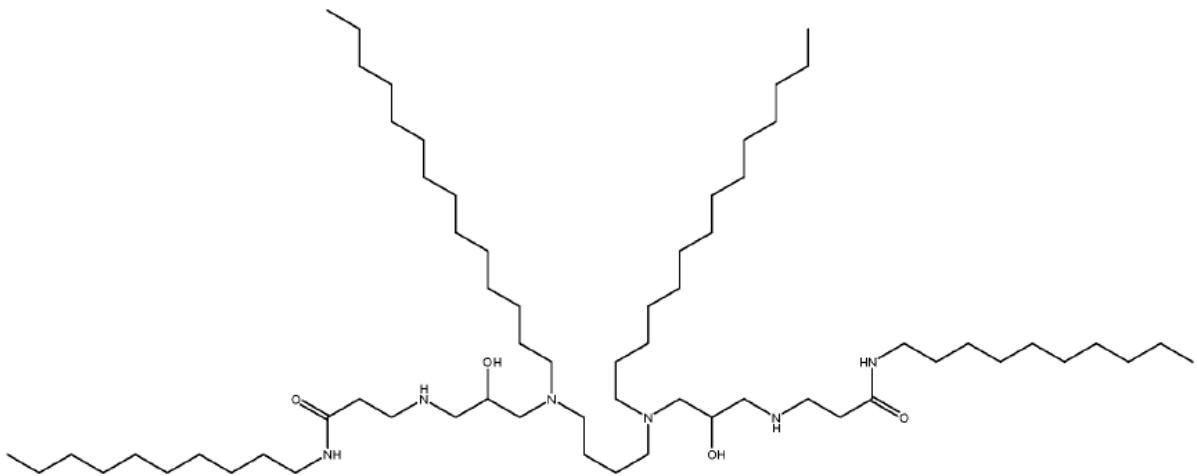
31



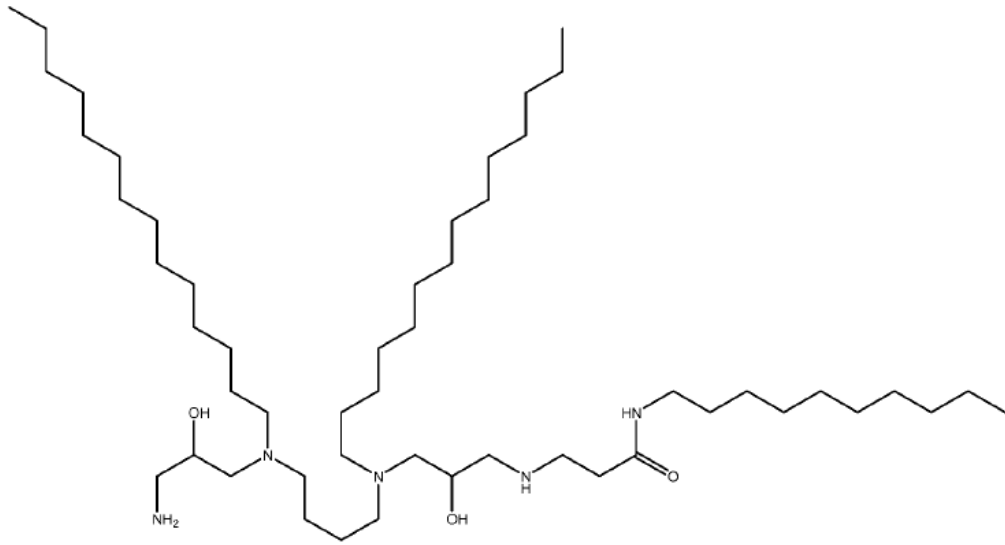
32



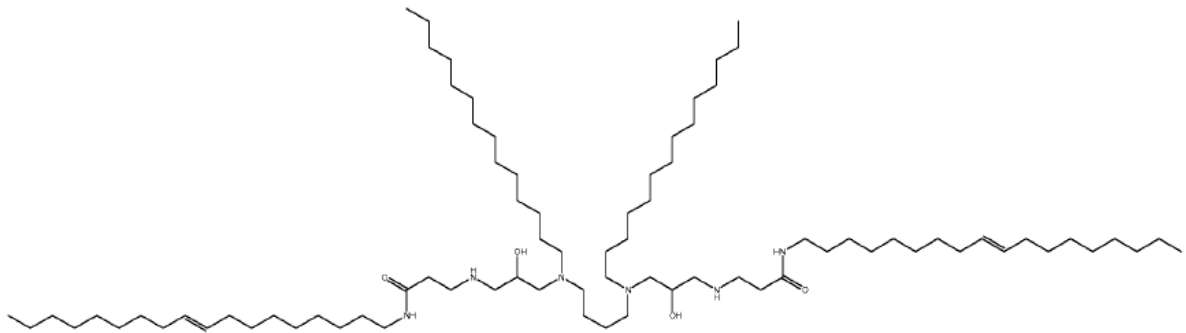
33



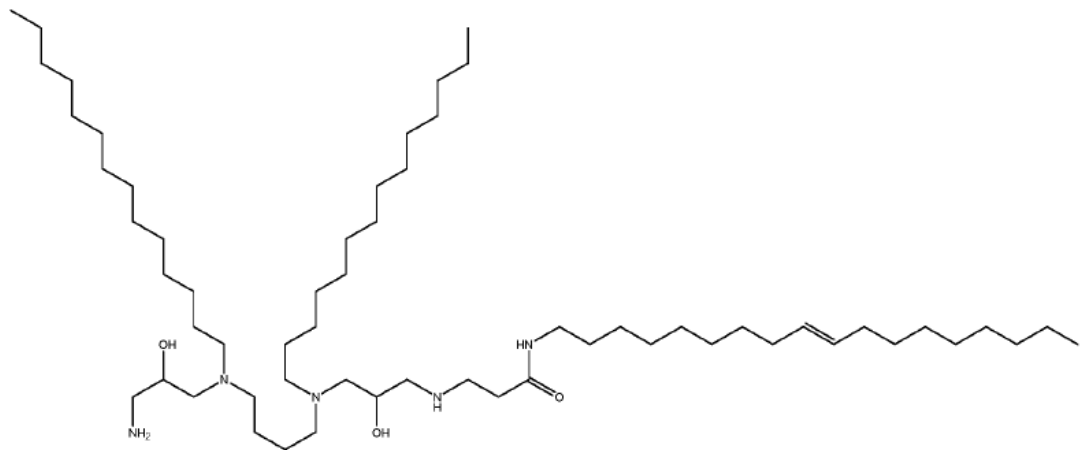
34



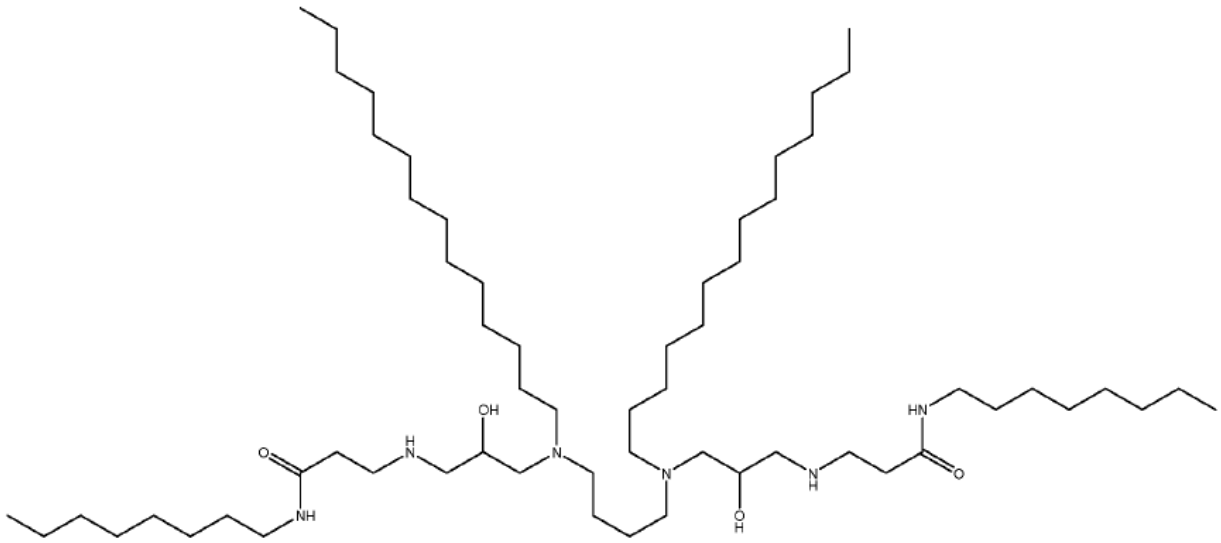
35



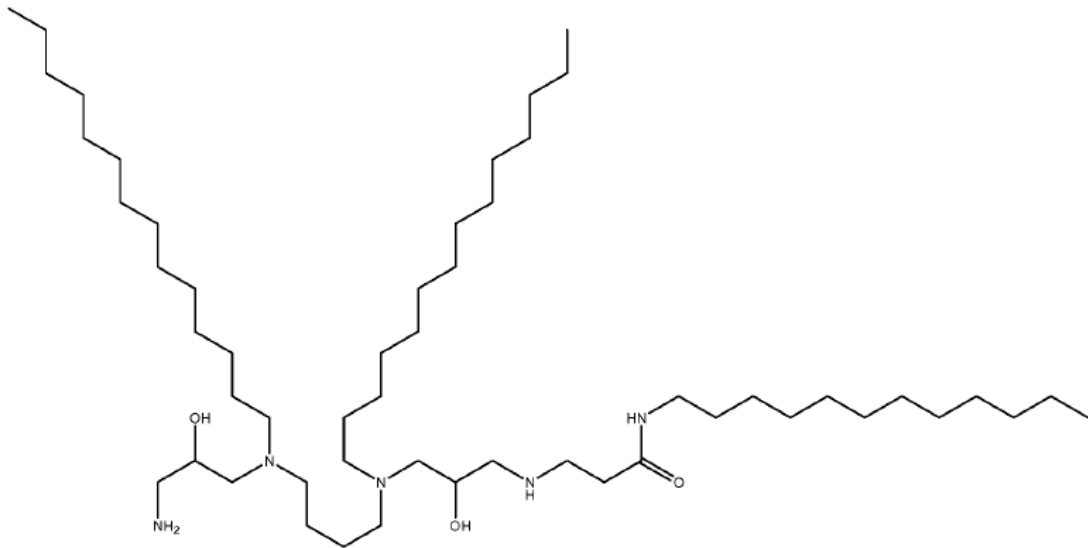
36



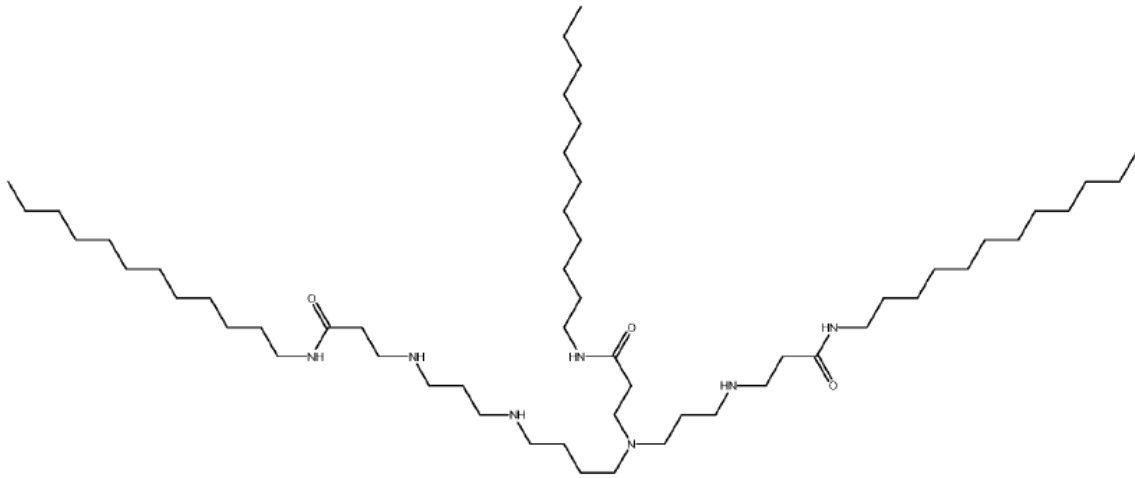
37



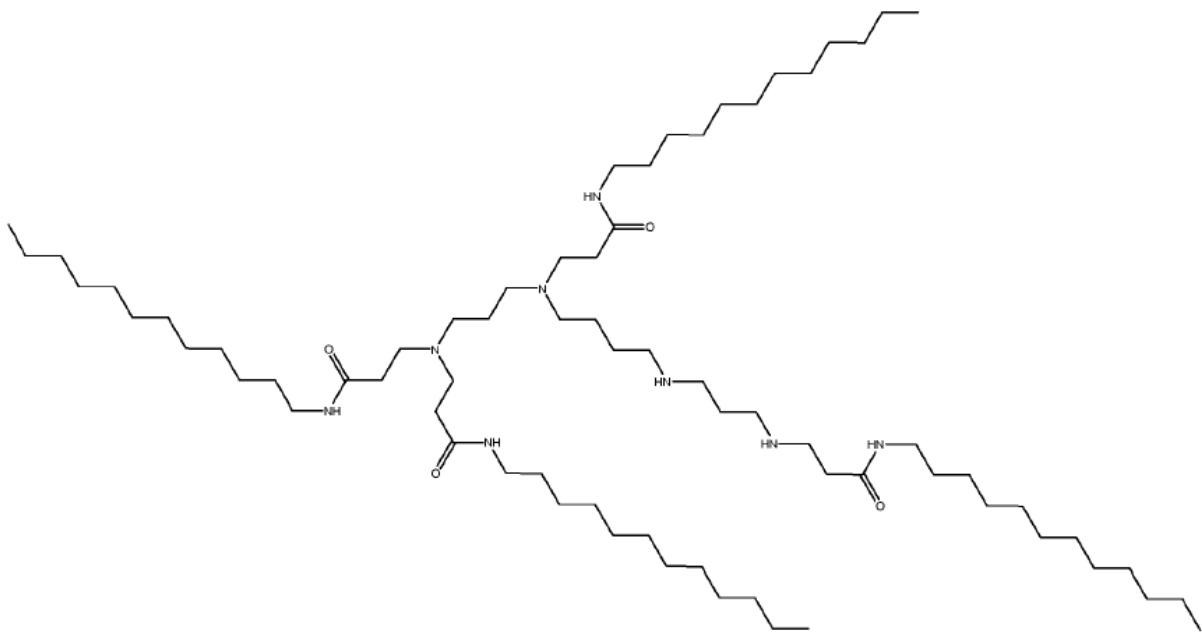
38



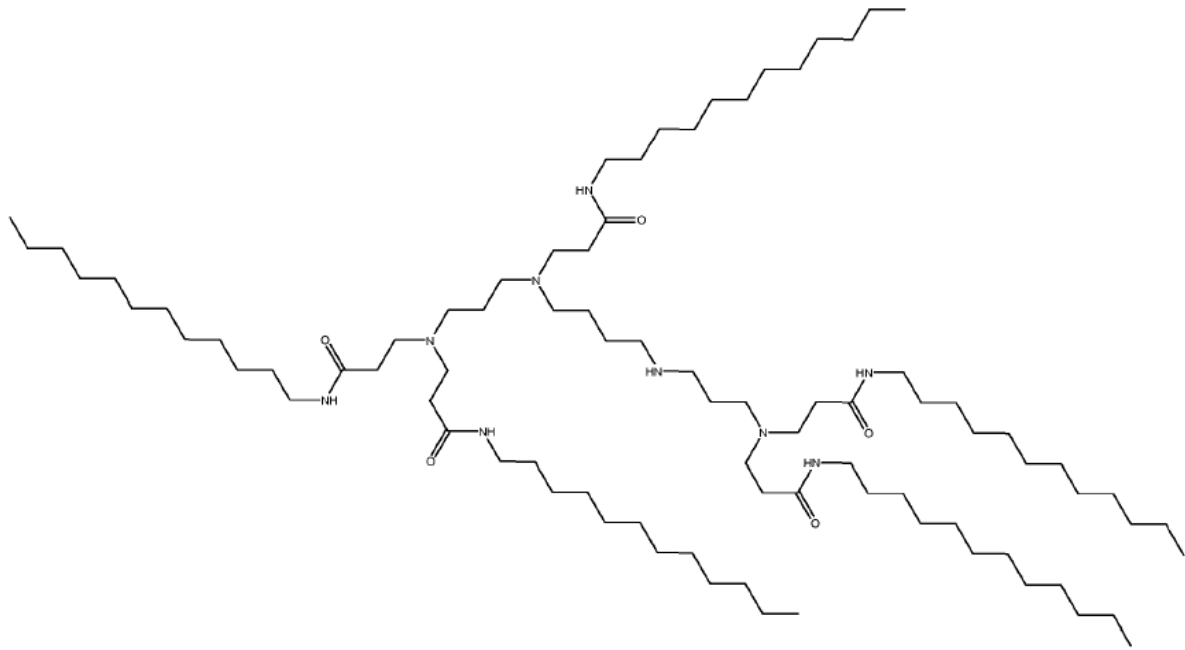
39



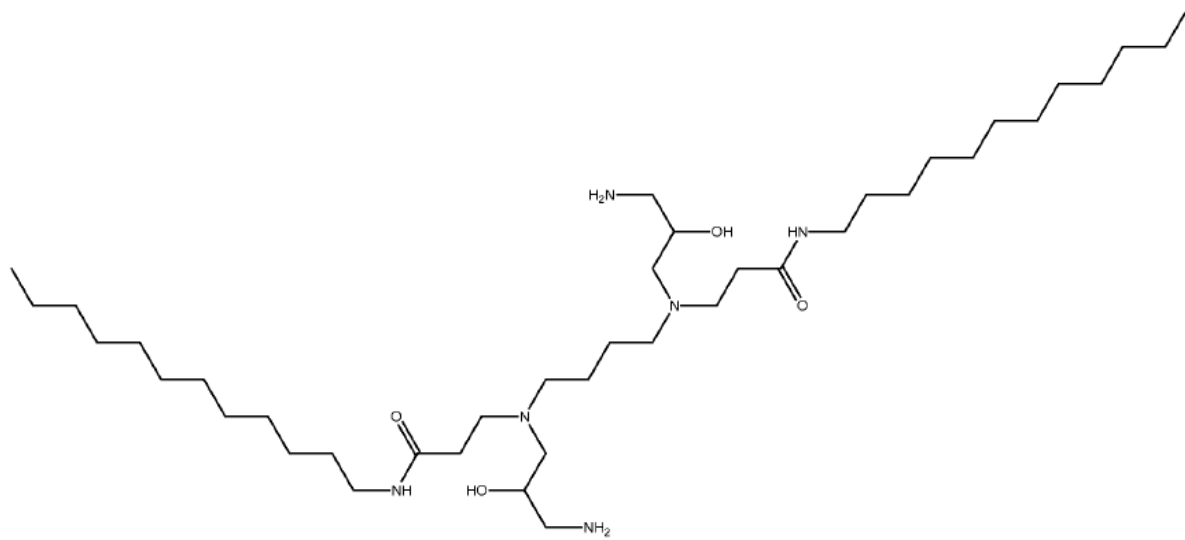
40



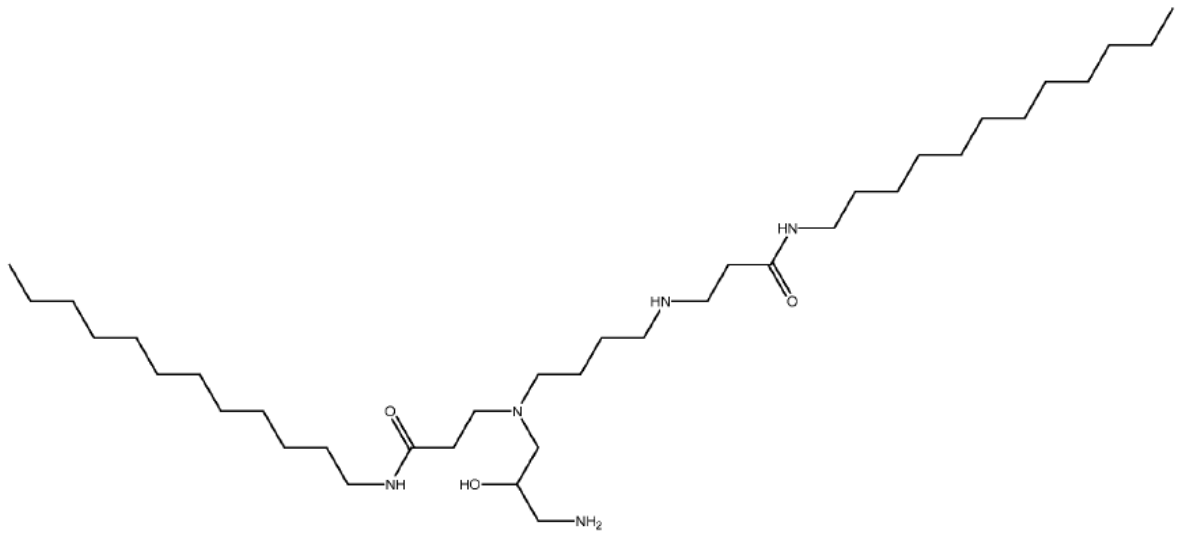
41



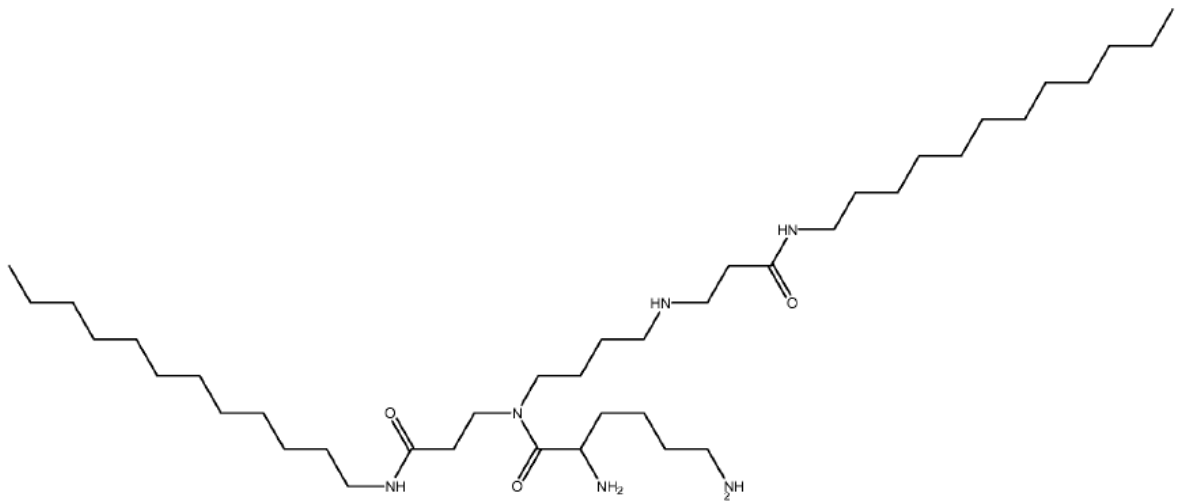
42



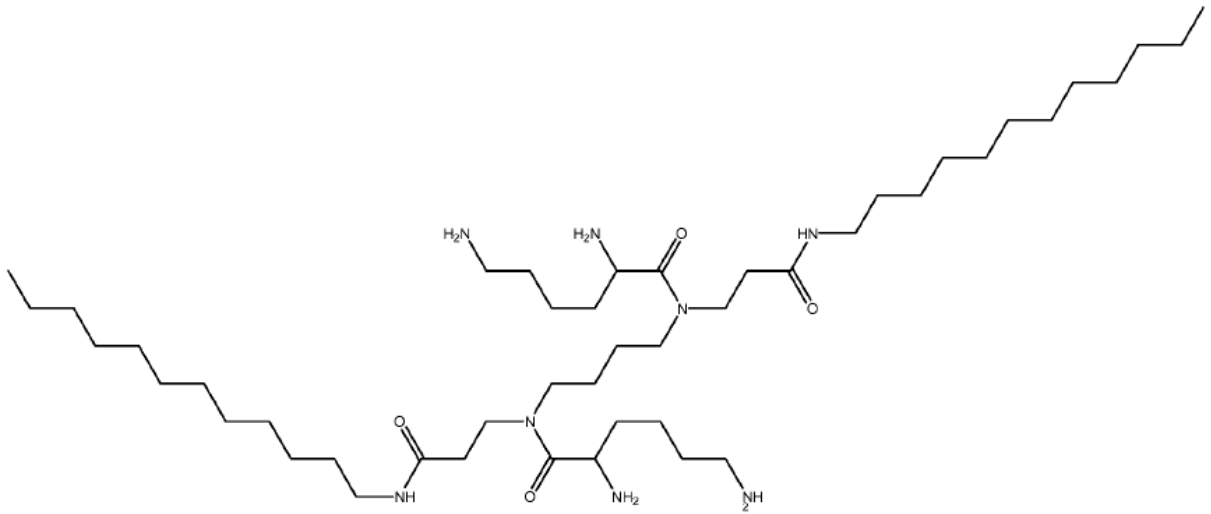
43



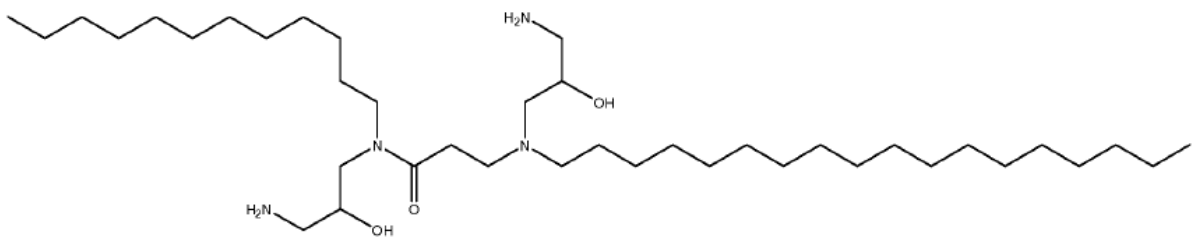
44



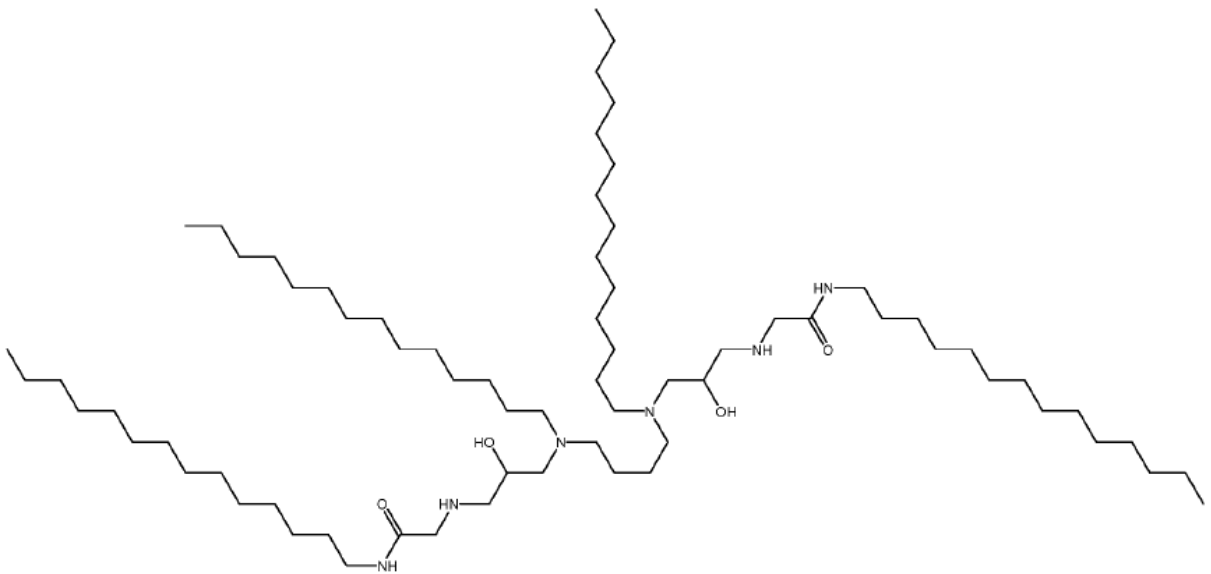
45



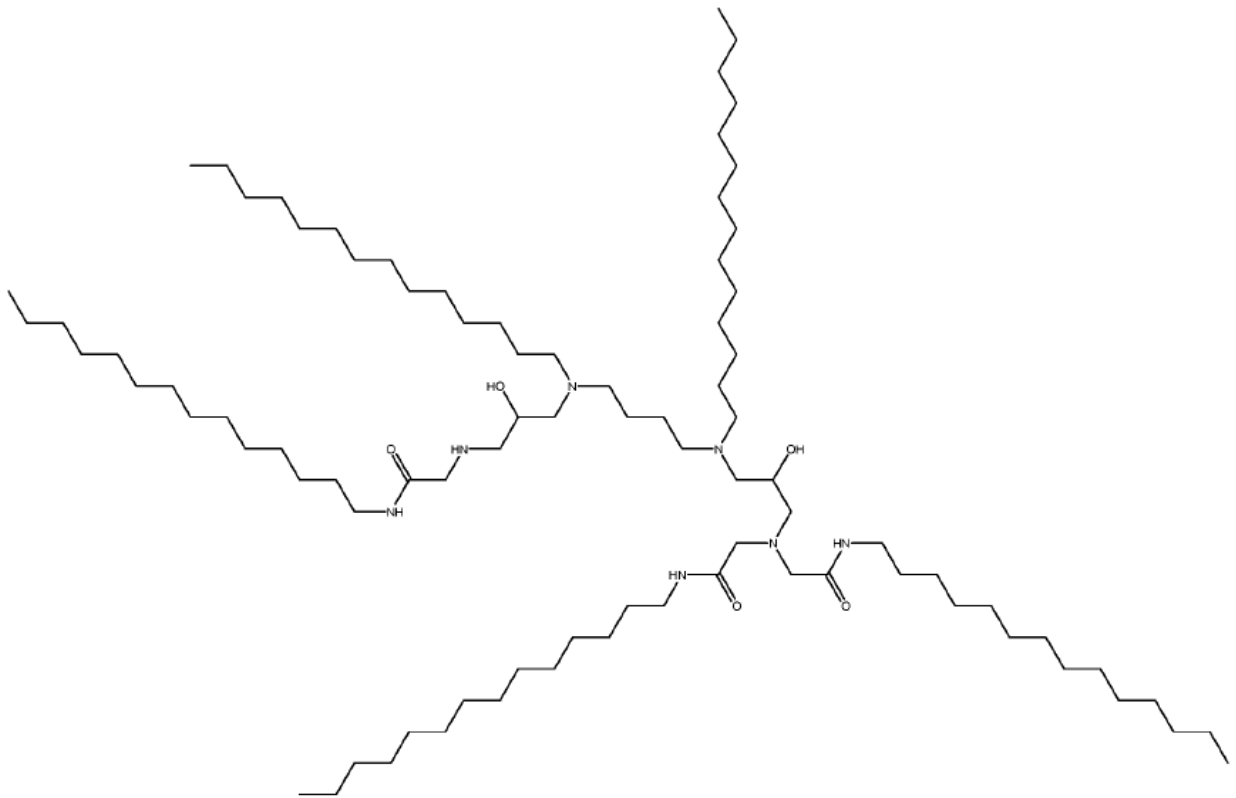
46



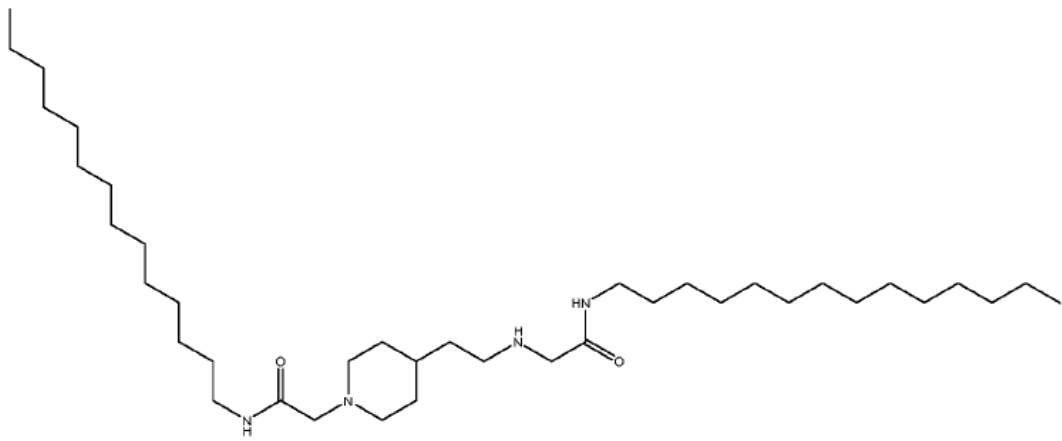
47



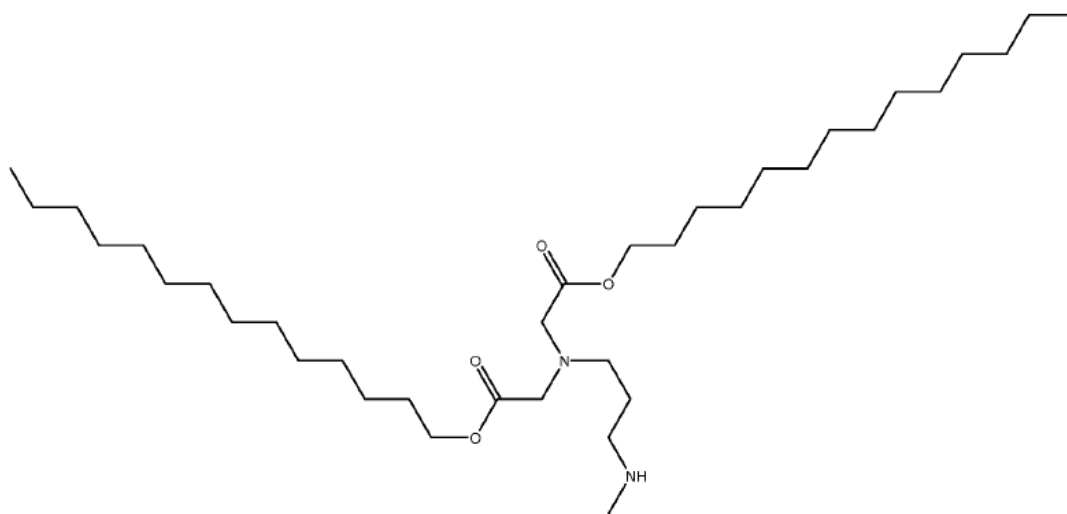
48



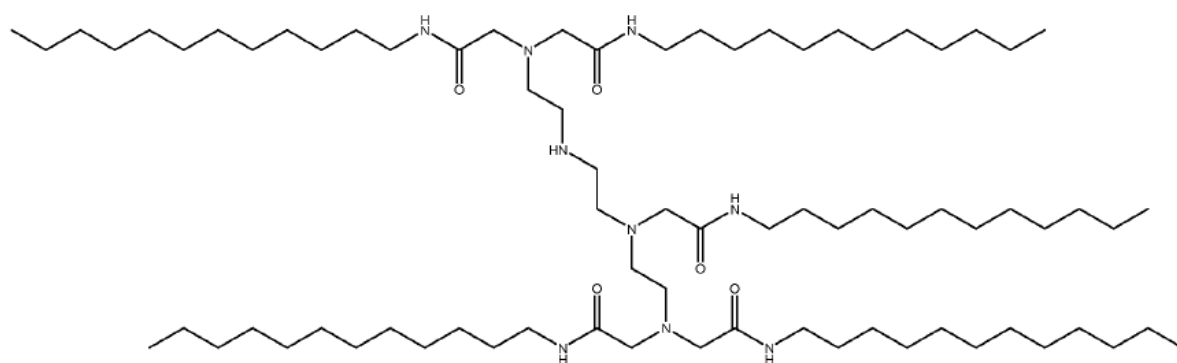
49



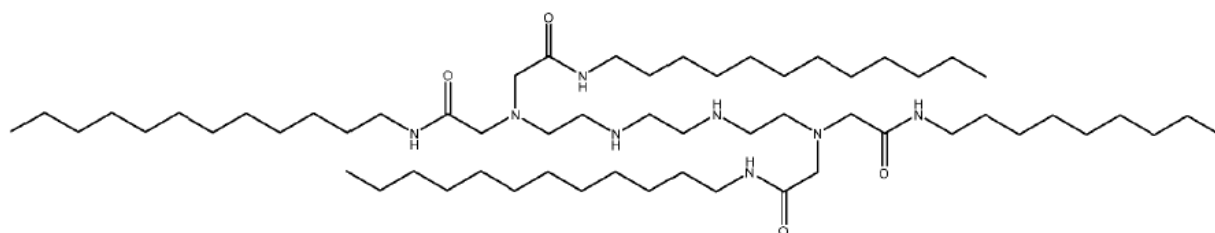
50



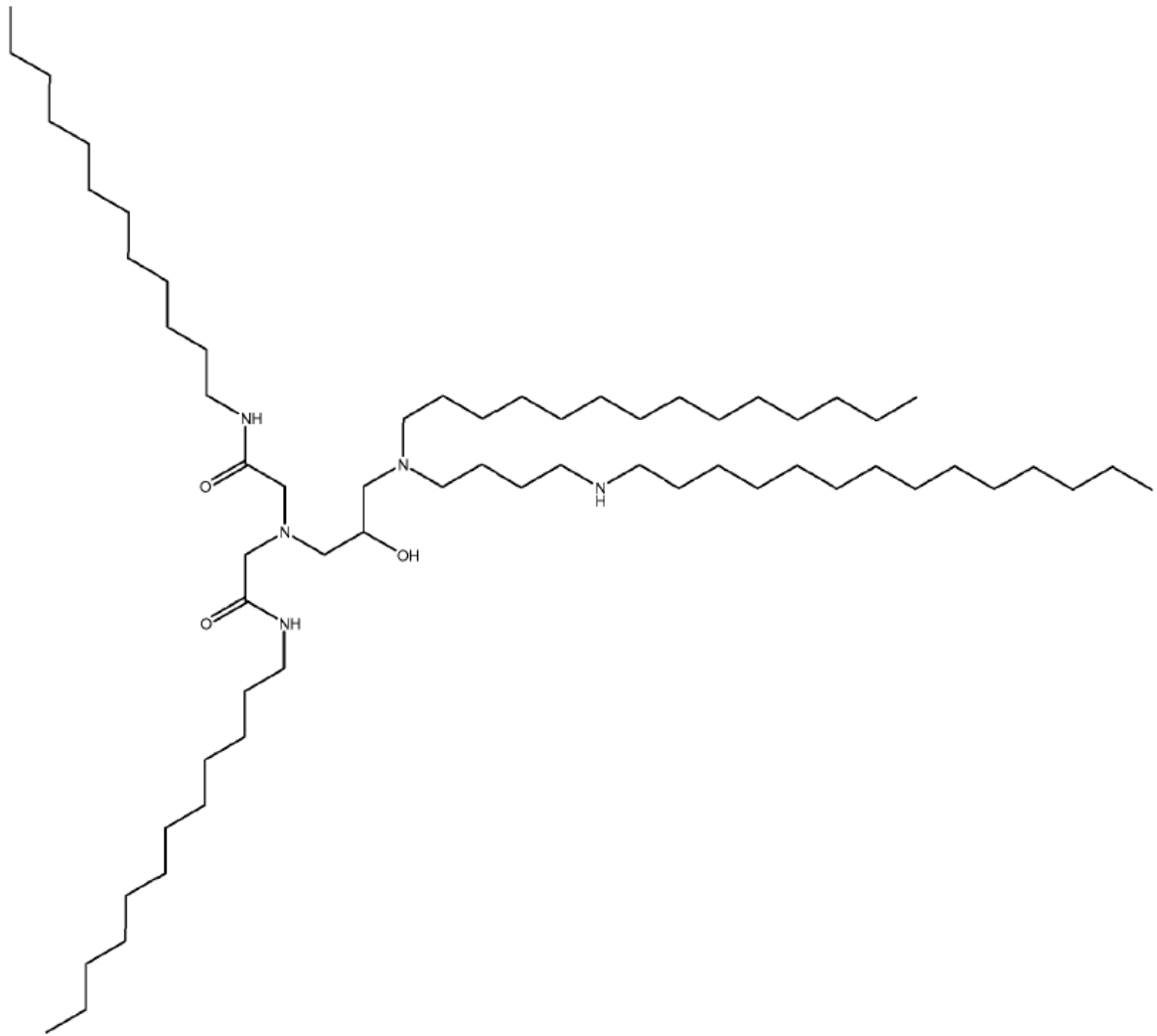
51



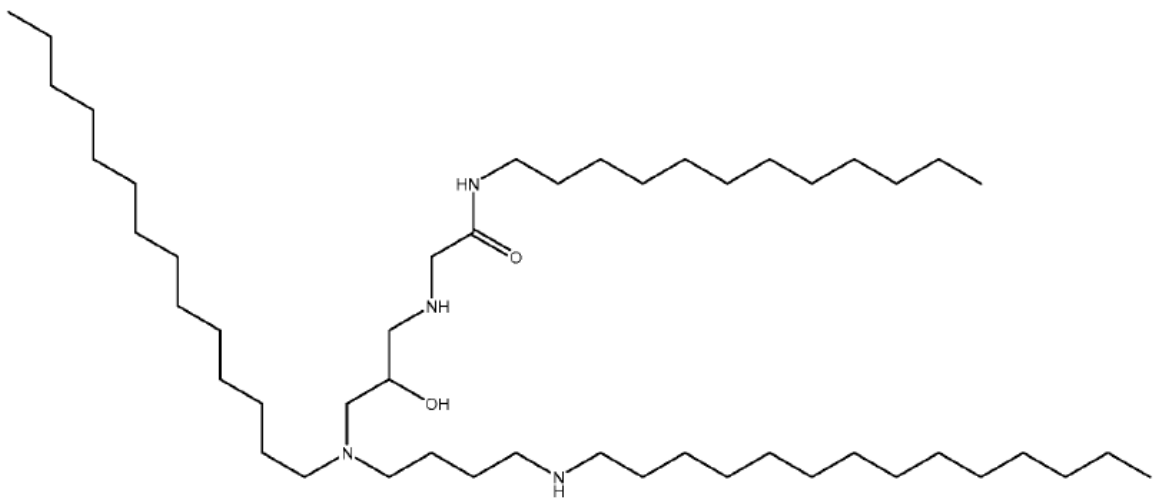
52



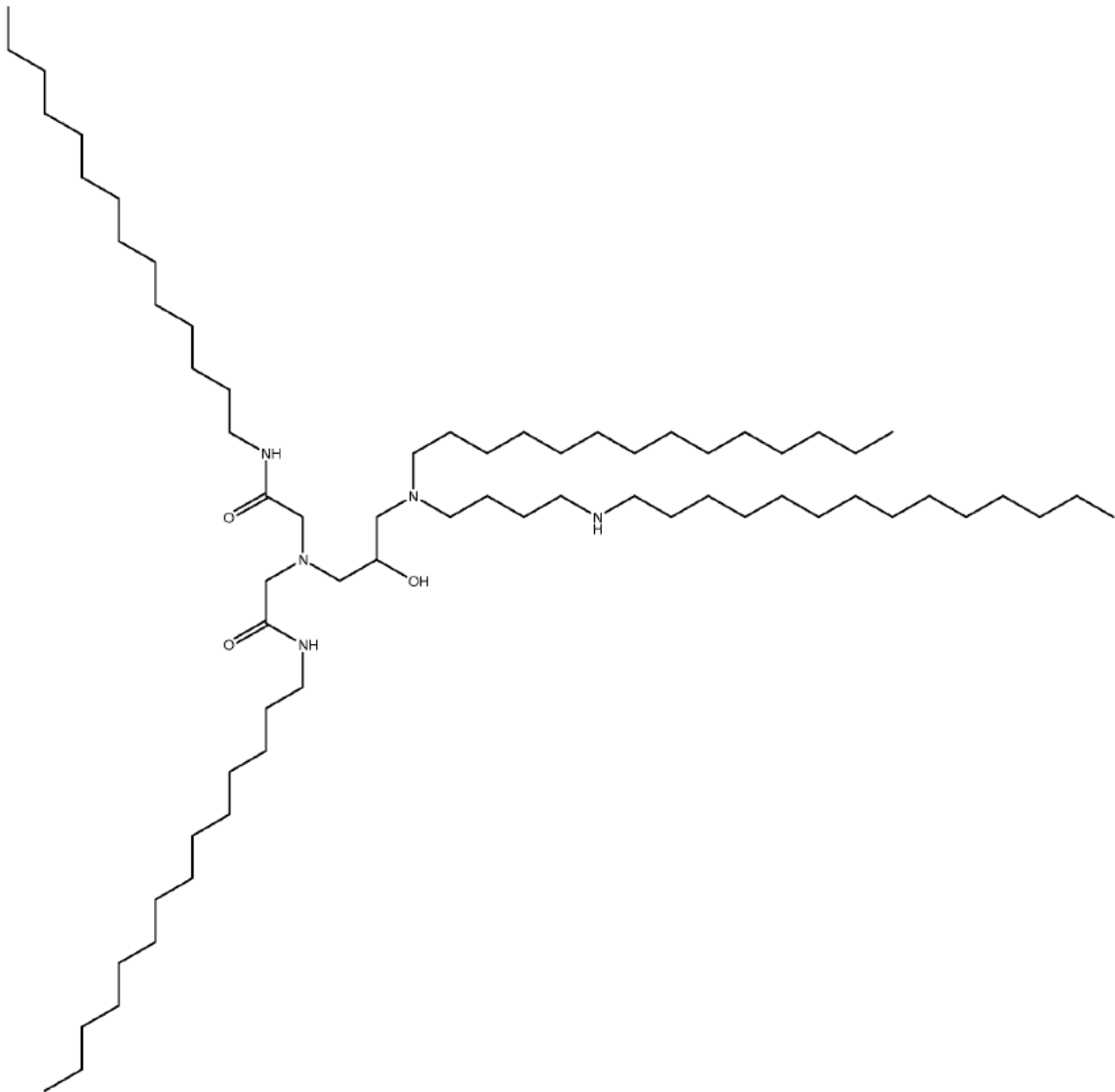
53

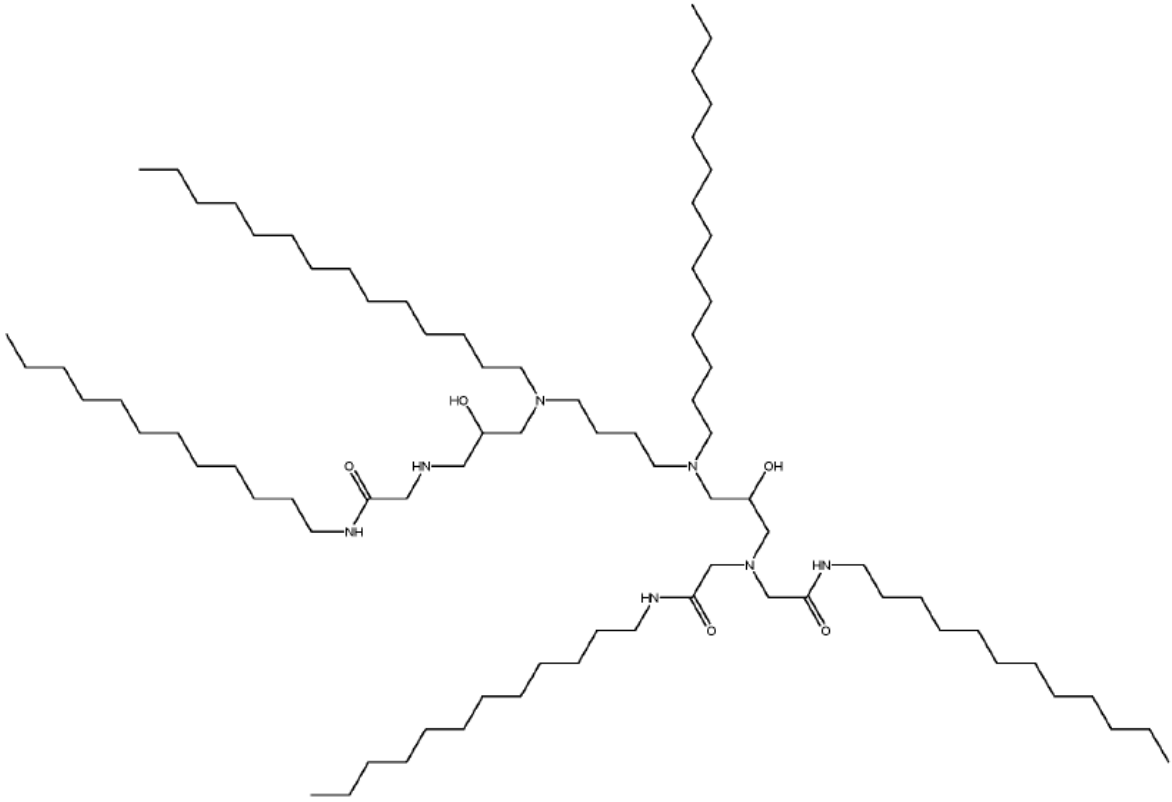


54

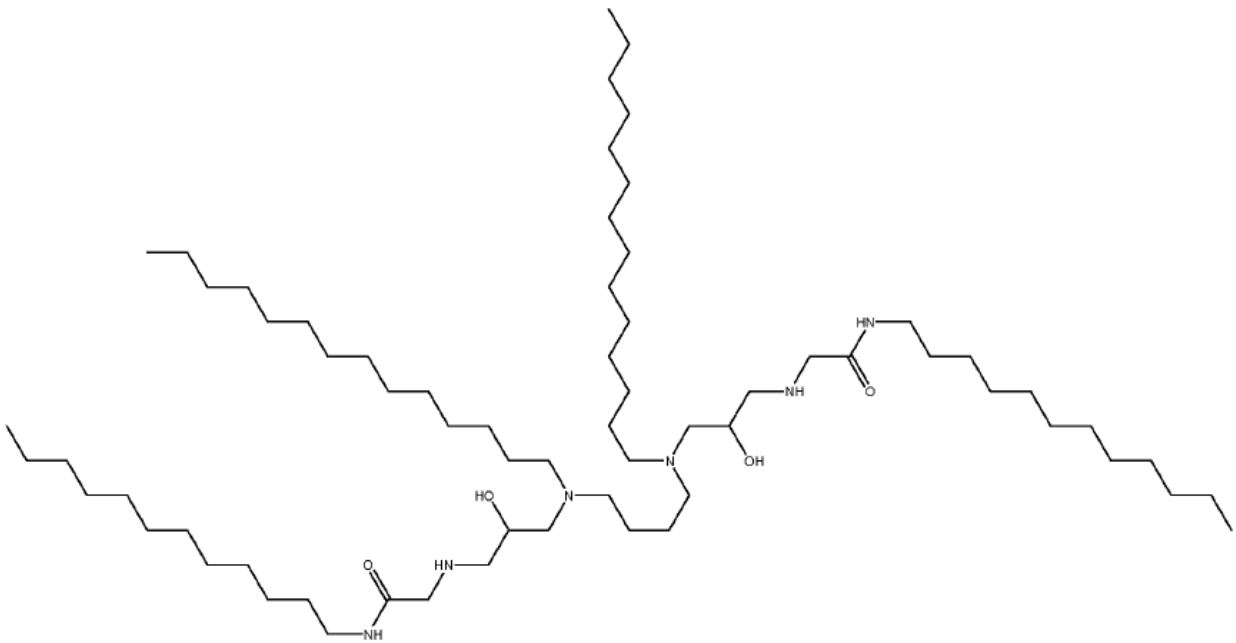


55

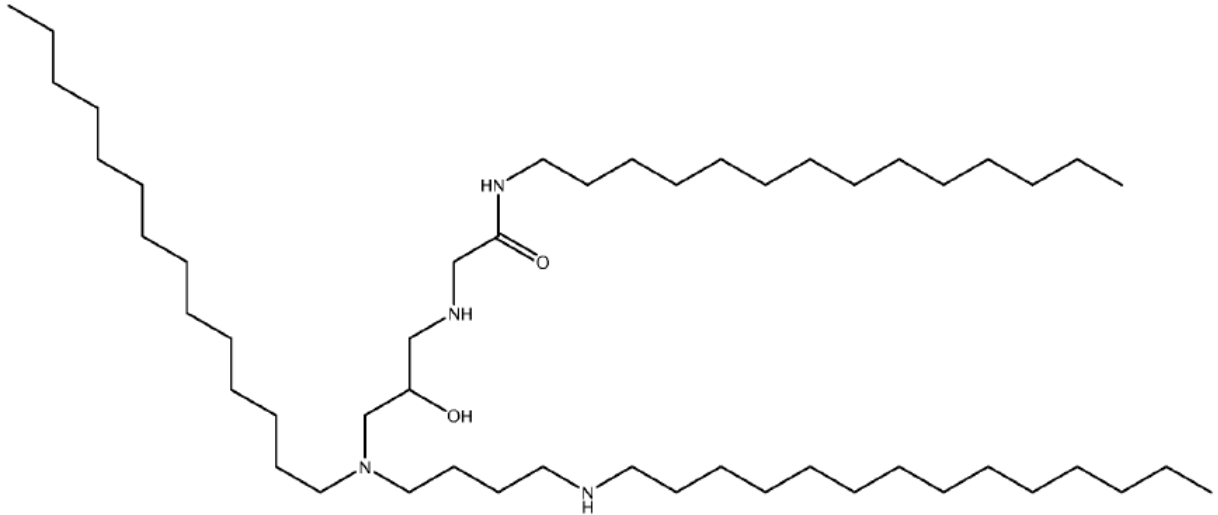




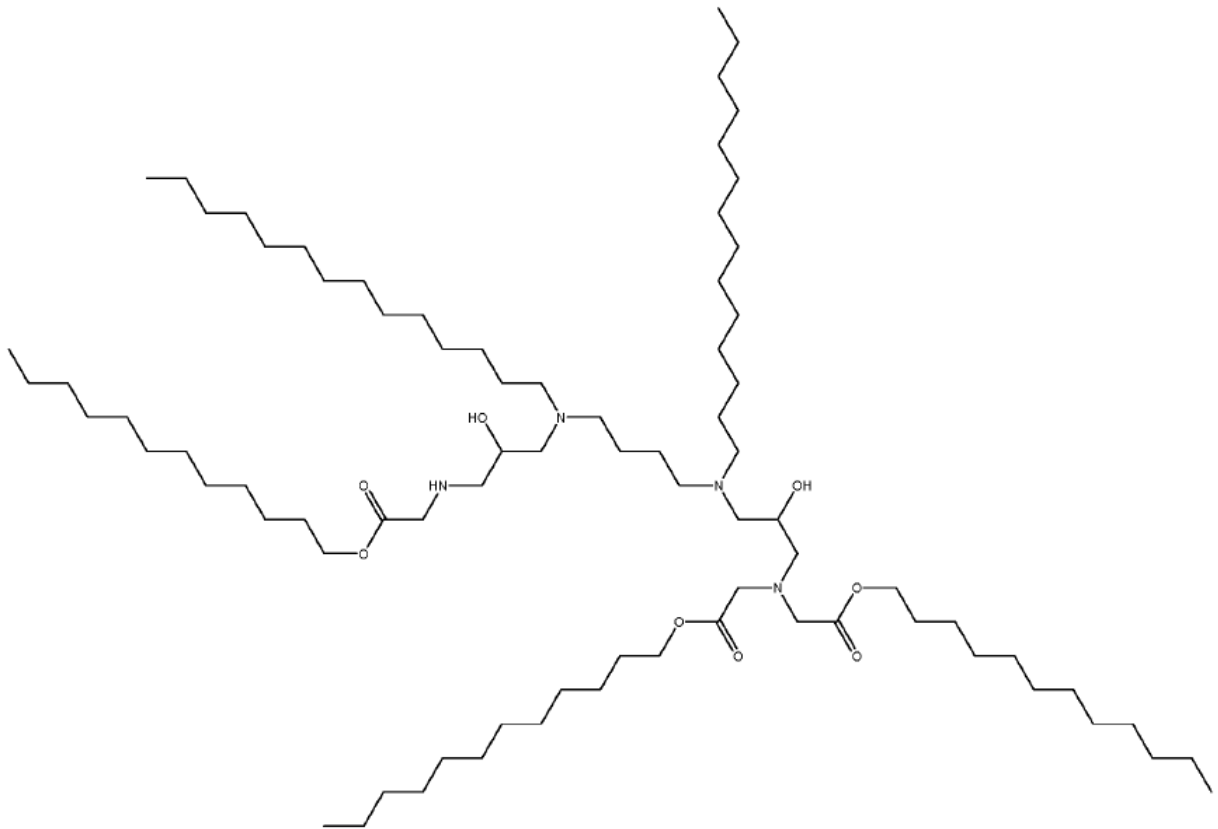
57



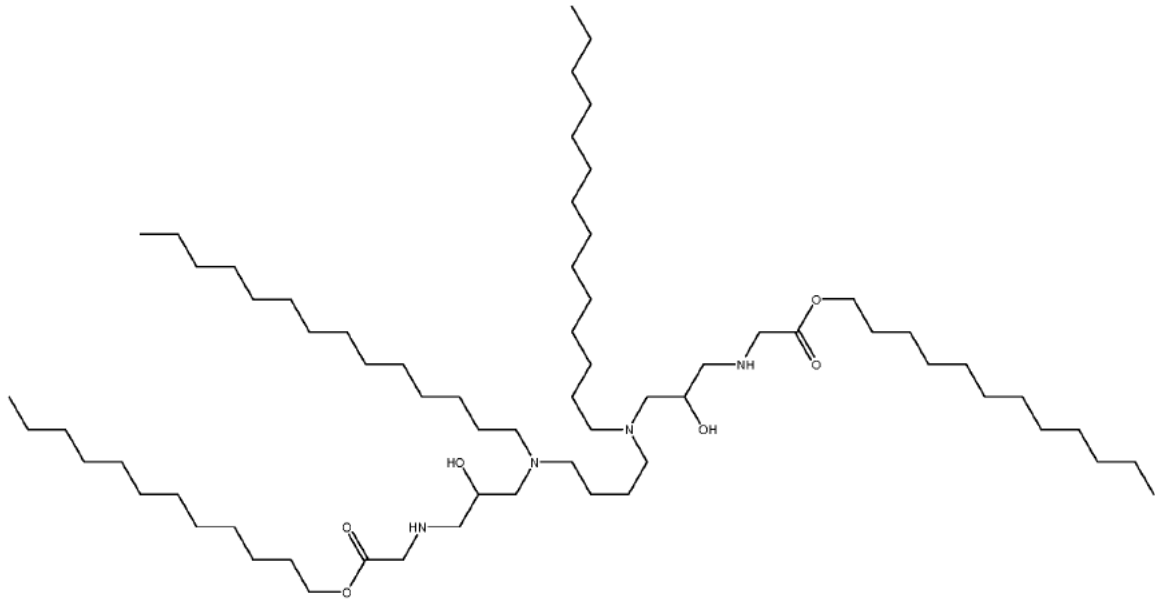
58



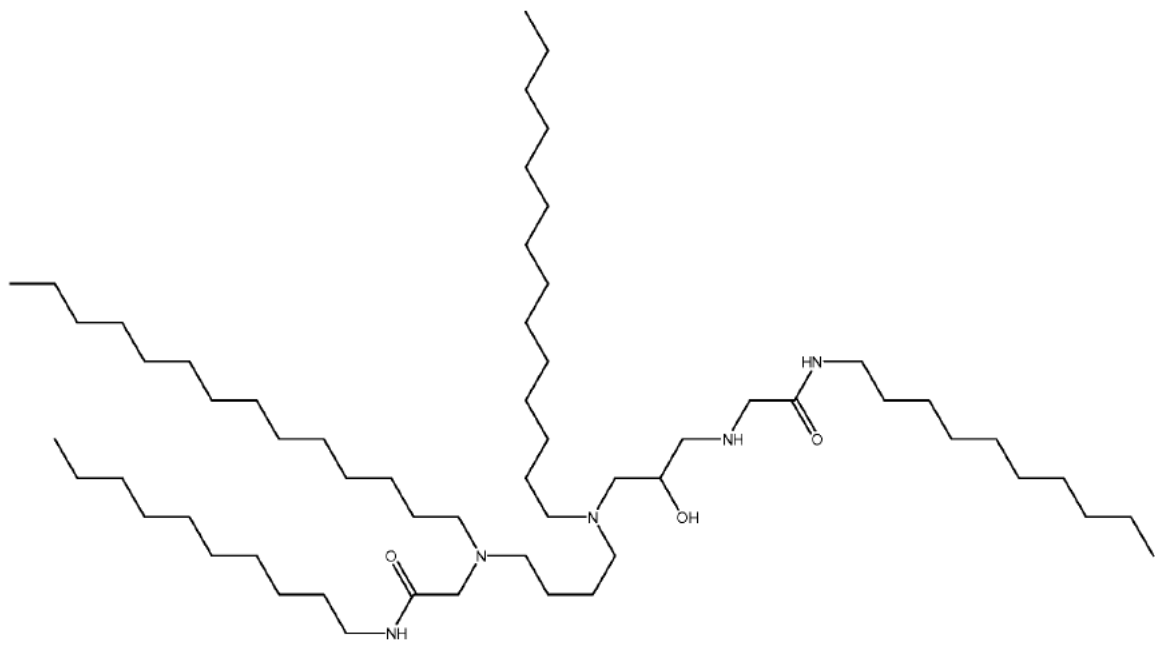
59



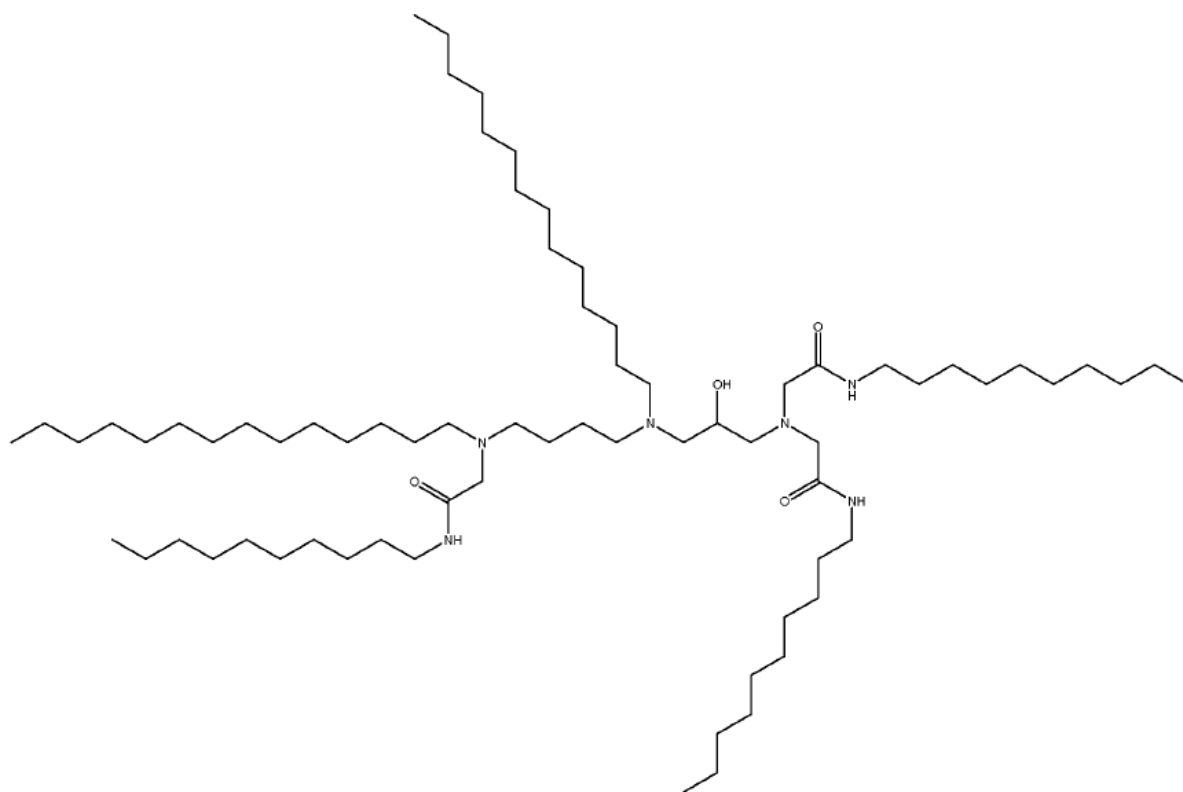
60



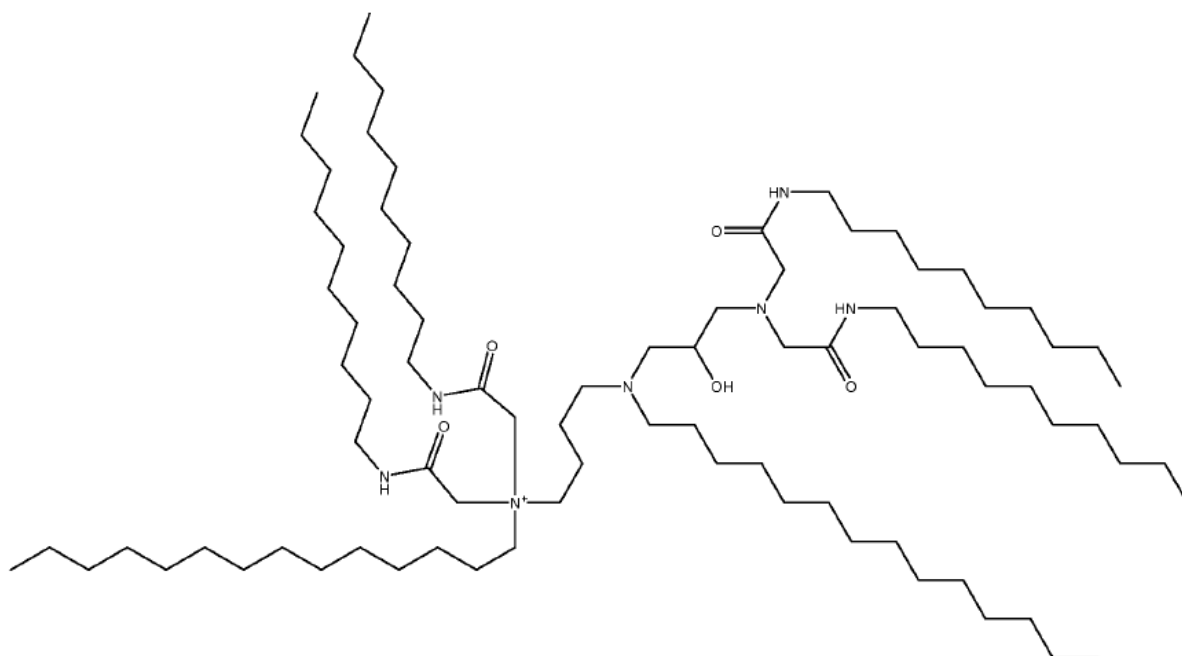
61



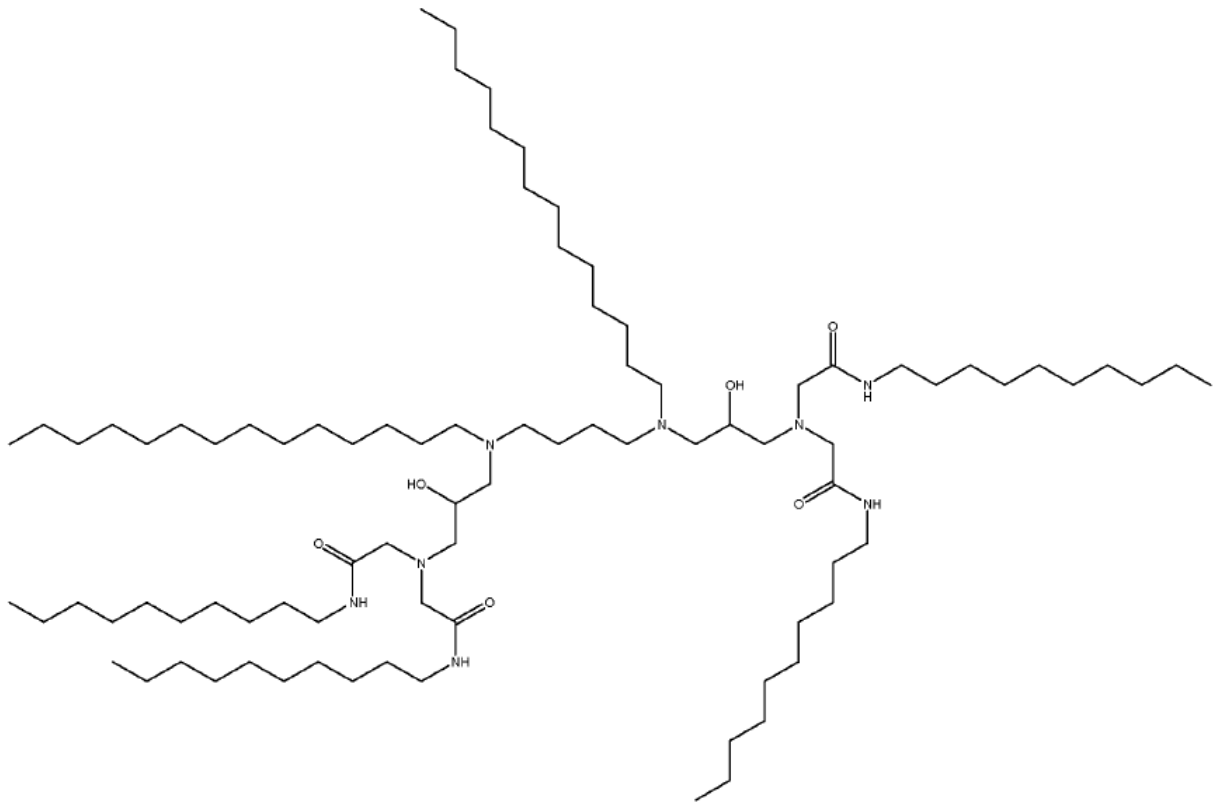
62



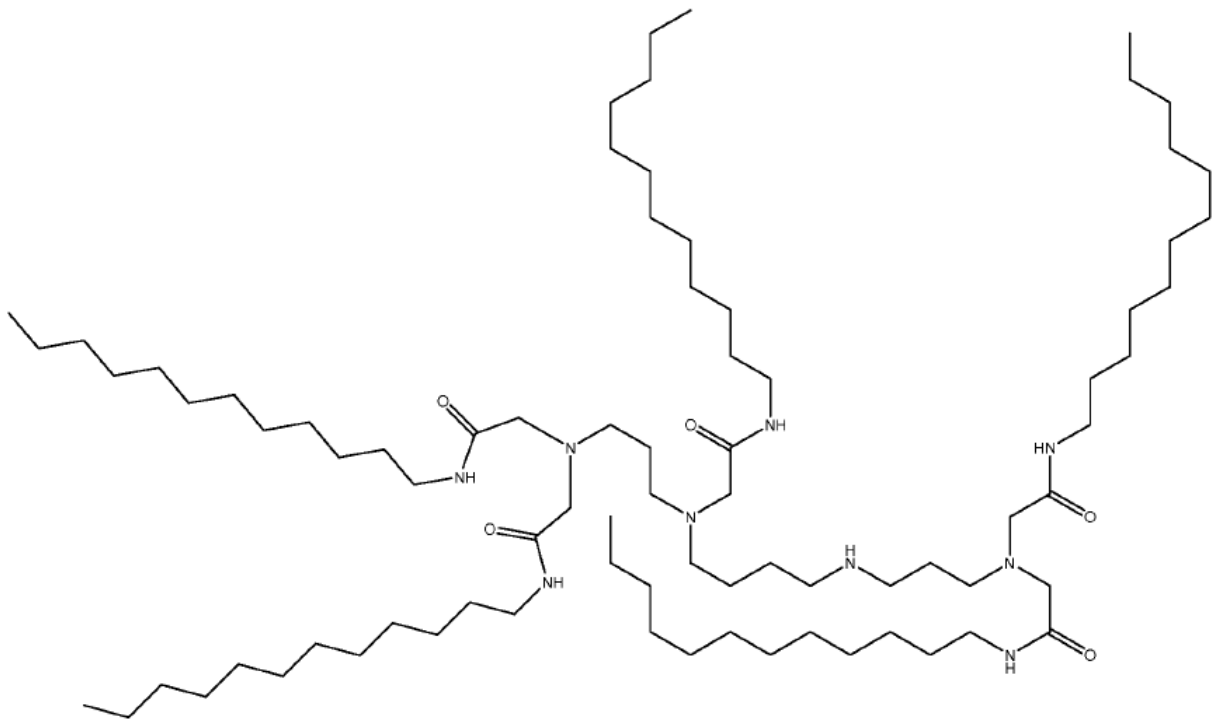
63



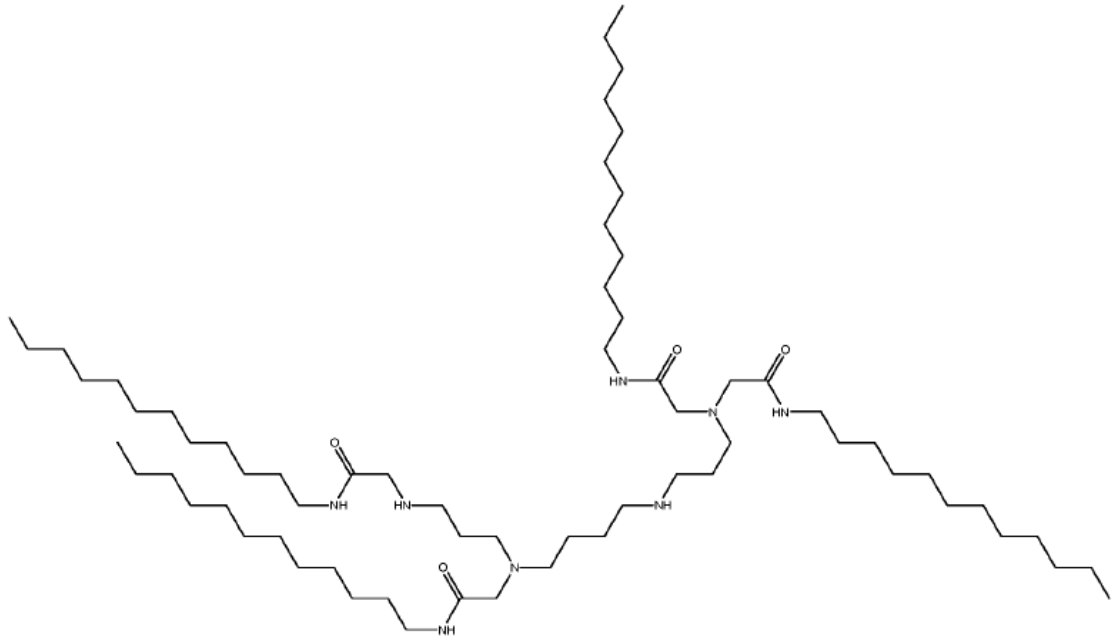
64



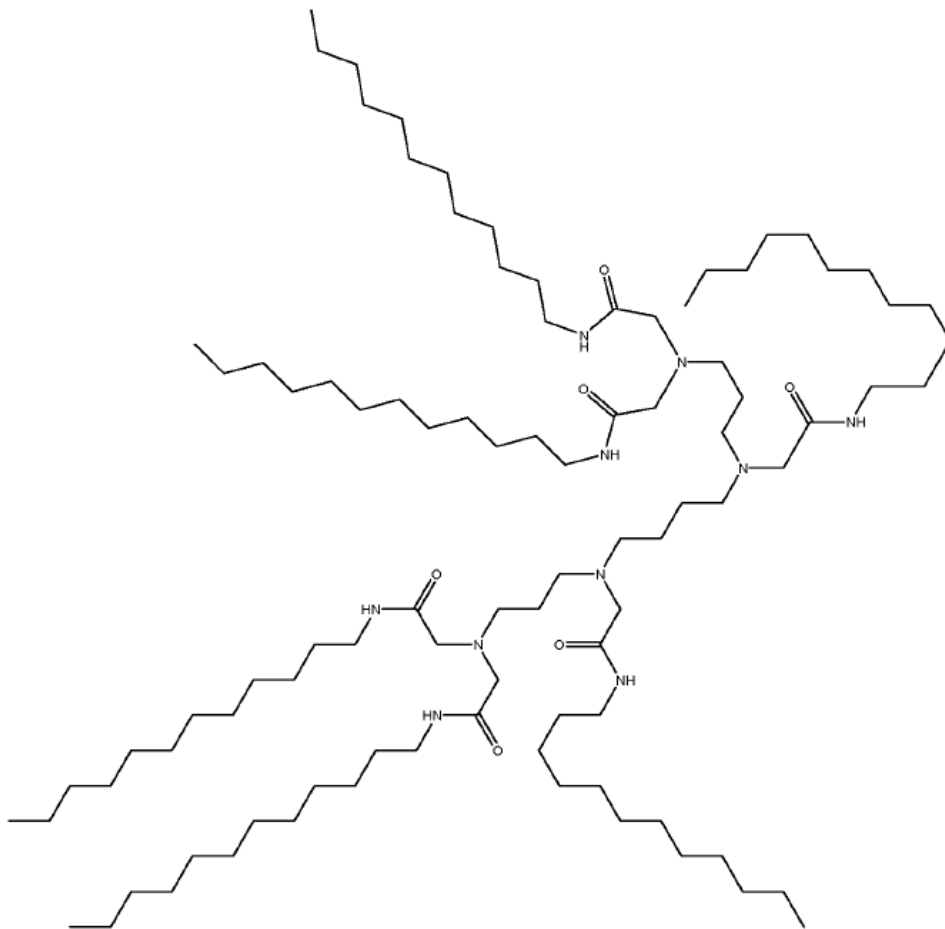
65



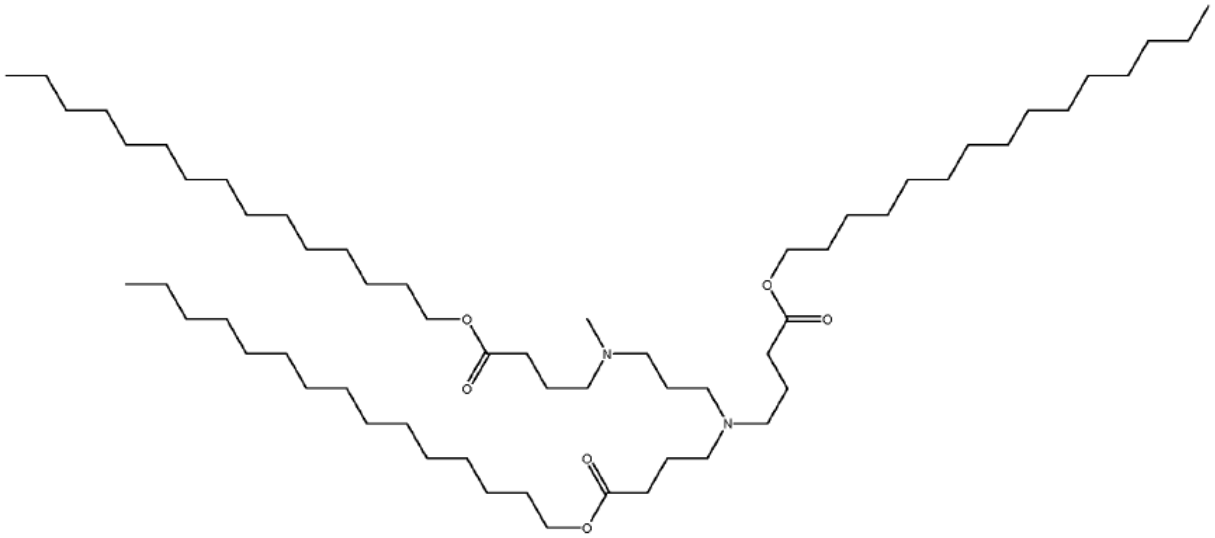
66



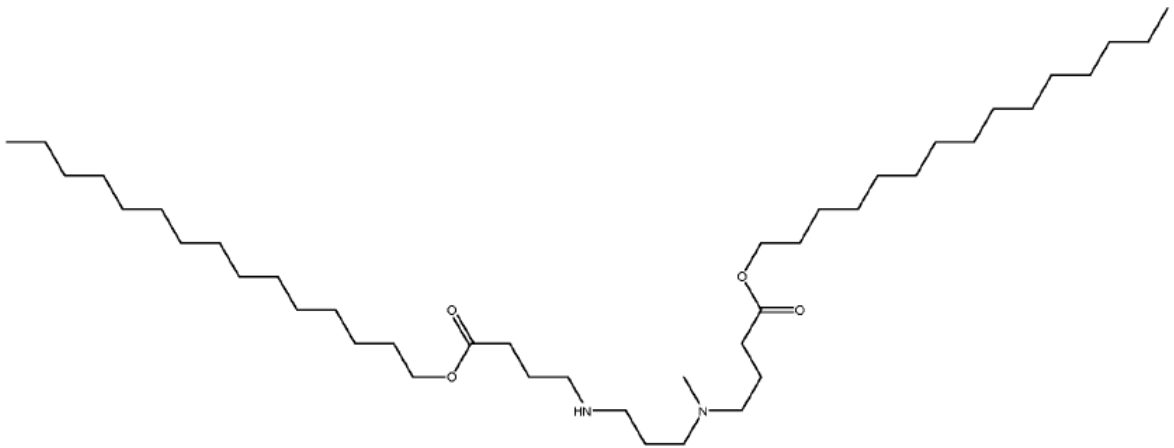
67



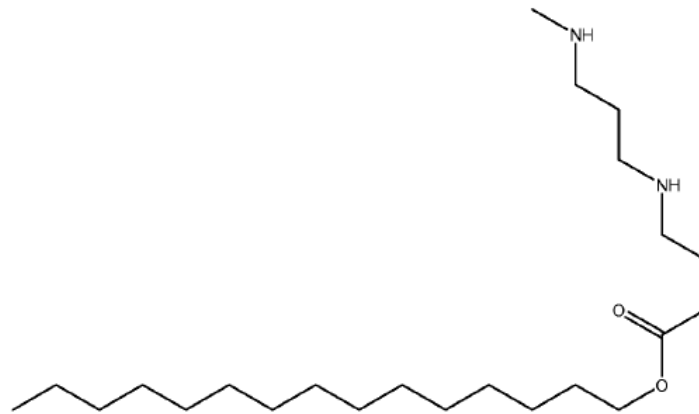
68



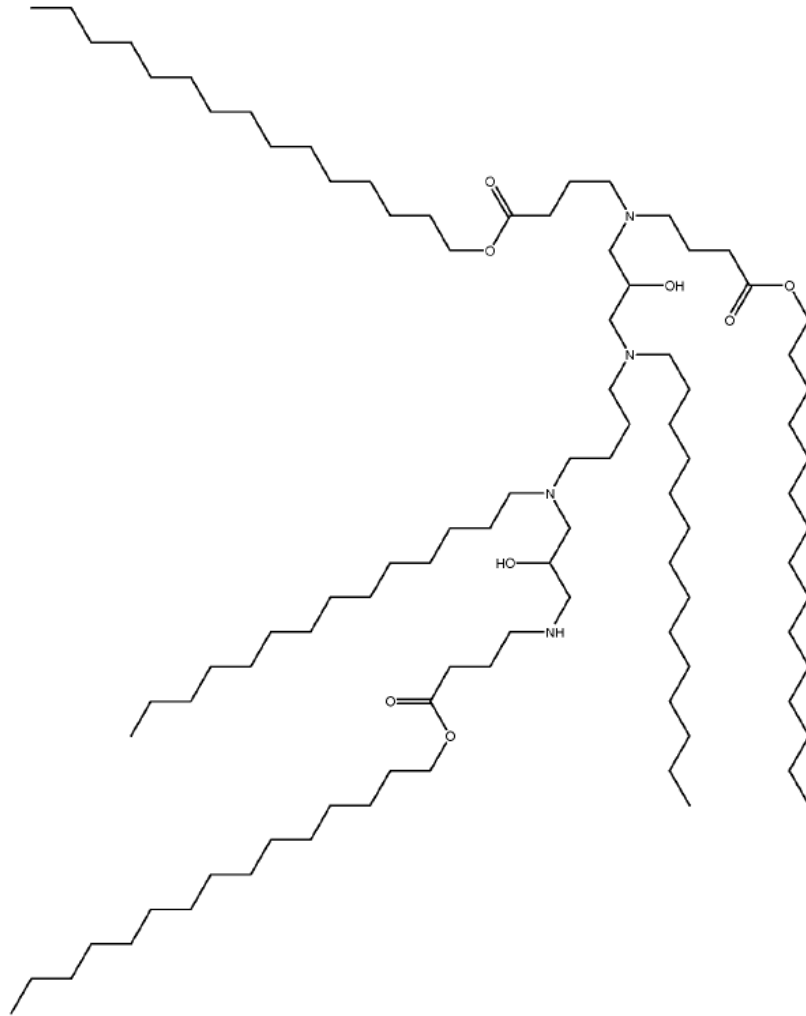
69



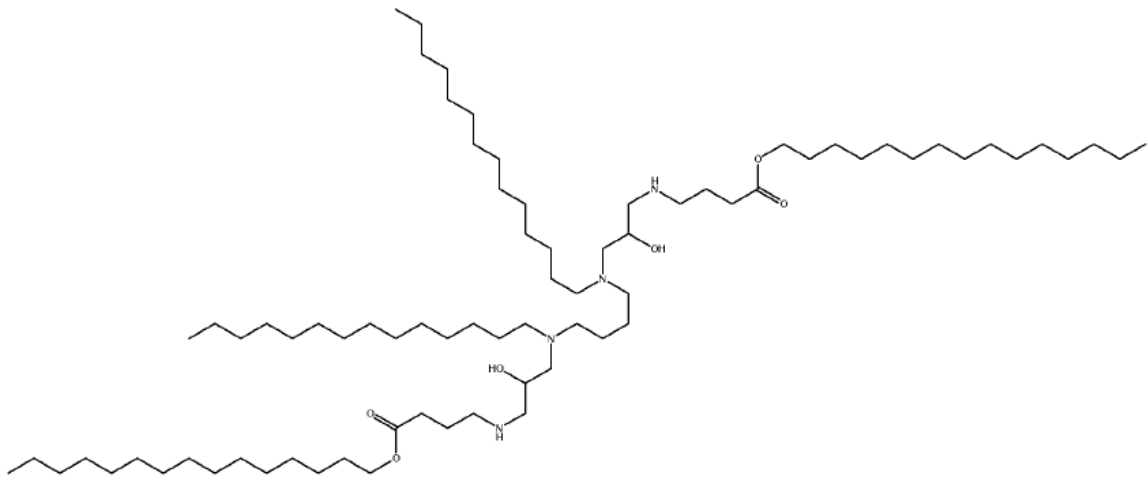
70



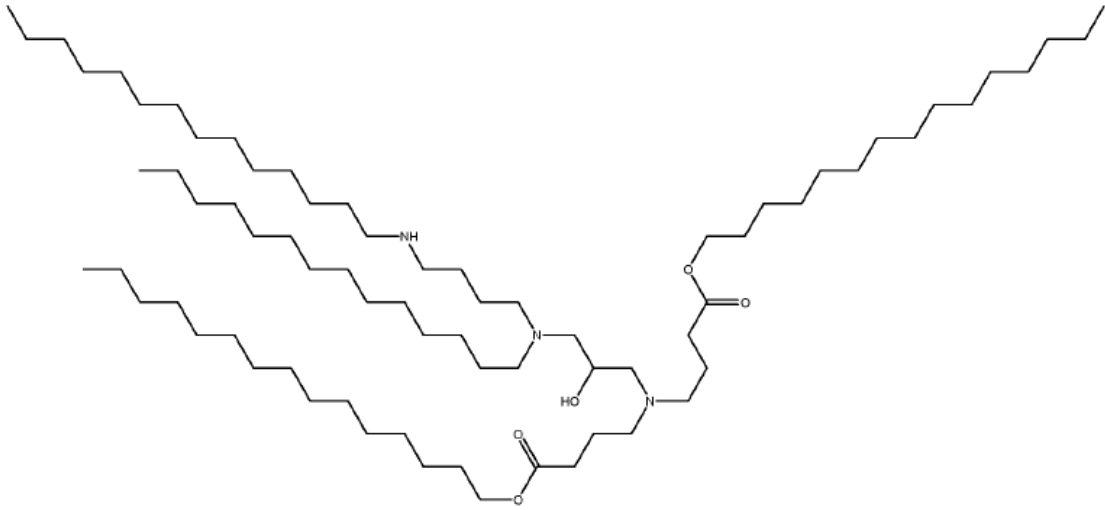
71



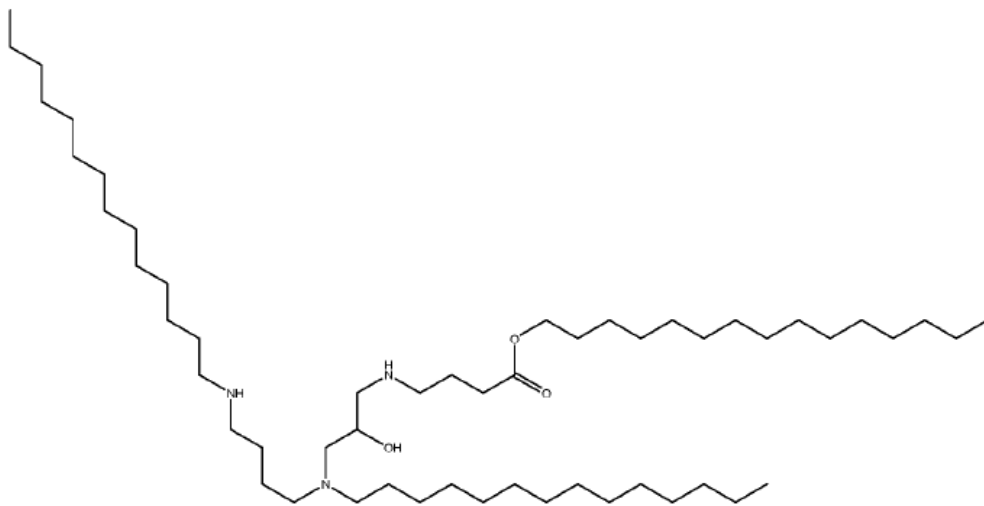
72



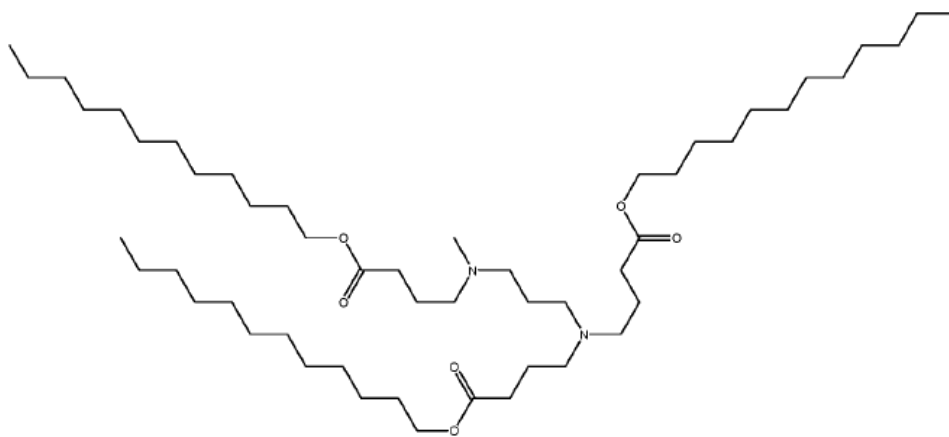
73



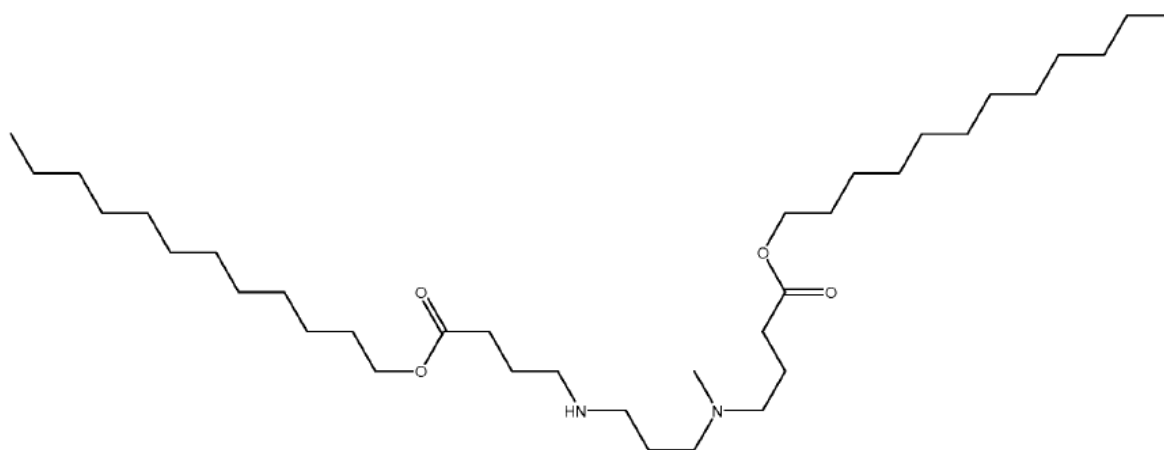
76



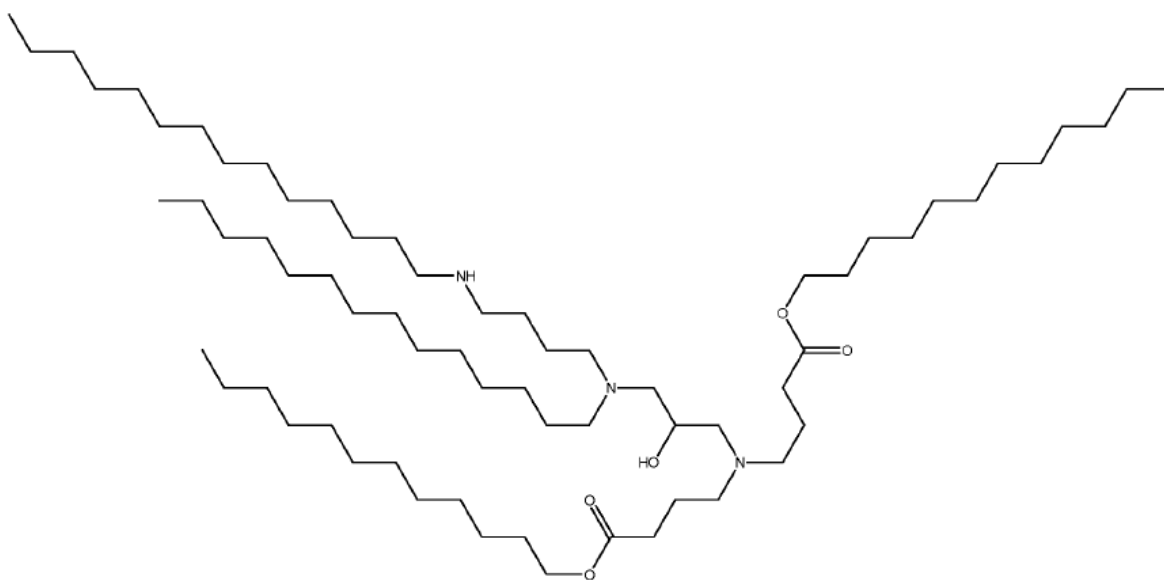
77



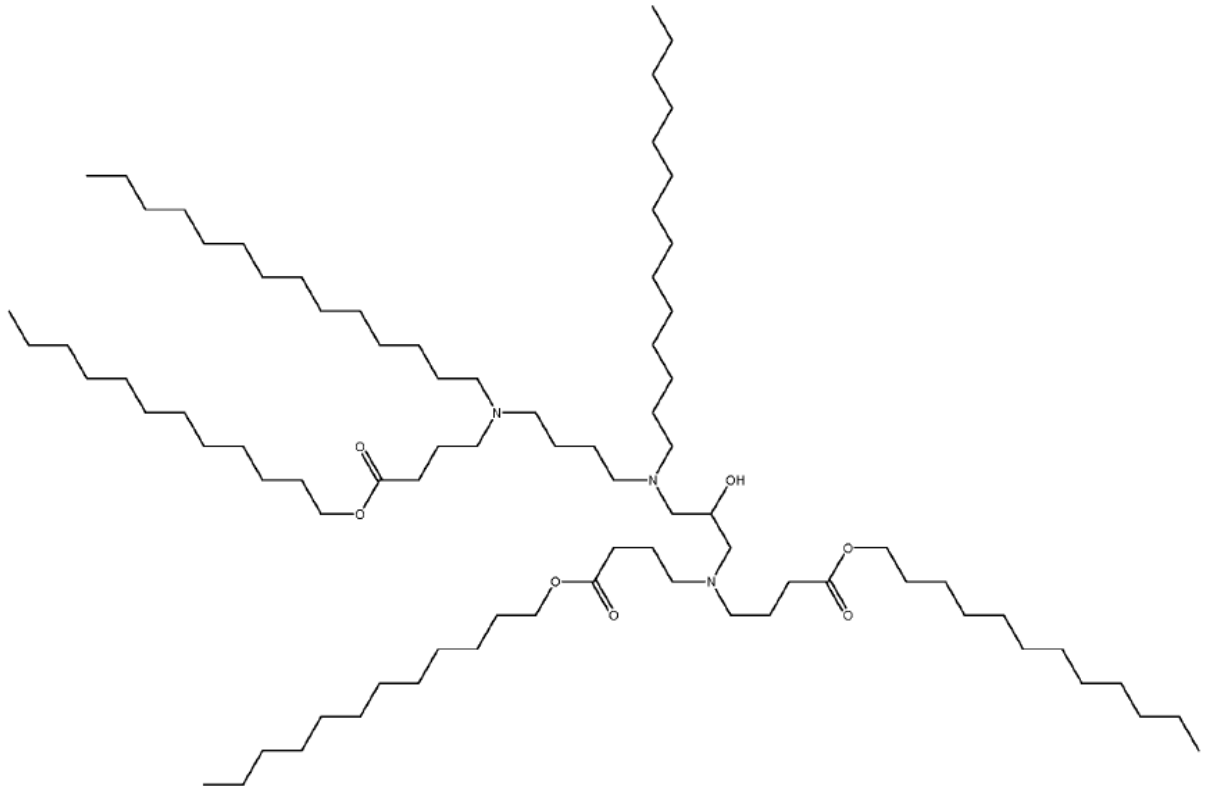
78



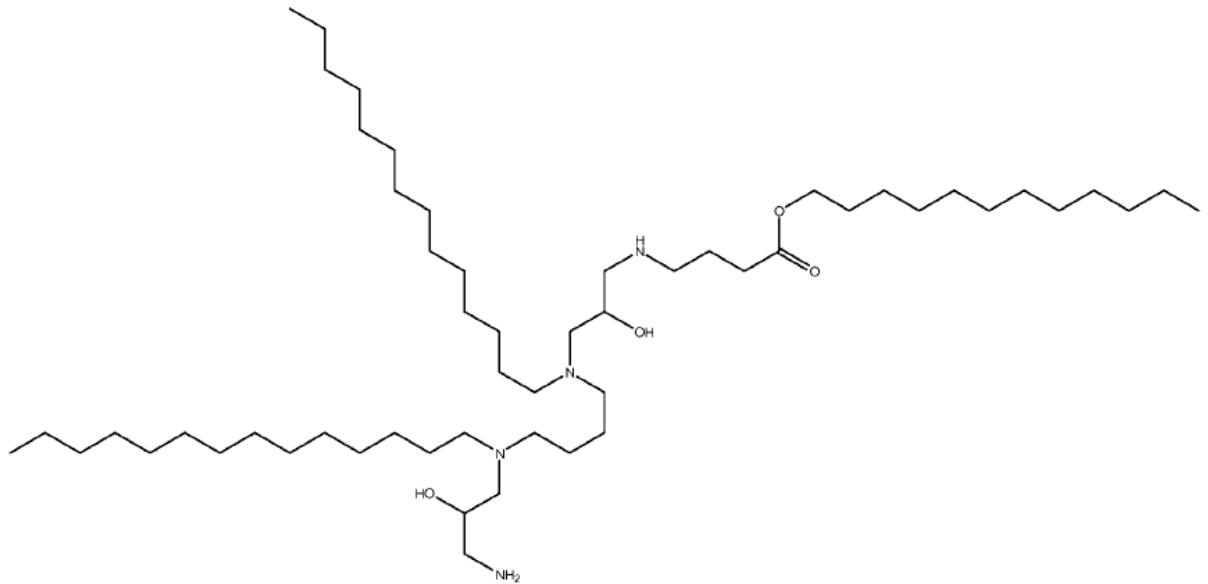
79



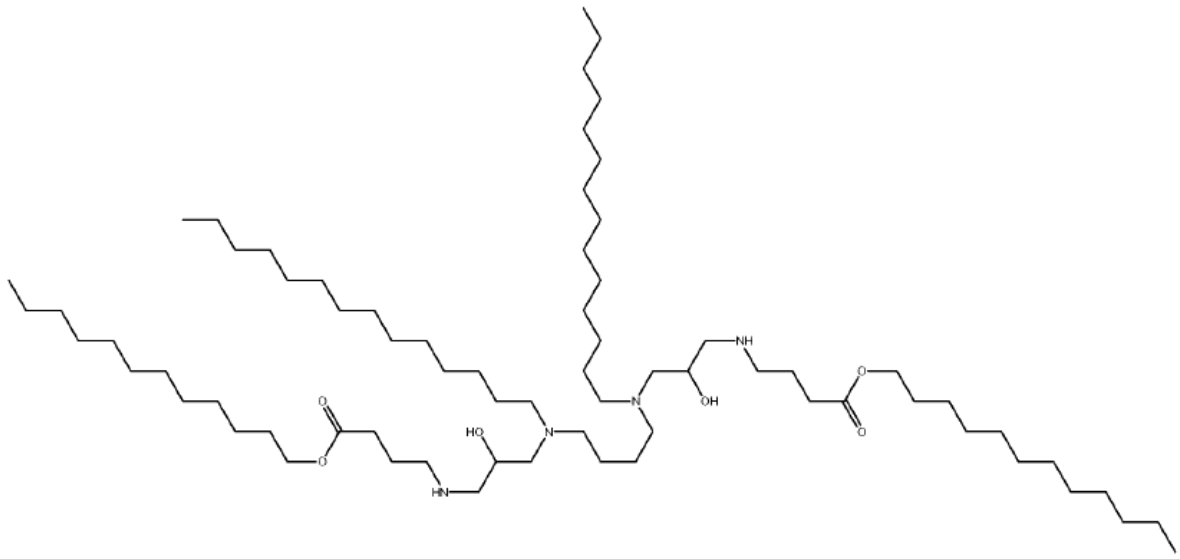
80



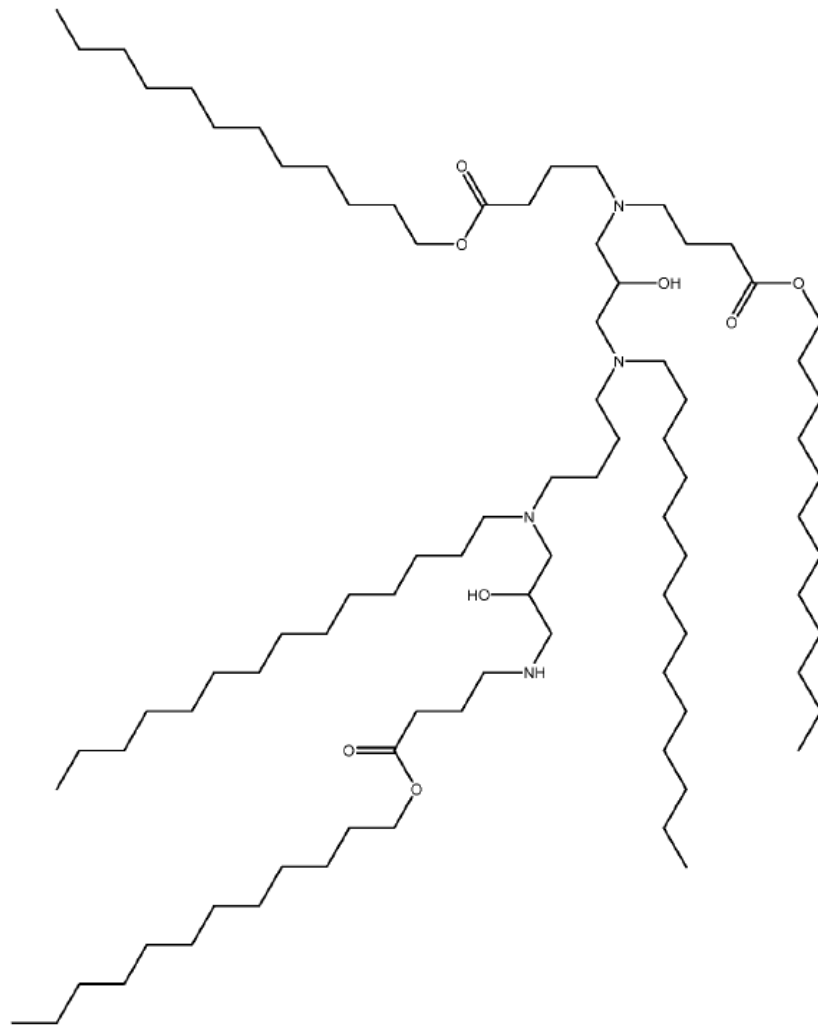
81



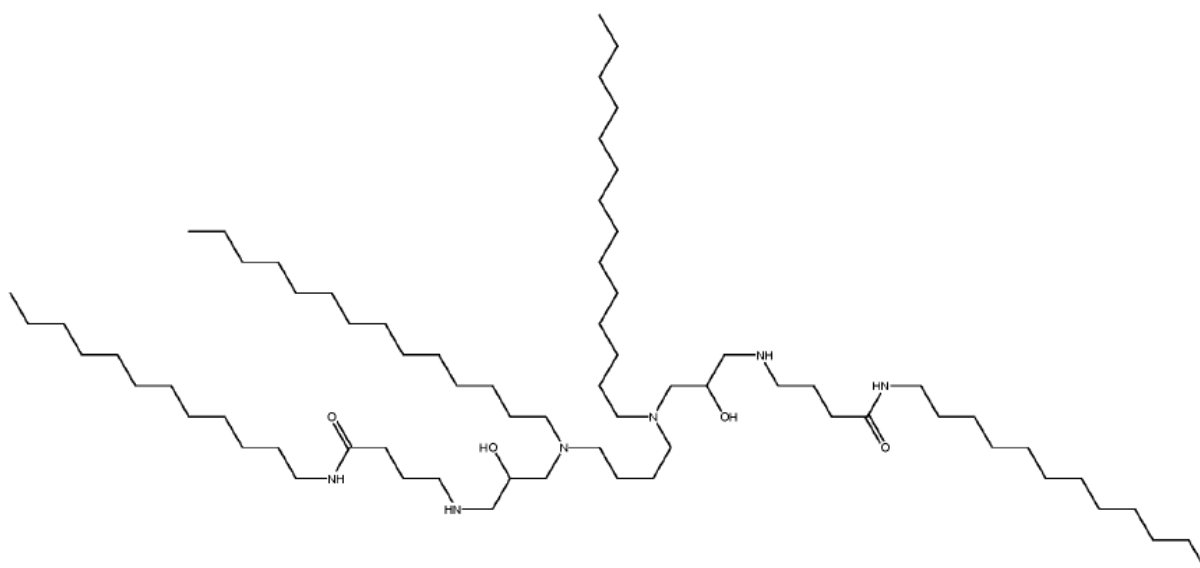
82



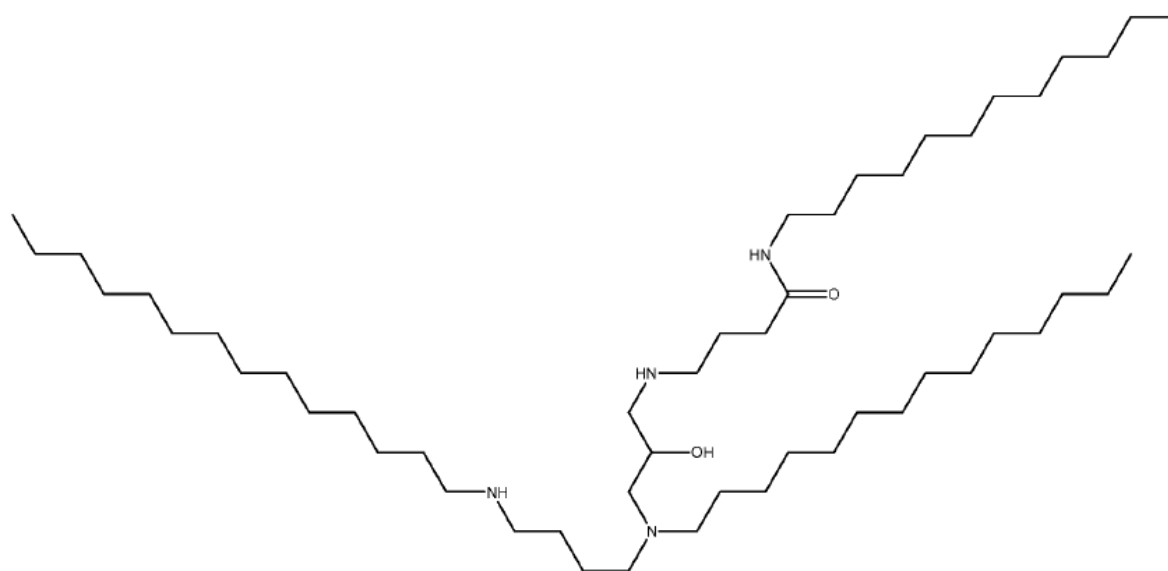
83



84



85



86

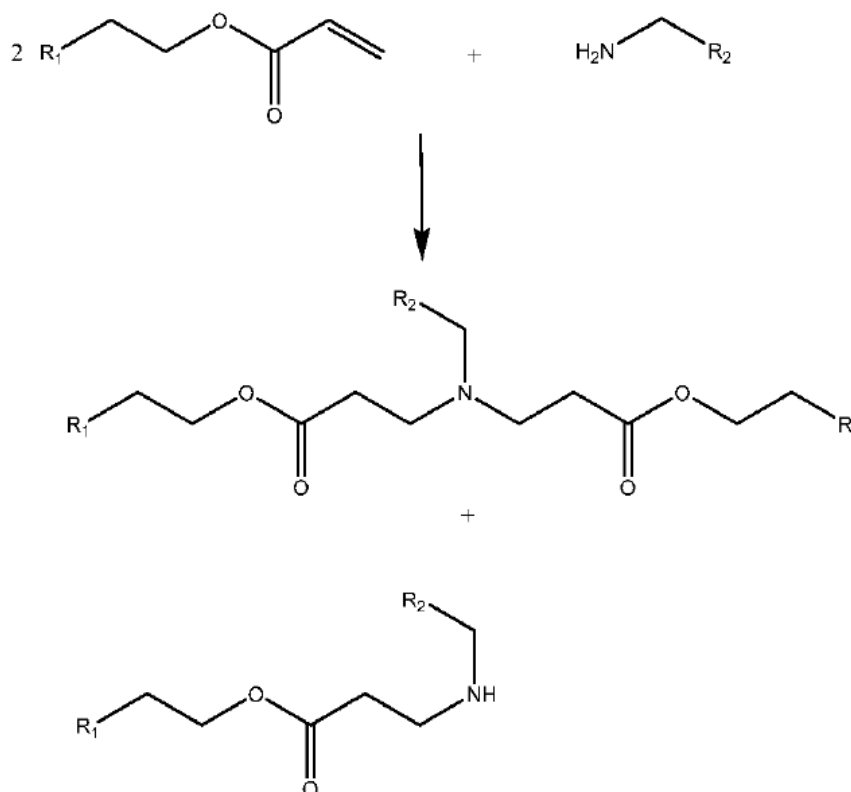
El compuesto 87 mostrado anteriormente se usó para preparar algunas composiciones lipídicas. Según un aspecto de la presente descripción, los compuestos descritos anteriormente se pueden sintetizar haciendo reaccionar un componente amino con un componente insaturado, por ejemplo, mediante la adición del grupo amino primario del componente amino a un enlace doble del componente insaturado, en el que el doble se conjuga con un grupo electrófilo tal como, por ejemplo, carbonilo. En general, el método sintético incluye hacer reaccionar un equivalente del componente amino con uno o más equivalentes del componente insaturado. El componente amino comprende una amina primaria $\text{NH}_2\text{-R}_3$, una diamina, una poliamina o una combinación de las mismas. El componente insaturado comprende al menos un primer intermedio que tiene la estructura $\text{R}_1\text{-X}_1\text{-Y-(CR}_4\text{R}_5)_n\text{-Br}$ y el segundo intermedio tiene la estructura $\text{R}_2\text{-X}_2\text{-Z-(CR}_6\text{R}_7)_m\text{-Br}$, en donde en las porciones $(\text{CR}_4\text{R}_5)_n$ y $(\text{CR}_6\text{R}_7)_m$ de las estructuras, cada R_4 es igual o diferente, cada R_5 es igual o diferente, cada R_6 es igual o diferente, y cada R_7 es igual o diferente, en el que el primer y segundo intermedios son iguales o diferentes. En algunos aspectos, el primer y/o segundo(s) intermedio(s) del componente insaturado puede ser un acrilato o acrilamida.

En ciertos aspectos, todos los grupos amino de la amina $\text{NH}_2\text{-R}_3$, una diamina o una poliamina reaccionan completamente con el componente insaturado para formar aminas terciarias. En otros aspectos, no todos los grupos amino reaccionan para formar aminas terciarias, lo que da como resultado aminas primarias o secundarias en la

molécula lipídica.

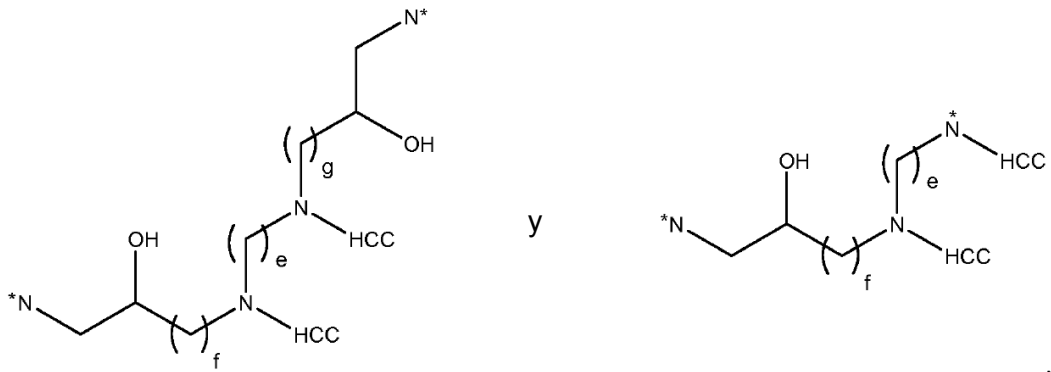
La síntesis de los compuestos descritos anteriormente se puede realizar con o sin disolvente, y la síntesis se puede realizar a temperaturas que oscilan entre la temperatura ambiente y aproximadamente 100°C, por ejemplo, a aproximadamente 95°C. La reacción puede catalizarse opcionalmente añadiendo un ácido, una base o un metal. Los expertos en la técnica pueden seleccionar las condiciones óptimas en las que se lleva a cabo la síntesis, para elegir un catalizador apropiado, si es necesario, y para seleccionar la relación molar entre el componente amino y el componente insaturado. Por ejemplo, cuando el componente amino es la amina primaria NH₂-R₃, la relación molar entre el componente insaturado y la amina primaria NH₂-R₃ puede estar entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 6:1. Los lípidos preparados pueden purificarse opcionalmente. Los lípidos también se pueden alquilar usando un haluro de alquilo (por ejemplo, yoduro de metilo) u otro agente alquilante.

En un aspecto ejemplar, el proceso sintético se puede ilustrar mediante el siguiente esquema de reacción:



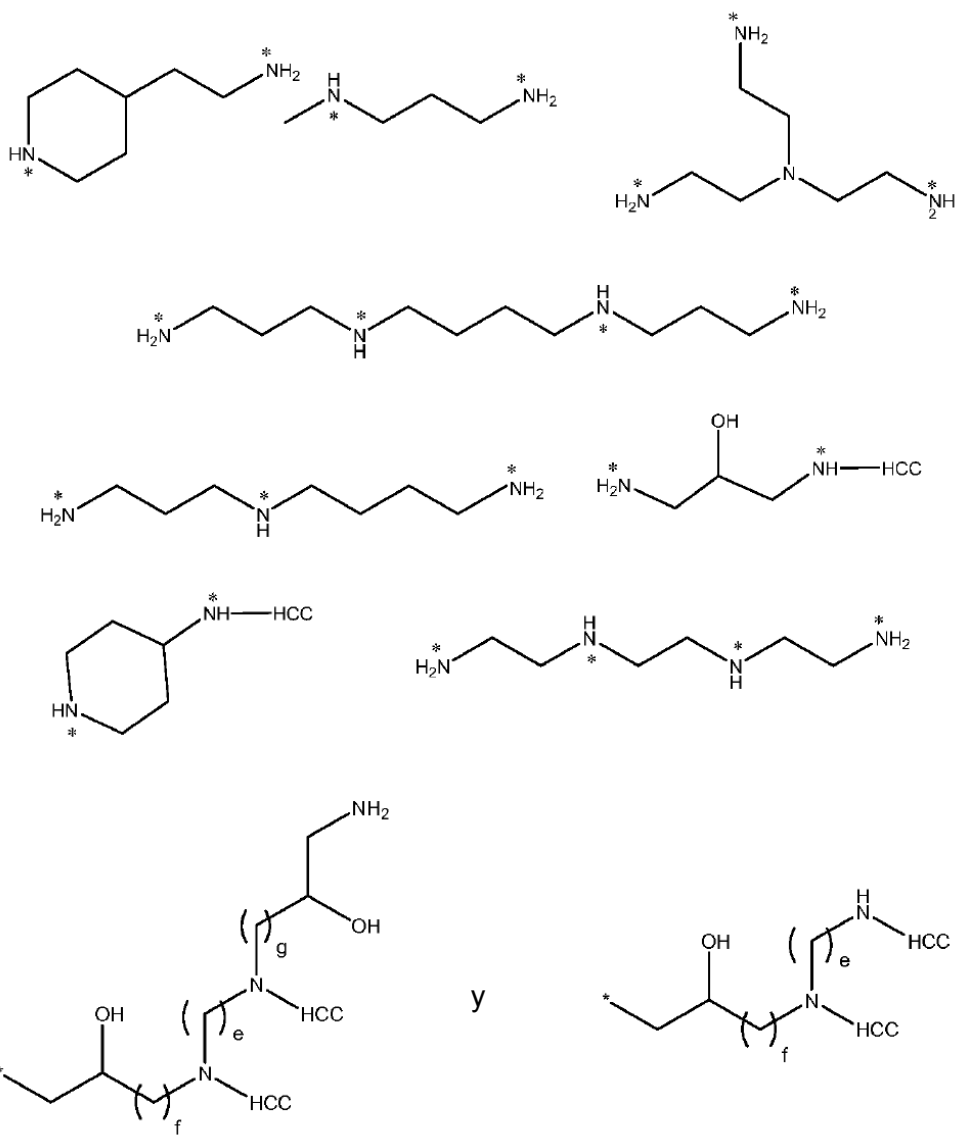
En las estructuras proporcionadas anteriormente del primer y segundo intermedios que comprenden el componente insaturado, cada uno de X₁ y X₂ es un resto seleccionado independientemente del grupo que consiste en O, S, N-A y C-A, en donde A se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y una cadena de hidrocarburo C₁-C₂₀; cada uno de Y y Z es un resto seleccionado independientemente del grupo que consiste en CH-OH, C=O, C=S, S=O y SO₂; cada uno de R₁, R₂, R₄, R₅, R₆ y R₇ es un resto independientemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alifático cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, un grupo cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, grupo heteroalifático ramificado o no ramificado, un grupo acilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, un grupo arilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, un grupo heteroarilo ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido, y cada n y m es un número entero independientemente que tiene el valor entre 1 y 3, inclusive.

En algunos aspectos, si al menos uno de n o m en las estructuras provistas anteriormente del primer y segundo intermedio del componente insaturado tiene el valor de 2, y la amina primaria NH₂-R₃ se usa como el componente amino, entonces R₃ en la estructura proporcionada anteriormente de la amina primaria es cualquiera de los siguientes restos:



donde cada uno de g , e y f es un número entero que tiene independientemente el valor entre 1 y 6, inclusive, "HCC" simboliza una cadena de hidrocarburo, y cada $*$ indica un punto de unión de R_3 al grupo amino en la amina primaria NH_2-R_3 .

- 5 En algunos aspectos, cada uno de R_1 y R_2 en las estructuras provistas anteriormente de los primeros y segundos intermedios del componente insaturado es independientemente cualquiera de los grupos alquilo o alquenilo sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados que tienen entre 3 y aproximadamente 20 átomos de carbono, tal como entre 8 y aproximadamente 18 átomos de carbono, y entre 0 y 4 dobles enlaces, como entre 0 y 2 dobles enlaces.
- 10 En algunos aspectos, si en las estructuras proporcionadas anteriormente del primer y segundo intermedios del componente insaturado, cada uno de n y m tiene independientemente el valor de 1 ó 3, y la amina primaria NH_2-R_3 se usa como el componente amino, R_3 en la estructura proporcionada anteriormente de la amina primaria puede ser cualquiera de los siguientes restos:



en donde cada "HCC" simboliza una cadena de hidrocarburo, y cada * muestra un punto potencial de unión de R_3 grupo amino en la amina primaria NH_2-R_3 , donde cada H en cualquier posición * puede reemplazarse para lograr la unión al átomo de nitrógeno en la amina primaria NH_2-R_3 .

- 5 Los compuestos descritos anteriormente pueden usarse en la administración de agentes biológicamente activos o terapéuticos a un sujeto, a un animal, a una célula o a un tejido in vitro o in vivo. En ciertas realizaciones ilustrativas, los compuestos pueden ser particularmente adecuados para administrar agentes bioactivos cargados negativamente. Por ejemplo, el compuesto de transfección que contiene amina de la presente invención se puede usar para suministrar ADN, ARN, otros polinucleótidos, otros aniones o polianiones a un sujeto o a una célula.
- 10 En algunas realizaciones, los lípidos se combinan con un agente para formar complejos de transfección, tales como micropartículas, liposomas o micelas. El agente bioactivo a administrar (por ejemplo, un polinucleótido, una proteína, un péptido o una molécula pequeña) por estos vehículos de administración puede estar en forma sólida o líquida o disuelta. Los lípidos se pueden combinar con otros lípidos, polímeros, tensioactivos, colesterol, carbohidratos, proteínas, etc. para formar las partículas. Estas partículas pueden combinarse con un excipiente farmacéutico para formar composiciones farmacéuticas.
- 15

El lípido sintetizado, como se describe anteriormente, puede purificarse adicionalmente mediante cualquier técnica conocida, tal como por cristalización, cromatografía, precipitación (por ejemplo, precipitaciones repetidas en éter dietílico, hexano u otro disolvente orgánico) o destilación. El lípido también puede aislarse como una sal que puede formarse cuando el lípido se hace reaccionar con un ácido orgánico o ácido inorgánico. En algunas realizaciones, si el lípido comprende el resto de amina terciaria, se puede alquilar con cualquier agente alquilante, por ejemplo, haluros de alquilo tales como yoduro de metilo para formar una sal de amonio cuaternaria del lípido. El anión

20

asociado con la amina cuaternaria puede ser cualquier anión orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el proceso sintético da como resultado una mezcla de isómeros que tienen colas acrílicas, con números y posiciones variables de las colas de acrilato. Dichas mezclas se pueden usar con o sin purificación adicional, según se desee. Cuando una amina no está alquilada de forma exhaustiva, los productos resultantes pueden hacerse reaccionar además con otro electrófilo, como un acrilato o acrilamida, opcionalmente seguido de una purificación adicional.

En algunas realizaciones, se puede preparar una biblioteca de diferentes lípidos en paralelo. Para ese fin, se puede agregar una amina diferente y/o un componente insaturado a cada vial en un conjunto de viales o en cada pocillo de una placa de múltiples pocillos. La serie de mezclas de reacción se incuban a una temperatura y un tiempo suficientes para permitir que se produzca la formación de los lípidos. Luego, los lípidos se pueden aislar y purificar utilizando técnicas conocidas, seguidas de la selección utilizando técnicas de alto rendimiento para identificar los lípidos con una característica deseada (por ejemplo, solubilidad, capacidad para unirse a polinucleótidos, capacidad para unirse a la heparina, capacidad para unirse a moléculas pequeñas, capacidad para formar micropartículas, capacidad para aumentar la eficacia de transfección y similares).

15 Complejos de transfección

Un objeto adicional de la presente descripción es proporcionar nuevos complejos de transfección que estén formulados para administrar un compuesto biológicamente activo a una célula o un tejido *in vitro*, o a una célula o tejido en un animal *in vivo*. La administración de un agente biológicamente activo a las células o tejidos, como se contempla en el presente documento, puede ser para proporcionar una modalidad terapéutica para el tratamiento de un trastorno, o puede proporcionarse alternativamente durante el curso de la investigación científica (por ejemplo, como una herramienta de investigación).

En algunas realizaciones, un complejo de transfección como se proporciona en el presente documento puede incluir el agente de transfección que contiene amina formulados como un agregado lipídico de modo que el agente biológicamente activo pueda administrarse a una célula o un tejido para provocar una respuesta biológica deseada. En algunas realizaciones, un complejo de transfección puede incluir opcionalmente uno o más lípidos coadyuvantes. En una realización, un complejo de transfección puede incluir opcionalmente uno o más lípidos pegilados. En una realización, un complejo de transfección puede incluir opcionalmente uno o más restos dirigidos o potenciadores de la transfección.

El complejo de transfección comprende el compuesto 87, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina es de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 50% del agregado lipídico; en otras realizaciones, el porcentaje molar del lípido catiónico es de aproximadamente 20% a aproximadamente 40% del complejo de transfección; en algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina es de aproximadamente 25% a aproximadamente 35% del agregado lipídico; o, en algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina es aproximadamente el 33% del agregado lipídico. En algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina está entre aproximadamente el 15% y aproximadamente el 35% del agregado lipídico; en otras realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina está entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 30% del agregado lipídico; o en algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina es aproximadamente el 25% del agregado lipídico.

En algunas realizaciones, un complejo de transfección puede incluir opcionalmente uno o más lípidos coadyuvantes. Ejemplos ilustrativos, aunque no limitativos, de lípidos coadyuvantes adecuados para su uso en la formulación de los complejos de transfección que se describen en este documento incluyen colesterol, derivados del colesterol, esteroides, incluidos los fitoesteroides, zoosteroides y hopanoides, o cualquiera de los lípidos neutros o catiónicos que se sabe que permiten o facilitan la introducción de moléculas bioactivas exógenas en el interior de una célula o de un tejido. En algunas realizaciones, se puede usar más de un lípido coadyuvante en la formulación de los complejos de transfección descritos en el presente documento. Los lípidos neutros o catiónicos ejemplares, aunque no limitativos, contemplados para su uso en la preparación de los complejos de transfección descritos en este documento pueden incluir uno o más lípidos seleccionados de entre los siguientes: BMOP (bromuro de N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-propanoamónio), DDPES (Dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermidamida), DSPC, CTAB:DOPE (formulación de bromuro de cetiltrimetilamonio (CATB) y DOPE), POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DMG, DMAP (4-dimetilaminopiridina), DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina), DMG, DMA, DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPEPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DODAC (cloruro de dioleildimetilamonio), DOSPER (1,3-Di-oleoiloxi-2-(6-carboxiespermidil)-propilamida), DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DDAB (bromuro de didocil metilamonio), DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio), DOTAP•Cl, DC-col (3,β-N,N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol), DOSPA (trifluoroacetato de 2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetil-amonio), DC-6-14 (cloruro de O,O'-Ditetradecanoil-N-(alfatrimetilamonioacetil)dietanolamina), DCPE (Dicapropilfosfatidiletanolamina), DLRIE (bromuro de dilauril oxipropil-

3-dimetilhidroxietilamonio), DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), etil-PC, DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(esperminacarboxamidoetil)-N,N-di-metil-1-propanamino), DOGS (dioctadecilamidoglicil carboxiespermina), DMRIE (bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amonio), DOEPC (dioleoilfosfolina), DOHME (yoduro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N-[1-(2-hidroxietil)-N,N-dimetilamonio), GAP-DLRIE:DOPE (bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloxi)-1-propaniminio/dioleoilfosfatidiletanolamina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosforac-(3-lisil(1-glicerol))•Cl), N-lauroilsarcosina, (R)-(+)-limoneno, lecitinas (y sus derivados); fosfatidiletanolamina (y sus derivados); fosfatidiletanolaminas, dioleoilfosfatidiletanolamina, DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina), DPPE dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, O-Chol (3 beta[1-ornitinamidacarbamoil]colesterol), POPE (palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina) y diestearoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilcolina; fosfatidilcolinas, DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidilglicerol; lípidos catiónicos a base de piperazina, fosfatidilgliceroles, tales como DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) y diestearoilfosfatidilglicerol; fosfatidilserina (y sus derivados); fosfatidilserinas, tales como dioleoil o dipalmitoil-fosfatidilserina; sales de amonio dicuaternarias tales como N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina (TmedEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (PropEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina (HexEce) y sus correspondientes análogos saturados de N,N'-dicetilo (TmedAce, PropAce y HexAce), difosfatidilgliceroles; ésteres de ácidos grasos; lípidos de transfección monocatiónicos como 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-xilitol; 1-desoxi-1-[metil(ditradecil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[metil(dioctadecil)amonio]-D-arabinitol, ésteres de glicerol; esfingolípidos; cardolipina; cerebrosidos; y ceramidas; y mezclas de los mismos. Los lípidos neutros también incluyen colesterol y otros 3βOH-esteres, así como derivados de estos o fosfatidilcolina. También se contempla cualquier mezcla de combinación de los lípidos coadyuvantes enumerados anteriormente.

El porcentaje molar del lípido coadyuvante o neutro está entre aproximadamente el 60% y aproximadamente el 85% del agregado lipídico; en algunas realizaciones, el porcentaje molar del lípido coadyuvante o neutro está entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 80% del agregado lipídico; o, en algunas realizaciones, el porcentaje molar del lípido coadyuvante o neutro está entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 75% del agregado lipídico.

En algunas realizaciones, un complejo de transfección puede incluir uno o más lípidos pegilados. Los lípidos pegilados adecuados para uso en la preparación y formación de complejos de transfección descritos en este documento pueden ser cualquier lípido o mezcla de lípidos que sean compatibles con la formación de complejos de transfección descritos en el presente documento, y con la administración de los mismos a un animal o a un ser humano in vivo, o a tejidos o células in vitro. Los lípidos pegilados utilizados en la presente descripción incluyen un polímero PEG que tiene un peso molecular entre aproximadamente 250 Dalton y aproximadamente 12.000, o en algunas realizaciones, aproximadamente 350 Dalton y aproximadamente 6.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 500 Dalton y aproximadamente 1.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 1.000 Dalton y aproximadamente 2.000 Dalton, o, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 2.000 Dalton y 5.000 Dalton. Más específicamente, los lípidos pegilados adecuados incluyen lípidos pegilados a base de fosfatidiletanolamina (PE) como, por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-MW] donde MW se refiere a un MW promedio del resto de polietilenglicol. Dichos lípidos de dimiristoil-PEG-PE se designan comúnmente como PEG (MW) 14:0. El MW promedio del resto de polietilenglicol puede ser 25, 350, 550, 750, 1000, 2000, 3000, 5000, 6000, 8000 ó 12000, por ejemplo. Las cadenas de ácidos grasos de los lípidos pegilados a base de fosfatidiletanolamina pueden incluir, por ejemplo, un grupo 1,2-dioleoil tal como para PEG (MW) PE 18:1, un grupo 1,2-dipalmitoil tal como para PEG (MW) PE 16:0, o un grupo 1,2-diestearoil tal como para PEG (MW) PE 18:0. Otros lípidos pegilados basados en fosfatidiletanolamina (PE) incluyen, por ejemplo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[MOD(polietilenglicol)-MW], también denominado DSPE-MOD PEG (MW) en donde MOD se refiere a un resto funcional tal como una amina, biotina, ácido carboxílico, folato, maleimida, PDP, o un resto carboxifluoresceína. El MW puede ser 2000 ó 5000, por ejemplo. Los lípidos pegilados para las realizaciones descritas en el presente documento también incluyen lípidos pegilados a base de ceramidas como, por ejemplo, N-octanoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)MW]}, designado C8 PEG (MW) ceramida, donde MW es 750, 2000, ó 5000, por ejemplo. Alternativamente, el resto de ácido graso puede tener un grupo N-palmitoil (C16) tal como para ceramida C16 PEG (MW).

En algunas realizaciones, el porcentaje molar del lípido pegilado está entre aproximadamente el 0,5% y el 15% del complejo de transfección; en algunas realizaciones, el porcentaje molar del lípido pegilado está entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% del complejo de transfección; o, en algunas realizaciones, el porcentaje molar del lípido pegilado es aproximadamente el 1% o el 5% del complejo de transfección.

En algunas realizaciones, el porcentaje molar del compuesto de transfección que contiene amina:lípido coadyuvante:lípido pegilado del complejo de transfección varía de 15:84:1 a 15:75:10, de 20:79:1 a 20:70:10, de 25:74:1 a 25:65:10, de 30:69:1 a 30:60:10, de 40:59:1 a 40:50:10, o de 50:49:1 a 50:40:10. En algunas realizaciones, el porcentaje molar de compuesto de transfección que contiene amina:lípido coadyuvante:lípido pegilado del complejo de transfección varía de 10:90:7-35:5-70, de 15-85:5-35:8-50, de 30-85:5-35:8-50, de 35-70:10-30:15-45, de 40-65:15-25:20-40, de 50-60:18-22:25-35, de 50-55:19-21:27-30, o de 51-53:20-20,5:28-29. Por supuesto, el experto en la técnica apreciará fácilmente que pueden emplearse relaciones alternativas, y la

optimización de las relaciones de tales formulaciones es adecuada dentro del nivel de experiencia de cualquier persona técnica, sin que se requiera una experimentación excesiva.

5 Otras realizaciones no limitativas de la presente descripción proporcionan métodos para administrar un agente bioactivo, tal como, por ejemplo, un polianión, un polinucleótido o un polipéptido en una célula o células, o en un tejido, en donde el método incluye formar un agregado lipídico, tal como un liposoma, que comprende uno o más de los compuestos de transfección que contienen amina descritos anteriormente, opcionalmente con uno o más lípidos coadyuvantes y/o uno o más lípidos pegilados, y poner en contacto el agregado lipídico con el agente bioactivo para formar un complejo bioactivo, neutro o cargado positivamente, de agregados lipídicos, e incubar el complejo con una célula o un tejido in vitro, o administrar el complejo de transfección resultante a un animal o un ser humano, 10 opcionalmente como una composición terapéutica. Los agentes bioactivos útiles contemplados para dicha administración incluyen proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN.

15 En algunas realizaciones, los complejos de transfección pueden incluir uno o más agentes biológicamente activos para administrarse a una célula o a un tejido objetivo in vitro o in vivo. Los agentes biológicamente activos adecuados pueden incluir cualquier molécula que sea capaz de formar un complejo de transfección con los reactivos de transfección que contienen amina descritos en este documento y que provoca una respuesta biológica cuando se administra al interior de una célula o células o a un tejido in vivo o in vitro. Los agentes biológicamente activos contemplados para uso en las realizaciones en este documento descritas pueden ser agentes catiónicos, neutros o aniónicos. A modo de ejemplo no limitativo, los ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados para la formulación en un complejo de transfección pueden incluir, aunque sin limitación, ácidos nucleicos (que incluyen 20 entre otros, moléculas de ADN lineal o circular de cadena sencilla o doble, incluidas moléculas de ADNc, moléculas de ARN de cadena sencilla o doble, ARN interferente de moléculas pequeñas (ARNi), moléculas de ARN de pequeña horquilla (ARNhc), moléculas de microARN (ARNm), oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos sentido), polipéptidos, anticuerpos, oligopéptidos, péptidos terapéuticos o moléculas de proteínas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), moléculas orgánicas catiónicas, aniónicas o neutrales o fármacos, además de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 En ciertas realizaciones ilustrativas no limitativas de la presente descripción, se proporcionan complejos de transfección y métodos que utilizan el compuesto de la presente invención para administrar moléculas de ácido nucleico en células o tejidos in vitro o in vivo, incluida la administración de moléculas de ARN interferente (ARNi) o moléculas de ARN pequeño interferente (ARNip, ARNhc o ARNm) en las células para la inhibición de la expresión génica.

30 En ciertas realizaciones ilustrativas no limitativas, se proporcionan complejos de transfección y métodos que utilizan los compuestos de la presente invención para administrar moléculas de ARNm en una célula o un tejido in vivo o in vitro para promover la expresión de una proteína o proteínas específicas.

35 En otras realizaciones ilustrativas no limitativas de la invención, se proporcionan complejos de transfección y métodos que utilizan el compuesto de la presente invención para administrar moléculas de ADN (incluidas moléculas de ADNc) en una célula o un tejido in vivo o in vitro que promueva la expresión de una proteína o proteínas específicas o para sintetizar moléculas de ARN específicas, incluidas, entre otras, moléculas de ARNm o también se proporcionan moléculas de ARNi o ARNm o ARNhc.

40 En algunas realizaciones, los complejos de transfección descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más péptidos fusogénicos o penetrantes de células. Un péptido fusogénico o que penetra en las células es cualquier molécula peptídica capaz de promover la fusión de un complejo que contiene lípidos con una membrana celular (ya sea una membrana plasmática o una membrana endosómica). Una variedad de péptidos fusogénicos o de penetración celular son conocidos en la técnica y están dentro del nivel de habilidad de cualquier profesional identificar los péptidos fusogénicos o penetrantes de células adecuados y el estado para su uso en la 45 presente invención sin una experimentación excesiva.

50 En algunas realizaciones, los complejos de transfección descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más auxiliares de la transfección o restos dirigidos. Un resto dirigido puede ser un péptido, un péptido modificado, un anticuerpo, un anticuerpo modificado, una molécula receptora, una molécula receptora modificada, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble modificada, un péptido o aptámero de ácido nucleico, un péptido modificado o aptámero de ácido nucleico, una molécula orgánica, un polisacárido o cualquier otra molécula que sea capaz de dirigir un complejo de transfección a un tejido o tipo de célula específico para la administración dirigida de un agente biológico, tal como será evidente para cualquier nivel de habilidad ordinario en la técnica. En algunas realizaciones, la modificación de un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un aptámero y similares puede incluir la conjugación del péptido, anticuerpo, ácido nucleico, aptámero y similares con un resto de PEG. Alternativamente, la modificación de un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un aptámero y similares puede incluir la conjugación del péptido, anticuerpo, ácido nucleico, aptámero y similares con un resto lipídico de PEG. Se conoce ampliamente una variedad de restos dirigidos para los expertos en la técnica, y todos están contemplados para su uso con las realizaciones 55 descritas en este documento, sin limitación.

En algunas realizaciones, los complejos de transfección proporcionados en este documento pueden ser estables hasta 1 año y pueden ponerse en contacto con las células o los tejidos a transfectar, o administrarse a un animal o ser humano inmediatamente o poco después de formarse, u, opcionalmente, se pueden almacenar por un período de tiempo antes de ser puestos en contacto con las células o tejidos, o de ser administrados a un animal o un ser humano. Los complejos de transfección son estables y pueden almacenarse durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año a temperatura ambiente, o a una temperatura superior a la congelación, hasta aproximadamente la temperatura ambiente. Debe entenderse que la formulación descrita en el presente documento puede incluir uno o más agentes estabilizantes, conservantes, tampones, etc., que ayuden en la estabilización y almacenamiento a largo plazo de la formulación bioactiva, como entenderá el experto en la materia de las artes biológicas y farmacéuticas, y sin requerir una excesiva experimentación para lograrlo. También se entiende que el período de almacenamiento puede estar entre cualquiera de estos períodos de tiempo, por ejemplo, entre 31 minutos y 1 hora o entre 1 hora y 24 horas.

Opcionalmente, el complejo de agente bioactivo-agregado lipídico se almacena durante un período antes de ponerse en contacto con la célula o células. El complejo de agregado de polianión-lípido es estable y puede almacenarse durante un período de tiempo de al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año, o por un período de tiempo entre cualquiera de estos períodos.

La presente descripción es particularmente adecuada para administrar componentes de ARNi, incluyendo ARNi, ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (ARNm) y ARN pequeño regulado temporalmente (stARN), que opcionalmente se modifican químicamente, a células o tejidos in vitro o in vivo.

Los métodos de administración que emplean los complejos de transfección de la presente invención o mezclas de los mismos pueden aplicarse a células in vitro, ex vivo e in vivo, particularmente para la transfección de células o tejidos eucariotas, incluidas las células animales, células humanas, células animales no humanas, células de insecto, células de plantas (incluidas las algas), células aviares, células de peces, células de mamíferos y similares.

En algunas realizaciones, el agente bioactivo que se va a administrar en la célula se pone en contacto con agregados lipídicos de la presente descripción para formar un complejo de transfección que comprende un complejo de agente bioactivo-agregado lipídico. La célula o células diana o los tejidos diana se incuban luego con el complejo o, para aplicaciones in vivo, el complejo se administra al organismo por una vía apropiada (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, transmucosa, etc.) de modo que el complejo se pone en contacto con las células o tejidos diana. Los métodos para la aplicación de complejos de transfección a células o tejidos in vitro o a tejidos o un animal in vivo son ampliamente conocidos en la técnica, y el uso de tales métodos se contempla en el presente documento sin limitación para la administración de los complejos de transfección de lípidos descritos en este documento para células, tejidos o un animal. El compuesto de la presente descripción también puede conjugarse o mezclarse o usarse junto con una variedad de moléculas y sustancias útiles, también denominadas auxiliares de la transfección o restos dirigidos, tales como proteínas, péptidos, factores de crecimiento, anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, o versiones modificadas de los mismos (como, por ejemplo, la conjugación de los auxiliares de transfección o los grupos dirigidos a PEG o PEG-lípidos) y similares para mejorar el reconocimiento celular, la absorción, la internalización, el reconocimiento nuclear y la expresión, todo lo cual está igualmente dentro de la habilidad nivel del profesional cualificado.

Un aspecto más proporciona un método para transfectar una célula o tejido con un ácido nucleico in vivo en el que el método comprende formar un agregado lipídico, tal como un liposoma, que comprende uno o más compuestos de transfección que contienen amina, uno o más lípidos pegilados y, opcionalmente, uno o más lípidos coadyuvantes, poner en contacto el agregado lipídico con el ácido nucleico para formar un complejo de agregado lipídico-ácido nucleico, neutro o cargado positivamente, y administrar el complejo de ácido nucleico-agregado lipídico a las células o tejidos in vitro o a un organismo para que el complejo entre en contacto con las células o el tejido diana. La administración del complejo de ácido nucleico y agregado lipídico se puede lograr por vía oral, intravenosa o por inyección subcutánea o intramuscular o se puede aplicar tópicamente en el tejido como se describe más adelante.

Opcionalmente, el complejo de agente bioactivo-agregado lipídico se almacena durante un período antes de ponerse en contacto con la célula o células para la transfección. El complejo de agregado de polianión-lípido es estable y puede almacenarse durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año, o por un período de tiempo entre cualquiera de estos períodos de tiempo.

En otra realización, los complejos de transfección de la presente descripción (aproximadamente entre 5 µl y 2000 µl) se proporcionan en los pocillos de una placa de múltiples pocillos. Las moléculas bioactivas que se administran en las células diana se seleccionan y se agregan a los pocillos para formar complejos de agregados de polianión-lípidos, que posteriormente se ponen en contacto con las células diana *in vitro* o *in vivo*. Los agregados lipídicos pueden tener la misma composición y la concentración en cada pocillo, o la composición del agregado lipídico y/o la concentración puede variar de un pocillo a otro (por ejemplo, la cantidad de pegilación en el agregado lipídico puede variar a través de los pocillos para determinar el rango de administración y transfección). Cuando los agentes bioactivos son ácidos nucleicos como el ARNi, los ácidos nucleicos pueden agregarse a los pocillos y, opcionalmente, almacenarse antes de entrar en contacto con las células diana.

Los métodos de la presente descripción comprenden opcionalmente la etapa de poner en contacto el compuesto de transfección que contiene amina con uno o más lípidos coadyuvantes y uno o más lípidos pegilados antes o al mismo tiempo que se ponga en contacto el agente bioactivo con el compuesto de transfección que contiene la amina para formar agregados lipídicos que encapsulan el agente bioactivo. Los métodos también comprenden opcionalmente formar los agregados lipídicos en liposomas antes del contacto con el agente bioactivo. En otras realizaciones, los liposomas se forman por microfluidización, extrusión u otros medios conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los agentes bioactivos pueden incluir moléculas de ácido nucleico tales como ADN o ARN que inhiben o promueven la expresión de un gen diana. En algunas realizaciones, el agente bioactivo se asocia con una transcripción del gen para efectuar la inhibición del mismo. En algunas realizaciones, el agente bioactivo se asocia con una transcripción del gen para efectuar su inhibición. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es un ácido nucleico, como un ADN y un ARNm, ARNi, ARNi, ARNh_c, ARNm o ARNt, y, opcionalmente, se modifica químicamente.

En otro aspecto, la presente descripción también menciona medicamentos preparados combinando liposomas que comprenden el compuesto de transfección que contiene amina, opcionalmente con uno o más lípidos coadyuvantes, opcionalmente con uno o más lípidos pegilados y, opcionalmente, con uno o más restos dirigidos o auxiliares de la transfección (como es descrito anteriormente) o una sal del mismo, con un agente bioactivo tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, en donde la introducción del agente bioactivo en una célula o tejido modula la expresión de uno o más genes diana en el mismo, efectuando así al menos una respuesta biológica y/o al menos un beneficio terapéutico. Opcionalmente, el medicamento comprende además un excipiente adicional o vehículo farmacéutico, tal como será fácilmente evidente para el profesional que tiene un nivel de habilidad normal en la técnica farmacéutica y/o médica. En algunas realizaciones, el agente bioactivo puede ser un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es mRNA, ARNi, ARNip, ARNh_c, ARNm o tRNA, y está opcionalmente modificado químicamente. En algunas realizaciones, se proporcionan medicamentos o preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno que se relaciona con la expresión de uno o más genes en una célula o un tejido. La formulación de medicamentos farmacológicamente aceptables es conocida en la técnica. La administración del medicamento libera una cantidad efectiva del polianión, por ejemplo, ARN o ADN, a las células o tejidos asociados con la enfermedad, afección o trastorno para proporcionar una mejoría de la enfermedad, afección o trastorno. A modo de ejemplos no limitantes, tales medicamentos pueden administrarse por vía oral, intravenosa o por inyección subcutánea o intramuscular o aplicarse tópicamente al tejido como se describe más adelante.

La presente descripción también menciona kits para la preparación de uno o más complejos de transfección de la descripción en este documento descrita. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, una o más composiciones liposómicas de esta invención. Dichos kits típicamente comprenden un receptáculo, tal como una caja, caja de cartón, tubo o similar, que alberga en sí mismo uno o más recipientes, tales como viales, tubos, ampollas, botellas y similares, en donde los recipientes contienen el compuesto de transfección que contiene la amina, opcionalmente con uno o más lípidos coadyuvantes, opcionalmente con uno o más lípidos pegilados o catiónicos (o sales aceptables de los mismos) de acuerdo con las realizaciones descritas anteriormente, o composiciones liposómicas de la presente descripción. Los kits incluidos en este aspecto de la presente descripción pueden comprender además uno o más componentes adicionales (por ejemplo, reactivos y compuestos) necesarios o beneficiosos para llevar a cabo una o más aplicaciones particulares de las composiciones de la presente descripción. En algunas realizaciones, el kit puede contener opcionalmente una o más placas de múltiples pocillos adecuadas para contener los agregados lipídicos o los complejos de transfección de la presente invención. En ejemplos adicionales, los kits también pueden contener uno o más componentes útiles para llevar a cabo una transfección deseada de células. En otros ejemplos adicionales, el kit también puede contener uno o más componentes útiles para llevar a cabo el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno físico particular (por ejemplo, uno o más compuestos terapéuticos o composiciones adicionales, uno o más reactivos de diagnóstico). En general, los kits también pueden contener uno o más tampones, muestras de control positivo o negativo, portadores o excipientes, y similares, una o más composiciones adicionales de la presente descripción, uno o más conjuntos de instrucciones y similares.

Se mencionan métodos para encapsular un agente bioactivo, como un ácido nucleico, un ADN y ARN, o similares, en un complejo de transfección (es decir, un complejo de agregado lipídico-agente bioactivo). Dichos métodos pueden incluir la formación de un agregado lipídico que comprenda el compuesto de transfección que contiene amina 87, uno o más lípidos coadyuvantes, uno o más lípidos pegilados y, opcionalmente, uno o más ayudantes de la transfección o restos de reconocimiento bajo una o más de las siguientes condiciones:

a1) mezclar el compuesto de transfección que contiene amina, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en una solución de alcohol/acuosa en donde la concentración de alcohol es <50%;

5 a2) mezclar el compuesto de transfección que contiene amina, al menos un coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en un porcentaje molar tal que uno o más compuestos de transfección que contienen amina estén presentes en un 15%-50%;

a3) mezclar el compuesto de transfección que contiene amina, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en un porcentaje molar tal que los lípidos pegilados estén presentes en <50 %; y

10 a4) mezclar el compuesto de transfección que contiene amina, al menos un lípido coadyuvante, opcionalmente más de un lípido coadyuvante y uno o más lípidos pegilados, o una de sus sales, en donde el lípido pegilado tiene un peso molecular de polietilenglicol de aproximadamente 2000-12000 y una longitud de cadena de ácido graso de alquilo C₆-C₂₀, o alquenilo C₁₀-C₂₀; y complejar el agregado lipídico en una solución de alcohol/acuosa con el agente bioactivo para formar un complejo de transfección, en donde la concentración de alcohol es <50%, preferiblemente menor que 40%. En algunas realizaciones, el método incluye a1) y a2), a2) y a3), a1) y a3), a2) y a4), a3) y a4), a1) y a4), o a1)- a4), por ejemplo. En algunas realizaciones, el alcohol es un alcohol C1-C4. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol. En algunas realizaciones, el alcohol es un alcohol farmacéuticamente aceptable, tal como un alcohol que es líquido a aproximadamente la temperatura ambiente, por ejemplo, etanol, propilenglicol, 2-(2-etoxietoxi)etanol (Transcutol™), alcohol bencílico, glicerol, polietilenglicol 200, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400 o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el alcohol para mezclar es diferente al alcohol para formar complejos.

25 Los complejos de transfección de las realizaciones descritas en el presente documento pueden administrarse a través de las siguientes vías de administración in vivo, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraventricular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítea, intravaginal, intrauterina, intrarrectal, tópica, intratumoral, intratecal, intramuscular, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación con aerosol), inyección, infusión, infusión continua, baño de perfusión localizado a células directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, o por otros métodos o cualquier combinación de los anteriores, como saben los expertos en la técnica (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co. 1990).

35 Una dosis para el uso ex vivo o in vivo es de 0,01 µg a 1 g/kg de peso corporal, de 0,1 µg a 0,1 g/kg de peso corporal, de 1 µg a 0,01 g/kg de peso corporal, de 10 µg a 0,01 g/kg de peso corporal, de 0,1 mg a 10 mg/kg de peso corporal, o que abarca e incluye cualquiera de 0,1 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2 mg, y 10 mg/kg de peso corporal. La administración puede ser una o más veces por día, semana, mes o año. La administración puede ser en forma de bolo. En general, una cantidad efectiva de los lipoplejos de las realizaciones en este documento es una cantidad suficiente para reducir la expresión del gen diana y da como resultado una concentración extracelular en la superficie de la célula diana de 100 pM a 1 µM, o de 1 nM a 100 nM, o de 2 nM a aproximadamente 25 nM, o de aproximadamente 10 nM. La cantidad requerida para lograr esta concentración local variará dependiendo de una serie de factores que incluyen el método de administración, el sitio de administración, el número de capas de células entre el sitio de administración y la célula o tejido diana, ya sea la administración local o sistémica, etc. La concentración en el sitio de administración puede ser considerablemente más alta que en la superficie de la célula o tejido diana.

45 En algunas realizaciones para la administración in vivo, los complejos de transfección se preparan a una concentración final de 0,5-1 mg/ml. La proporción de agregado lipídico a ácido nucleico está entre aproximadamente 0,7:1 y 1,3:1 (v:p) dependiendo del órgano seleccionado. Cualquier experto en la técnica, a la luz de las enseñanzas de este documento, es capaz de probar diversas relaciones de agregado lipídico y ácido nucleico para la administración in vivo. Por ejemplo, para un lipoplex de 1 mg/ml en glucosa al 5%, la administración puede ser intravenosa, por lo que se dirige al pulmón, riñón, hígado, tumor o bazo (con 50-200 µl), por vía intraperitoneal a un tumor o inflamación (con 100 µl), intranasal, por lo que se dirige al pulmón (con 50 µl), intratumoral o retro-orbital (local) por lo que se dirige al ojo, un tumor, la articulación de la rodilla o la oreja (con 10-100 µl), intracerebral (local) por lo que se dirige al cerebro (usando 0,5-5 µl), intratecal por lo que se dirige así a la médula espinal (usando 10 µl), o hidrodinámico por lo que se dirige al hígado, riñón o virus (usando 0,8-2,5 ml), por ejemplo.

Métodos para la selección de la administración específica de tejido

55 Otras realizaciones descritas en el presente documento proporcionan métodos para seleccionar grandes cantidades de compuestos de transfección para su administración con sesgo tisular in vivo. Tales métodos pueden incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección que contienen un compuesto que facilite fácilmente la detección de un marcador en combinación con un compuesto de transfección de prueba, administrar cada uno de la pluralidad de complejos de transfección a un animal de prueba y detectar el marcador.

En algunas realizaciones, un método para seleccionar la administración de un complejo de transfección con sesgo tisular puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con al menos un ácido nucleico que facilite la detección de la administración a un tejido. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARN o una molécula de ADN que codifique una proteína que pueda detectarse directamente (como, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente roja, luciferasa o similares), o codificar una proteína que provoque la expresión de una proteína que pueda ser detectada directamente.

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada por el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifica la proteína fluorescente verde. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o en un tejido a un animal de prueba, como un ratón. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del ratón pueden recogerse y la expresión de GFP en varios tejidos puede detectarse mediante un examen general, examen histológico o detección molecular (PCR, transferencia de Western o similar) para determinar cuáles son los complejos de transfección del tejido o de los tejidos que contienen los compuestos de transfección específicos que se administran.

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada en el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifica la luciferasa. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o en un tejido a un animal de prueba, como un ratón. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del ratón pueden recogerse y la expresión de la luciferasa en varios tejidos puede detectarse mediante examen general, examen histológico o por detección molecular (PCR, transferencia de Western o similar), o imágenes vivo utilizando el sistema de imágenes IVIS® (Caliper).

En una realización, un método para seleccionar la administración sesgada en el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, teniendo cada complejo de transfección al menos un compuesto de transfección de prueba en combinación con un ARNm o un ADNc que codifica un factor de transcripción específico. Cada complejo de transfección único puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea o en un tejido a un animal transgénico que exprese un gen indicador (como, por ejemplo, la luciferasa) bajo el control del factor de transcripción específico. Después de un período de tiempo predeterminado, los tejidos del animal transgénico se pueden recolectar y la expresión del gen indicador en varios tejidos se puede detectar mediante examen general, examen histológico o detección molecular (PCR, transferencia de Western o similares). Si el gen indicador es luciferasa, la detección se puede realizar in vivo utilizando el sistema de imágenes IVIS® (Caliper).

En una realización no limitativa, un método para seleccionar la administración sesgada en el tejido de un complejo de transfección puede incluir preparar una pluralidad de complejos de transfección únicos, conteniendo cada complejo de transfección único al menos un compuesto de transfección de prueba único en combinación con una molécula de ARNm o ADN que codifica la recombinasa Cre. La pluralidad de complejos de transfección únicos también puede incluir opcionalmente uno o más potenciadores de la transfección, uno o más lípidos coadyuvantes, uno o más lípidos pegilados o uno o más restos dirigidos como se describe anteriormente y se incorporan en la presente invención. Cada uno de los complejos de transfección únicos puede administrarse por vía intravenosa (por ejemplo, por inyección en la vena de la cola), por vía subcutánea o por inyección intra-tejido a un ratón transgénico que expresa un gen indicador en presencia de la recombinasa Cre. En una realización ejemplar, cada uno de los complejos de transfección únicos puede administrarse a un ratón transgénico que porta un gen loxP-STOP-loxP-luciferasa, tal como, por ejemplo, cualquiera de las cepas de ratones transgénicos 129S6(B6)-Gt(ROSA)26, en las cuales el gen de luciferasa de luciérnaga se inserta en el locus Gt(ROSA)26Sor. En esta línea transgénica, el gen de la luciferasa está bloqueado por una secuencia de STOP flanqueada por loxP ubicada entre el transgén de la luciferasa y su promotor. En presencia de la recombinasa Cre (es decir, en tejidos a los que se administran los complejos de transfección que contienen ARNm-Cre o ADN), se escinde la secuencia STOP y se expresa la luciferasa.

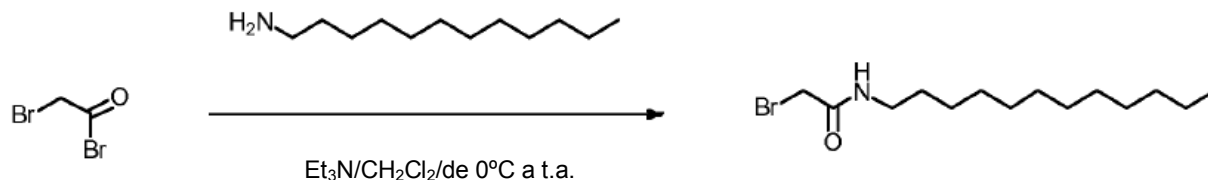
Para determinar en qué tejidos se expresa la luciferasa de Cre (y, por lo tanto, a qué tejidos se administra de manera preferencial cada uno de los compuestos de transfección de prueba únicos), la expresión del transgén de luciferasa se puede lograr de acuerdo con cualquiera de las técnicas ampliamente utilizadas para evaluar la expresión de genes conocida por el experto en la materia (tal como PCR, transferencia Northern, transferencia Western, o similar o midiendo directamente la actividad de luciferasa). En algunas realizaciones preferidas, se pueden examinar los tejidos extirpados o secciones histológicas transpreculares, por ejemplo, utilizando el IVIS® In Vivo

III. Ejemplos

La presente descripción se aclarará adicionalmente mediante la consideración de los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención y no limitar, de ninguna manera, su alcance.

Ejemplo de referencia 1. Síntesis de 2-Bromo-N-Dodecil Acetamida

El intermedio del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:

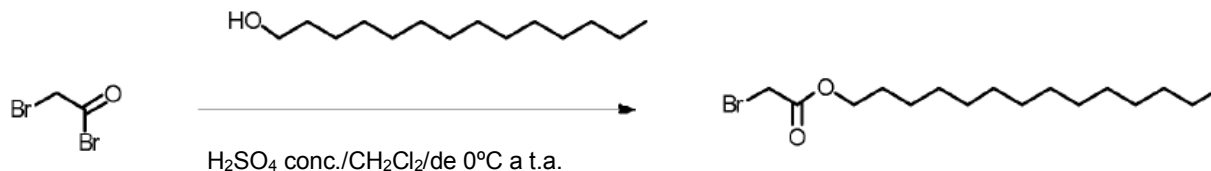


5 En un matraz de fondo redondo con embudo de adición que iguala la presión, a 200 ml de diclorometano se añadieron 1,5 g (7,431 mmol, 1,05 eq.) de bromuro de bromoacetilo y la mezcla se agitó bajo nitrógeno. El matraz se enfrió a aproximadamente 0°C usando un baño de hielo. Se disolvieron 1,31 g (7,077 mmol) de dodecilamina ácida
 10 de adición y la solución de bromuro de bromoacetilo se añadió lentamente en aproximadamente 1 hora. La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente otra hora a aproximadamente 0°C, calentando lentamente a temperatura ambiente dejando que el hielo se derrita.

15 La mezcla de reacción resultante se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con 100 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se lavó con 50 ml de diclorometano y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 100 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio. Finalmente, la capa de agua se lavó con 100 ml de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron para eliminar el sulfato de sodio y la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio para dar
 aproximadamente 2,022 g (rendimiento del 93,3%) de producto puro. Peso molecular calculado: 305,14, peso molecular observado: 306,25.

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de tetradecil-2-bromoacetato

El intermedio del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:



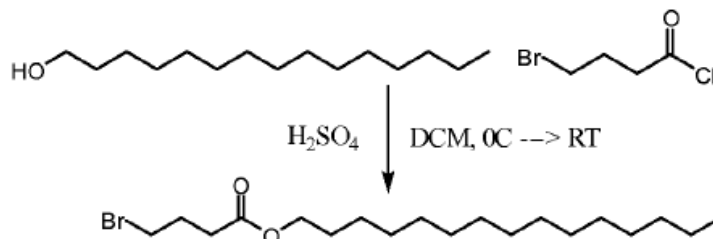
20 Se disolvieron 3 g (1,3 ml, 14,862 mmol, 1,05 eq.) de bromuro de bromoacetilo en 50 ml de diclorometano. El matraz se enfrió a aproximadamente 0°C usando un baño de hielo. Se disolvieron 3,03 g (14,154 mmol) de tetradecanol en 50 ml de diclorometano y se agregaron lentamente a la mezcla anterior a través de una pipeta, luego se agregaron
 25 aproximadamente 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se agitó a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 30 minutos, y después a temperatura ambiente durante la noche.

30 Se agregaron aproximadamente 150 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio y se agitó rápidamente durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla se transfirió luego a un embudo de decantación y se recogió la capa orgánica. La capa acuosa se lavó con aproximadamente 100 ml de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para dar 4,095 g (89,7% de rendimiento) de producto.

35 No se observó ningún pico de masa. Para confirmar la estructura, se estableció una reacción de prueba de la siguiente manera: 4,6 mg (0,043 mmol) de bencilamina, 17 mg (23 µl, 0,130 mmol, 3 eq.) de N,N-diisopropiletilamina y 22 mg (0,065 mmol, 1,5 eq.) de tetradecil-2-bromoacetato se disolvieron en 1 ml de DMF y se colocaron en el microondas a aproximadamente 160°C/200 W durante 10 minutos. La mezcla de reacción resultante se analizó mediante LCMS. Peso molecular calculado: 361,56, peso molecular observado: 362,42.

Ejemplo 1. Síntesis de pentadecil-4-bromobutanoato

El intermedio del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:

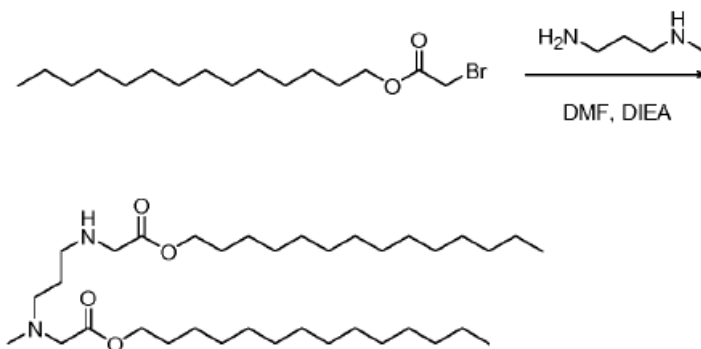


5 Se disolvió cloruro de 4-bromobutilo (1 eq.) en diclorometano (50 ml) y el matraz de reacción se enfrió a aproximadamente 0°C usando un baño de hielo. A la mezcla anterior, se añadió lentamente 1-pentadecanol (1 eq.) en diclorometano (50 ml) usando un embudo de adición de eculización de presión durante un período de aproximadamente 30 minutos. A la mezcla anterior resultante, se añadió una cantidad catalítica (5 gotas) de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 30 minutos y luego se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas. La mezcla de reacción se transfirió a un
10 embudo de decantación y la capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado (x3), agua (x2), salmuera (x1). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar el producto deseado, pentadecil-4-bromobutanoato en forma de un aceite incoloro (88% de rendimiento).

No se observó ningún pico de masa. La estructura del producto esperado se confirmó mediante una reacción de prueba: se agregaron bencilamina (1 eq.), N-metilmorfolina (1 eq.), pentadecil-4-bromobutanoato (0,9 eq.) a un tubo de pyrex de paredes pesadas y seco que contenía DMF (1 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación de microondas (200 W) durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 170°C. Después de la irradiación, la mezcla de reacción se dejó enfriar a través de un sistema incorporado en el instrumento hasta que la temperatura hubo caído por debajo de aproximadamente 30°C. La mezcla de reacción resultante se analizó mediante LCMS. Peso molecular calculado: 403,64, peso molecular observado: 404,50.

Ejemplo de referencia 3. Síntesis de 2-[3-metilaminopropil-(2-oxo-2-tetradecoxi-etil)amino]-acetato de tetradecilo

El compuesto del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:



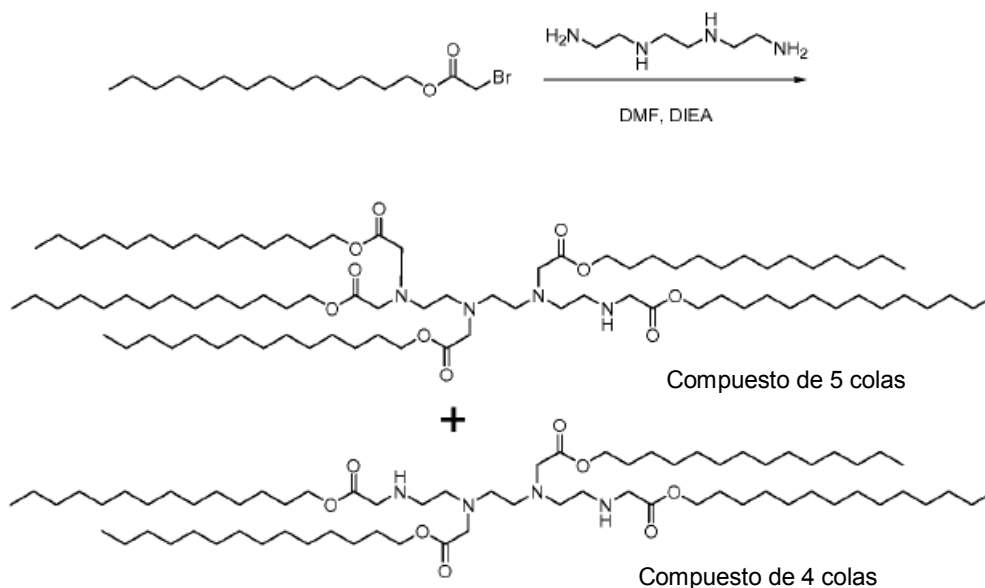
25 Se disolvieron 20 mg (0,227 mmol) de N-metilpropano-1,3-diamina, 160 mg (0,477 mmol, 2,1 eq.) de tetradecil-2-bromoacetato sintetizado como se describe en el Ejemplo 2 anterior, y 176 mg (237 µl, 1,361 mmol, 6 eq.) de N,N-diisopropiletilamina en 1 ml de dimetilformamida y se calentaron a aproximadamente 60°C durante la noche. La mezcla resultante se purificó por HPLC preparativa. Las fracciones que contenían el compuesto del título se recogieron y caracterizaron por LCMS. Peso molecular calculado: 596,55, peso molecular observado: 597,76.

Ejemplo de referencia 4. Síntesis de:

30 (a) 2-[2-[2-[2-bis[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]-etil]-2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etilamino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]-N-dodecil-acetamida y

(b) 2-[2-[2-[2-bis[2-(Dodecilamino)-2-oxoetil]amino]etilamino]etilamino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amina]-N-dodecil-acetamida

La mezcla de los dos compuestos del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general, que muestra un compuesto del título de 4 colas (a) y un compuesto del título de 5 colas (b):



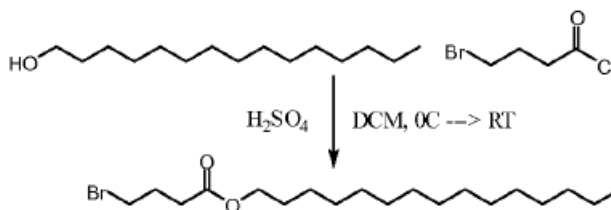
5 14,6 mg (0,1 mmol) de N,N'-bis(2-aminoetil)etano-1,2-diamina, 159 mg (0,52 mmol, 5,2 eq.) de 2-bromo-N-dodecil acetamida obtenidos como se describe en el Ejemplo de referencia 1 anterior, y 129 mg (174 μ l, 1 mmol, 10 eq.) de N, N-diisopropiletilamina se disuelven en 1 ml de DMF y se calientan a aproximadamente 60°C durante la noche. La mezcla resultante se purifica por HPLC preparativa.

10 Se recogieron y caracterizaron por LCMS 2-[2-[2-[2-bis[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etilamino]etilamino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]-N-dodecil-acetamida (compuesto de 4 colas mostrado arriba) y 2-[2-[2-[2-bis[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etilamino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]-N-dodecil-acetamida (compuesto de 5 colas mostrado arriba).

Para el compuesto de 4 colas: el peso molecular calculado es 1046,99, el peso molecular observado fue 1048,28. Para el compuesto de 5 colas: el peso molecular calculado es 1272,20, el peso molecular observado fue 1273,50.

Ejemplo de referencia 5. Síntesis de pentadecil-4-bromobutanoato

15 El intermedio del título se sintetizó de acuerdo con la siguiente reacción general:



20 Se disolvió cloruro de 4-bromobutilo (1 eq.) en diclorometano (50 ml) y el matraz de reacción se enfrió a aproximadamente 0°C usando un baño de hielo. A la mezcla anterior, se añadió lentamente 1 pentadecanol (1 eq.) en diclorometano (50 ml) usando un embudo de adición de equalización de presión durante un período de aproximadamente 30 minutos. A la mezcla anterior resultante, se añadió una cantidad catalítica (5 gotas) de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 30 minutos y luego se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación y la capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado (x3), agua (x2), salmuera (x1). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar el producto deseado, pentadecil-4-bromobutanoato en forma de un aceite incoloro (88% de rendimiento).

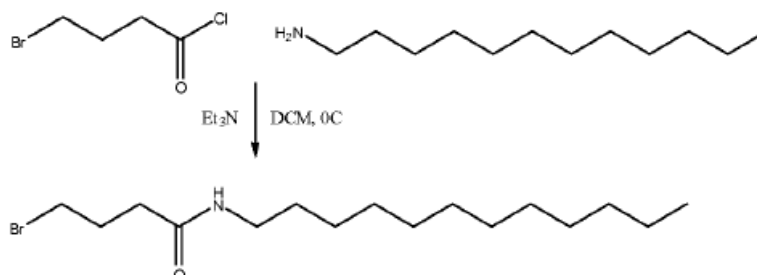
25

30 No se observó ningún pico de masa. La estructura del producto esperado se confirmó mediante una reacción de prueba: se agregaron bencilamina (1 eq.), N-metilmorfolina (1 eq.), pentadecil-4-bromobutanoato (0,9 eq.) a un tubo de Pyrex de paredes pesadas y seco que contiene dimetilformamida (1 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación de microondas (200 W) durante 10 minutos a 170°C. Después de la irradiación, la mezcla de reacción se dejó enfriar a través de un sistema incorporado en el instrumento hasta que la temperatura cayó por debajo de 30°C.

La mezcla de reacción resultante se analizó mediante LCMS. Peso molecular calculado: 403,64, peso molecular observado: 404,50.

Ejemplo de referencia 6. Síntesis de 4-bromo-N-dodecilbutanamida

El intermedio del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:



5

Se añadió cloruro de 4-bromobutanoilo (1,05 eq.) en un matraz de fondo redondo que contenía diclorometano (200 ml) a aproximadamente 0°C ajustado a un embudo de adición de ecualización de la presión y se agita bajo nitrógeno. Por separado, se disolvieron dodecylamina (1 eq.) y trietilamina (1 eq.) en diclorometano (100 ml) y la mezcla se transfirió al embudo de adición. Esta mezcla se añadió muy lentamente a un matraz de fondo redondo durante un período de aproximadamente 60 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó durante otros 15 minutos a aproximadamente 0°C y se transfirió a un embudo de decantación. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado (x3), agua (x2) y salmuera (x1). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar el producto deseado, 4-bromo-N-dodecilbutanamida como un sólido blanco (88,7% de rendimiento). Peso molecular calculado: 333,17, peso molecular observado: 334,31.

10

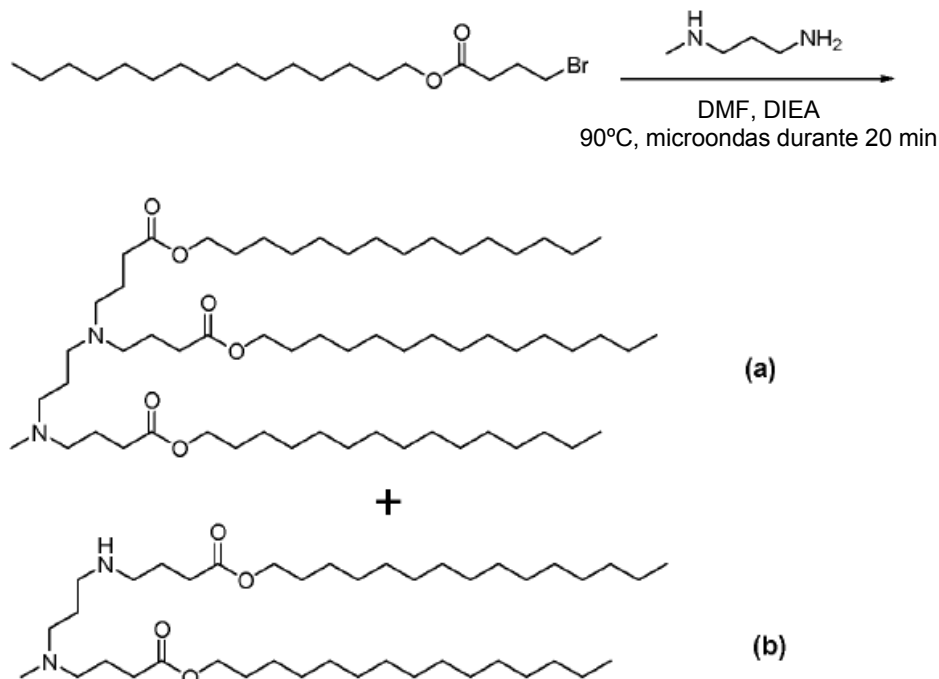
15

Ejemplo de referencia 7. Síntesis de:

(a) 4,4'-(3-(Metil(4-oxo-4-(pentadeciloxi)butil)amino)propil)azanediiilo)-dibutanoato de dipentadecilo y

(b) 4-(Metil(3-(4-oxo-4-(pentadeciloxi)butilamino)propil)amino)butanoato de pentadecilo

La mezcla de los dos compuestos del título se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema de reacción general:



20

Un recipiente de síntesis de reacción de microondas seco que contenía una pequeña barra de agitación magnética se cargó con N,N-dimetilpropano-1,3-diamina (42 mg, 0,48 mmoles), pentadecil-4-bromobutanoato (2,1 eq), N,N-diisopropiletil-amina (2,1 eq.) y dimetilformamida (1,0 ml). El recipiente se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se calentó hasta 90°C en un sintetizador de microondas CEM. Después de aproximadamente 20 minutos,

la reacción se detuvo y el recipiente se dejó enfriar a aproximadamente 40°C. Las trazas analíticas de LCMS del crudo de reacción mostraron la formación de los productos deseados. El material bruto se purificó mediante LCMS preparativa.

5 Todas las fracciones que contenían los productos deseados se seleccionaron cuidadosamente y se agruparon. El disolvente de cada fracción se secó hasta la mitad del volumen original a presión reducida, seguido de la adición de HCl 1 M en metanol (1,0 ml). Finalmente, todo el disolvente se eliminó al vacío, dando las sales de ácido clorhídrico de los compuestos del título (a) y (b) que se muestran en el esquema de reacción anterior como sólidos blancos.

Para el compuesto (a): el peso molecular calculado es 976,91, el peso molecular observado fue 977,91. Para el compuesto (b): el peso molecular calculado es 680,64, el peso molecular observado fue 681,64.

10 Ejemplo de referencia 8. Preparación de composiciones lipídicas para la administración in vivo.

15 Algunos lípidos se formularon en composiciones lipídicas, que también comprenden colesterol, poli(etilenglicol) (PEG), lípidos, tampones y etanol. Un colesterol no de origen animal se adquirió de Sigma-Aldrich (St Louis, MO), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli(etilenglicol))-2000] (sal de amonio) (C16 PEG2000 PE) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli(etilenglicol))-2000] (sal de amonio) (C14 PEG2000 PE) se adquirieron de Avanti Lipids (Alabaster, AL). El ARNi era ARNi STEALTH™ con oligonucleótidos de ARN de doble cadena de 25 pares de bases con modificaciones químicas estabilizadoras. El ARNi STEALTH™ está disponible comercialmente en Invitrogen (Carlsbad, CA).

20 Se suspendieron de nuevo en etanol y lípidos catiónicos lípidos en polvo seco: se mezclaron colesterol y un lípido de PEG en una proporción en peso de 52:20:28, respectivamente. La mezcla lipídica etanólica se mezcló muy rápidamente en una solución de acetato de sodio 200 mM a pH 5,2 en una proporción de 1:4. La formulación final (es decir, el total del lípido de la invención más el lípido PEG más colesterol) se filtró de forma estéril en un filtro de 0,22 µg y con una concentración de 15,625 mg/ml y un tamaño de 50-80 nm en acetato de sodio 50 mM y 25% de etanol (preliposomas). Las formulaciones que se hicieron se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones lipídicas

| Compuesto de referencia | Lípido PEG | Lípido coadyuvante | Tampón | Etanol, % | Concentración, mg/ml |
|---|----------------|--------------------|------------------------|-----------|----------------------|
| 49 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 7 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 69 | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 70 | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 51 | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 52 | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 54 | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 56 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 57 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 73 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 76 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| 77 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 50 mM | 25 | 15,625 |
| (*) Los números se refieren a los números de compuestos de referencia específicos mostrados anteriormente | | | | | |

25 El lipoplex (complejo de preliposomas de ARNi) se preparó mezclando volúmenes iguales de preliposoma y solución de ARNi STEALTH™ diluida a 1,5 mg/ml en agua y 25% de etanol. Después de mezclar, el complejo se incubó a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 30 minutos. Después de la incubación, el lipoplex se dializó durante aproximadamente 2 horas en 1 litro de PBS 1x pH 7,4 utilizando SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 8KDa. Después de la diálisis, se midió el volumen y se ajustó con PBS a la concentración de ARNi deseada. El lipoplex se incubó a aproximadamente 4°C hasta la inyección in vivo en la vena de la cola.

30

Se utilizaron ratones en edades de 4 a 6 semanas. Se complejaron ARNi contra el gen de ratón Factor VII (FVII) que tenía la secuencia antisentido 5'-AUUJGCACAGAUCAGCUGCUCCUCAUUC-3' y el control negativo contenido del medio GC-ARNi con pre-liposomas, como se describió anteriormente y se probó in vivo. Se inyectaron 200 µl de lipoplejos que contenían FVII o CTRL ARNi en PBS por 20 g de ratón, mediante la inyección en la vena de la cola a baja presión a una dosis de 10 mg/kg y 2 mg/kg (dosis de ARNi). Treinta y seis horas después de la inyección en la vena de la cola, se recolectaron tejido hepático y suero para el análisis de eliminación de ARNm y proteína, respectivamente.

El tejido del hígado congelado se trituró en polvo y se extrajo el ARN utilizando TRIZOL® PLUS RNA Purification System (Invitrogen). El ARN total (aproximadamente 750 ng) para la síntesis de la primera cadena se determinó utilizando el kit SUPERSRIPT® III RT (Invitrogen) y el análisis de QPCR se realizó utilizando el ensayo taqman utilizando Express qPCR Supermix Universal (nº. cat. 11785-01K).

El nivel de proteína sérica del factor VII se determinó de la siguiente manera. Los animales se anestesiaron mediante inyección intramuscular de ketamina/xilazina/Acepromazina (75/5/1 mg/kg, respectivamente), la sangre se recogió mediante sangrado retroorbital y el suero se procesó para medir el nivel de proteína del Factor VII utilizando un ensayo cromogénico (Biophen FVII, Aniara Corporación) según los protocolos de los fabricantes.

La Figura 1 proporciona un gráfico que resume el % relativo de la actividad restante de la proteína del Factor VII, medida por un ensayo cromogénico, de las diferentes formulaciones de lipoplex en el hígado. Con referencia al eje x, los números se refieren a los compuestos lipídicos catiónicos analizados, como se muestra en la Tabla 1. Los datos demuestran que tales formulaciones poseen actividad in vivo. No se observó ninguna reducción cuando se inyectó el control negativo de CTRL en el hígado.

La Figura 2 proporciona una gráfica que resume el % relativo del factor VII del ARNm medido por qRT-PCR utilizando 2 ensayos Taqman. En cada par de barras que se muestra en la Figura 2, la barra de la izquierda se refiere al ensayo Taqman 29 y la barra de la derecha se refiere a los ensayos Taqman 33. Los números a lo largo del eje x se refieren a los compuestos lipídicos catiónicos analizados, como se muestra en la Tabla 1. Los datos demuestran que tales formulaciones poseen actividad in vivo. No se observó ninguna reducción cuando se inyectó el control negativo de CTRL en el hígado.

Ejemplo de referencia 9. Preparación de composiciones lipídicas

El siguiente conjunto de experimentos se realizó en esencia como se describe anteriormente en el EJEMPLO DE REFERENCIA 8, con las siguientes excepciones. La etapa de diálisis realizada después de la formación del ARNi/lipoplex no se realizó. Además, las proporciones en peso de polvo seco de las muestras de FIV 2,0, 57 NO y 84 NO fueron 37,8:10,4:51,8, y las proporciones en peso de polvo seco de las muestras 57 OPT, 72 OPT y 84 OPT fueron 60:7:33. Las formulaciones que se hicieron se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulaciones lipídicas

| Compuesto de referencia* | Lípido PEG | Lípido coadyuvante | Tampón | Etanol, % | Concentración, mg/ml |
|--------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|-----------|----------------------|
| IVF2.0 | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |
| 57 NO (CB00396) | C16 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |
| 57 OPT (CB00396) | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |
| 72 OPT (CB00401) | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |
| 84 NO (CB00416) | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |
| 84 OPT (CB00416) | C14 PEG2000 PE | Colesterol | Acetato de sodio 139,5 mM | 25 | 15,625 |

(*) Los números se refieren a los números de compuestos de referencia específicos mostrados anteriormente

La Figura 3 proporciona una gráfica que resume el % relativo de ARNm del Factor VII medido por qRT-PCR como se describe anteriormente. Los resultados se normalizan y se expresan como un % de la expresión restante de FVII (eje y) en función de la dosis administrada (mg/kg de peso corporal).

Ejemplo de referencia 10. Preparación de composiciones lipídicas para la administración in vitro

Se formularon algunos lípidos en composiciones lipídicas, que también comprendían colesterol o DOPE, tampones y etanol. El colesterol no de origen animal se compró en Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y el DOPE se compró en Avanti Lipids (Alabaster, AL). ARNi Silencer® Select CSNK2A1 y el control negativo ARNi Silencer® Select (nº. cat.

4390824 ARNip id n°. s3637 y cat n°. 4390843) con la secuencia antisentido AAACUAUAAUCGUACAUCUGA y UUACGUCGUCGUCGUUATT, respectivamente, se suspendieron de nuevo con agua sin nucleasas a una concentración de reserva de 50 μ M, que se diluyó más para cumplir con los experimentos posteriores. Está disponible comercialmente en Life Technologies (Carlsbad, CA).

- 5 Para los compuestos 83 y 67, los lípidos en polvo seco se volvieron a suspender en etanol a una concentración final de 1 mg/ml y se utilizaron como lípidos solos (Compuesto de referencia 83) o se combinaron con colesterol en una proporción de 1:0,5 (Compuesto de referencia 67). Las formulaciones ensayadas se realizaron como se describe en la Tabla 3,

Tabla 3. Formulaciones lipídicas

| Compuesto de referencia* | Lípido coadyuvante | Etanol, % |
|---|--------------------|-----------|
| 83 | Ninguno | 100 |
| 67 | Colesterol | 100 |
| (*) Los números se refieren a los números de los compuestos de referencia específicos mostrados anteriormente | | |

10

Las células neuronales de la corteza primaria de rata se adquirieron de GIBCO (Cat. No. A10840) y se mantuvieron en medio Neurobasal™ (n°. cat. 21103-049) suplementado con 2% de B-27® sin suero (50x n°. cat. 17504-044) y GlutaMAX™ 0,5 mM (n°. cat. 35050-061). Se adquirieron células neuronales primarias del hipocampo de rata de GIBCO (Cat. No. A10841) y se mantuvieron en medio Neurobasal™ (n°. cat. 21103-049) suplementado con 2% de B-27® sin suero (50x n°. cat. 17504-044), GlutaMAX™ 0,5 mM (n°. cat. 35050-061) y L-Glutamato 25 μ M (Sigma n°. cat. G-2834). Las células Hela se adquirieron de ATCC (ATCC n°. CCL-2) y se mantuvieron en DMEM, alto contenido de glucosa, GlutaMAX™, piruvato (n°. cat. 10569-010) suplementado con suero bovino fetal al 10%, certificado en EE. UU., inactivado por calor (n°. cat. 10082-139) y sin antibióticos.

15

20

25

30

Las células neuronales se colocaron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-d-lisina dos días antes de la transfección en 10K células/pocillo. Las células Hela se colocaron en placas de 96 pocillos un día antes de la transfección a 25 K/pocillo. Se diluyeron ARNips (3 pmol) en 20 μ l de agua sin nucleasas a una concentración final de 30 nM en tubos de 1,5 ml. Se hicieron mezclas maestras para cubrir todos los pocillos a transfectar para cada ARNip. Se prepararon diluciones de lípidos pipeteando 0,15, 0,3 y/o 0,6 μ l/pocillo o 0,3 μ l de LIPOFECTAMINE™ ARNiMAX como control en Opti-MEM® I en un volumen final total de 10 μ l/pocillo. Los complejos de lípidos y ARNi se prepararon mediante la adición de 10 μ l de la mezcla de lípidos a 20 μ l de ARNi diluido. Los complejos se mezclaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de una incubación de 10 minutos, se agregaron 30 μ l del complejo a las células puestas previamente en placas que contenían 120 μ l de medio de crecimiento cultivadas en placas de 96 pocillos que contenían 150 μ l. Después de 24 horas, las células se recolectaron con el kit TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ (n° de cat. AM1728, Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de que las células se lisaron, las reacciones de transcripción inversa (RT) se configuraron seguido de una PCR a tiempo real utilizando los ensayos de expresión génica TaqMan para el gen diana de interés (CSNK2A1 (Hs00953536_m1 para humanos o Rn00587582_m1 para ratas)) y se utilizó ARNr eucariótico 18s (4333760T) como control endógeno.

35

La Figura 4 muestra un gráfico que resume el porcentaje relativo de actividad restante de CSNK2A1 normalizado con el control negativo, medido por el ensayo de qPCR de las formulaciones de lipoplex del Compuesto de referencia 83 en células HeLa, neuronas corticales primarias de rata y neuronas del hipocampo primario de rata. Con referencia al eje x, los números se refieren al volumen final de la formulación de lípidos catiónicos resumida en la Tabla 3 para cada pocillo.

40

La Figura 5 proporciona un gráfico que resume el porcentaje relativo de actividad restante de CSNK2A1 normalizada con el control negativo, medida por el ensayo de qPCR de las formulaciones de lipoplex del Compuesto de referencia 67 en Hela, neuronas corticales primarias y neuronas primarias del hipocampo. Con referencia al eje x, los números se refieren al volumen final de lípido catiónico por pocillo analizado, como se muestra en la Tabla 3. Los datos demuestran que tales formulaciones poseen actividad in vitro.

45

Los resultados anteriores demuestran que las formulaciones descritas anteriormente son eficaces en la introducción de moléculas de ARNip en diversos órganos en animales in vivo, así como en células animales y humanas cultivadas in vitro.

Ejemplo 2. Administración de mRNA y expresión in vivo

Preparación de lípidos de transfección

El lípido catiónico 87 (mostrado arriba) fue sintetizado en Life Technologies, Carlsbad, CA de acuerdo con los

5 métodos descritos en este documento; el colesterol no de origen animal se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) (C16PEG) se compró en Avanti Lipids Alabaster. CB547, Colesterol y C16PEG se diluyeron en etanol al 100% a 40°C. La mezcla lipídica se mezcló luego en acetato de sodio 200 mM, pH 5,2, usando una jeringa equipada con una aguja 27G a un caudal de 20 ml/minuto. La formulación se almacenó entonces a 4°C.

Preparación de ARNm de CRE

La secuencia de ADNc para CRE que se usó en los experimentos que se exponen a continuación fue la siguiente:

TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATATGGGCGGTAGGCGTGTAC
 GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGCAACTTTTCTATACAAAGTTGCTATGG
 GCCCAAAGAAGAAGAGAAAGGTTTCGAATTTACTGACCGTACACCAAATTTGC
 CTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTTCGCAAGAACCTGATGGACA
 TGTTCAAGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACTGGAAAATGCTTCTGTCCGT
 TTGCCGGTTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCA
 GAACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAG
 TAAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCGG
 GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGG
 TTATGCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCAAAACAGG
 CTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTTCGACCAGGTTTCGTTCACTCATGGAAAATAG
 CGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTCTGGGGATTGCTTATAA
 CACCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCT
 CACGTA CTGACGGTGGGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGG
 TTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTA ACTAAACTGGTTCG
 AGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTG
 CCGGGTCAGAAAAAATGGTGTGCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGC
 TATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGG
 CGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGT
 GTCGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATG
 CAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTGG
 ATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGC GCCTGCTGGAAGATGGCGATTAGACATAGC
 AGCAATTGGCAAGCTGCTTATATAGA ACTTGCGGCGATTGGCA
 TGCCGCTTTAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATACATAGCAG
 CAATTGGCAAGCTGCTTATATAGA ACTTGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAAT
 TTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATACATAGCAGCAATTGGCAAGCT
 GCTTATATAGA ACTTGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTTATTTTATTTTCT
 TTTTCTTTTCCGAATCGGATACATAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTATATAGAAC
 TTGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAA
 TCGGATACATAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTATATAGA ACTTGCGGCGATTGGC
 ATGCCGCTTTAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATACATAGCA
 GCAATTGGCAAGCTGCTTATATAGA ACTTGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAA
 TTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGAT

El plásmido de ADN que contiene la secuencia de ADNc se sintetiza (GENEART® Gene Synthesis) y se clona en un vector de ADN plasmídico.

5 El ADN plasmídico purificado se digiere con la enzima de restricción Ase I (New England Biosciences, cat. No. R0526) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN linealizado se purifica utilizando el kit de purificación PCR PureLink™ (Life Technologies, cat. N° K310001) según el protocolo del fabricante, y se eluye con agua purificada. La concentración de ADN se determina por absorbancia UV. El sistema de producción de ARN Promega RiboMAX™ Large Scale-T7 (N° de cat. No. P 1300) se utiliza para sintetizar el ARNm de acuerdo con el protocolo del fabricante. En cada reacción, 5-10 µg de ADN linealizado produjeron 200-250 µg de ARNm. Después de la síntesis, el ARNm se purifica utilizando extracción con fenol:cloroformo seguido de precipitación etanólica. El producto de ARNm se suspende de nuevo en agua purificada y se determina la concentración. El ARNm se termina utilizando ScriptCap™ m⁷G Capping System (Cat. No. C-SCCE0625) y el kit ScriptCap™ 2'-O-metiltransferasa (Cat. No. C-SCMT0625), ambos de CellScript™. El ARNm protegido se poliadenila utilizando el kit Epicentre® Poly(A) Polymerase Tailing (n° de cat. No. PAP5104H). El producto final se purifica de nuevo a través de la extracción con fenol:cloroformo, seguido de una precipitación con ácido nucleico. El ARNm purificado se vuelve a suspender en agua purificada y se determina la concentración. La concentración se ajusta a 3 mg/ml en agua y se almacena a -80°C.

Preparación de complejos de transfección que contienen el lípido 87 y ARNm de Cre

20 La concentración de ARNm sintetizado en el paso anterior se ajusta a 0,3 mg/ml en agua que contenía etanol al 25%. El lipoplex (complejo de preliposoma de ARNm) se prepara mezclando volúmenes iguales de preliposoma y solución de ARNm. Después de mezclar, el complejo se incuba a 50°C durante 30 minutos, luego se dializa durante 2 horas en 1 litro de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 utilizando Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 8 kDa. Después de la diálisis, el volumen se mide y se ajusta con PBS a la concentración de ARNm deseada. El lipoplex se almacena a 4°C hasta la inyección in vivo.

Inyección intravenosa de complejo de mRNA de lipofectamina-547

25 Todos los procedimientos utilizados en estudios con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) y fueron consistentes con las regulaciones locales, estatales y federales, según correspondían. Los ratones se compraron en los laboratorios Jackson (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm3(CAG-luc)Tyj/J}). Este ratón porta un gen indicador de luciferasa impulsado por CMV con un codón de STOP flanqueado por loxP bajo el control de un promotor de CMV. En presencia de la recombinasa Cre, los sitios loxP se recombinan para extirpar el codón STOP, lo que permite la traducción de la proteína indicadora de luciferasa.

30 Para los experimentos con lacZ, se compraron ratones de 4 a 6 semanas de edad que tenían el gen lacZ (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor/J}). La expresión de lacZ se determinó mediante qRT-PCR utilizando métodos estándar. Se inyectaron 200 µl de lipoplex que contenía ARNm CRE en PBS preparado como se describió anteriormente por ratón mediante inyección en la vena de la cola a baja presión a una dosis de 1,5 mg/kg y 0,5 mg/kg (dosis de ARNm). Para la obtención de imágenes por luminiscencia, los ratones recibieron 150 mg de luciferasa de luciérnaga (Biosynth AG, Staad, Suiza) por kg de peso corporal dado i.p. Después de la anestesia con gas isoflurano (Abbott Laboratories, North Chicago, IL), los ratones se colocaron en una estación de formación de imágenes Xenogen IVIS (Xenogen Corp., Alameda, CA) y se tomaron imágenes utilizando el software Living Image (Xenogen Corporation).

40 La Fig. 6A muestra imágenes de todo el cuerpo de ratones tratados con un complejo de transfección que contiene ARNm de Cre y lípido 87 a 1,5 mg/kg (izquierda), 0,5 mg/kg (centro) o PBS (derecha). La expresión de luciferasa se midió utilizando Xenogen IVIS y la señal se cuantificó.

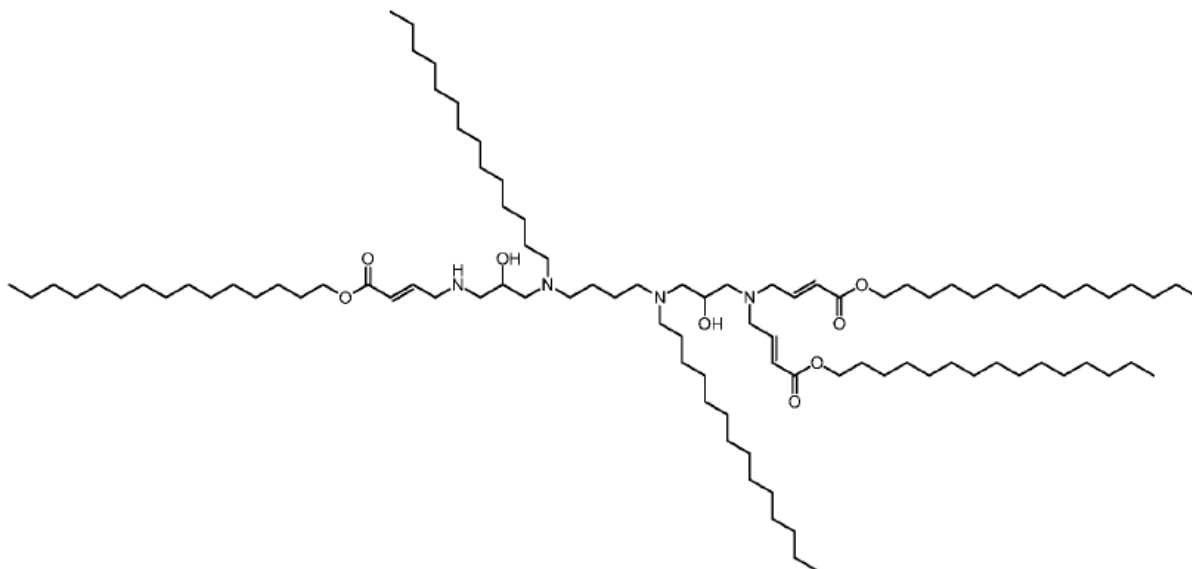
45 La Fig. 6B muestra órganos de envergadura completa de pulmón, corazón, bazo e hígado (según se indica) disecados de cada uno de los dos ratones tratados que se muestran en la Fig. 6A. Expresión de la luciferasa medida en Xenogen IVIS. La expresión de luciferasa se detectó en hígado y bazo. No se detectó ninguna expresión de luciferasa en ratones inyectados con PBS (Figura 1).

50 La FIG. 7 A-F es una representación gráfica que muestra el análisis de la expresión del gen LacZ medida por qRT-PCR. Los ratones tratados con un complejo de transfección que contenía ARNm de Cre y lípido 87 mostraron una expresión mucho más fuerte del gen lacZ en el bazo (comparar la expresión de HMBS control de bazo en la figura 7A con la expresión de Lacz en bazo en la figura 7B), hígado (comparar la expresión de HMBS control en hígado, fig. 7C con la expresión de LacZ en hígado en la figura 7D) en comparación con el control, según lo determinado por Cts. La entrada de ADNc se normalizó utilizando HMBS. No se observó ningún aumento de la expresión de lacZ en riñón (FIG. 7E y FIG. 7F).

55 No todas las figuras describen las propiedades del compuesto 87 reivindicado. Algunas de las figuras describen gráficas y propiedades relacionadas con compuestos de referencia y no están relacionadas con la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto 87 o sus sales farmacéuticamente aceptables:



87

2. Un complejo de transfección que comprende el compuesto de la reivindicación 1.

5 3. El complejo de transfección de la reivindicación 2, que comprende además al menos un lípido coadyuvante.

4. El complejo de transfección de la reivindicación 3, en el que al menos un lípido coadyuvante se selecciona de lípidos neutros y catiónicos.

5. El complejo de transfección de la reivindicación 3, en el que el lípido coadyuvante se selecciona de colesterol, derivados del colesterol y esteroides.

10 6. El complejo de transfección de la reivindicación 3, en el que el lípido coadyuvante se selecciona de colesterol, 3βOH-esteroides y sus derivados, fosfatidilcolina, BMOP (bromuro de N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadecenilo)-propanoammonio), DDPEs (Dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermidamida), DSPC, CTAB:DOPE (formulación de bromuro de cetiltrimetilamonio (CATB) y DOPE), POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DMG, DMAP (4-dimetilaminopiridina), DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina), DOMG, DMA, DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPEPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DODAC (cloruro de dioleoil-dimetilamonio), DOSPER (1,3-di-oleoil-2-(6-carboxiespermidil)-propilamida), DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DDAB (bromuro de didocil-metilamonio), DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetil-amonio), DOTAP·Cl, DC-col (3,β-N,N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoilcolesterol), DOSPA (trifluoroacetato de 2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetil-amonio), DC-6-14 (cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(alfatrimetilamonioacetil)di-etanolamina), DCPE (dicapropilfosfatidiletanolamina), DLRIE (bromuro de dilauril oxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), etil-PC, DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoil-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-N,N-di-metil-1-propanamino), DOGS (dioctadecilamidoglicil carboxiespermina), DMRIE (bromuro de N-[1-(2,3-dimiristil)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etil)amonio), DOEPC (dioleoilfosfatidilcolina), DOHME (yoduro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N-[1-(2-hidroxi)etil]-N,N-dimetilamonio), GAP-DLRIE:DOPE (bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodecilo)-1-propanimino/dioleoilfosfatidiletanolamina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosforac-(3-lisil(1-glicerol))·Cl), N-lauroilsarcosina, (R)-(+)-limoneno, lecitinas (y sus derivados); fosfatidiletanolamina (y sus derivados); fosfatidiletanolaminas, dioleoilfosfatidiletanolamina, DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina), DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolamina), dipalmitoilfosfatidiletanolamina, O-Chol (3 beta[1-ornitina-diacarbamoil]colesterol), POPE (palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina) y diestearoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilcolina; fosfatidilcolinas, DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidilglicerol; lípidos catiónicos a base de piperazina, fosfatidilglicerol, tales como DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) y diestearoilfosfatidilglicerol; fosfatidilserina (y sus derivados); fosfatidilserinas, tales como dioleoil o dipalmitoil-fosfatidilserina; sales de amonio dicuaternarias tales como N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina (TmedEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (PropEce), N,N'-dioleil-N,N,N',N'-

15

20

25

30

35

tetrametil-1,6-hexanodiamina (HexEce) y sus correspondientes análogos saturados de N,N'-dicetilo (TmedAce, PropAce y HexAce), difosfatidilgliceroles; ésteres de ácidos grasos; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-xilitol; 1-desoxi-1-[metil(ditetradecil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[metil(dioctadecil)amonio]-D-arabinitol, ésteres de glicerol; esfingolípidos; cardolipina; cerebrósidos; y ceramidas; y mezclas de los mismos.

5

7. El complejo de transfección de la reivindicación 2, que comprende además al menos un lípido pegilado.

8. El complejo de transfección de la reivindicación 2, que comprende además al menos un agente bioactivo.

9. El complejo de transfección de la reivindicación 8, en el que el agente bioactivo es una molécula de ADN, una molécula de ARN, una proteína o un fármaco.

10

10. El complejo de transfección de la reivindicación 9, en el que la molécula de ARN es un ARNip, un ARNhc, un ARNm, un ARNt o un ARNm.

11. El complejo de transfección de la reivindicación 8, en el que el agente bioactivo es ARNip.

12. El complejo de transfección de la reivindicación 8, en el que el agente bioactivo es ARNm.

13. El complejo de transfección de la reivindicación 8, en el que el agente bioactivo es ADN.

15

14. El complejo de transfección de la reivindicación 2, que comprende además colesterol y, al menos, un PEG seleccionado de C14PEG y C16PEG.

15. El complejo de transfección de la reivindicación 14, que comprende además una molécula de ARN.

16. El complejo de transfección de la reivindicación 15, en el que la molécula de ARN es un ARNip, un ARNhc, un ARNmi, un ARNmc o un ARNm.

20

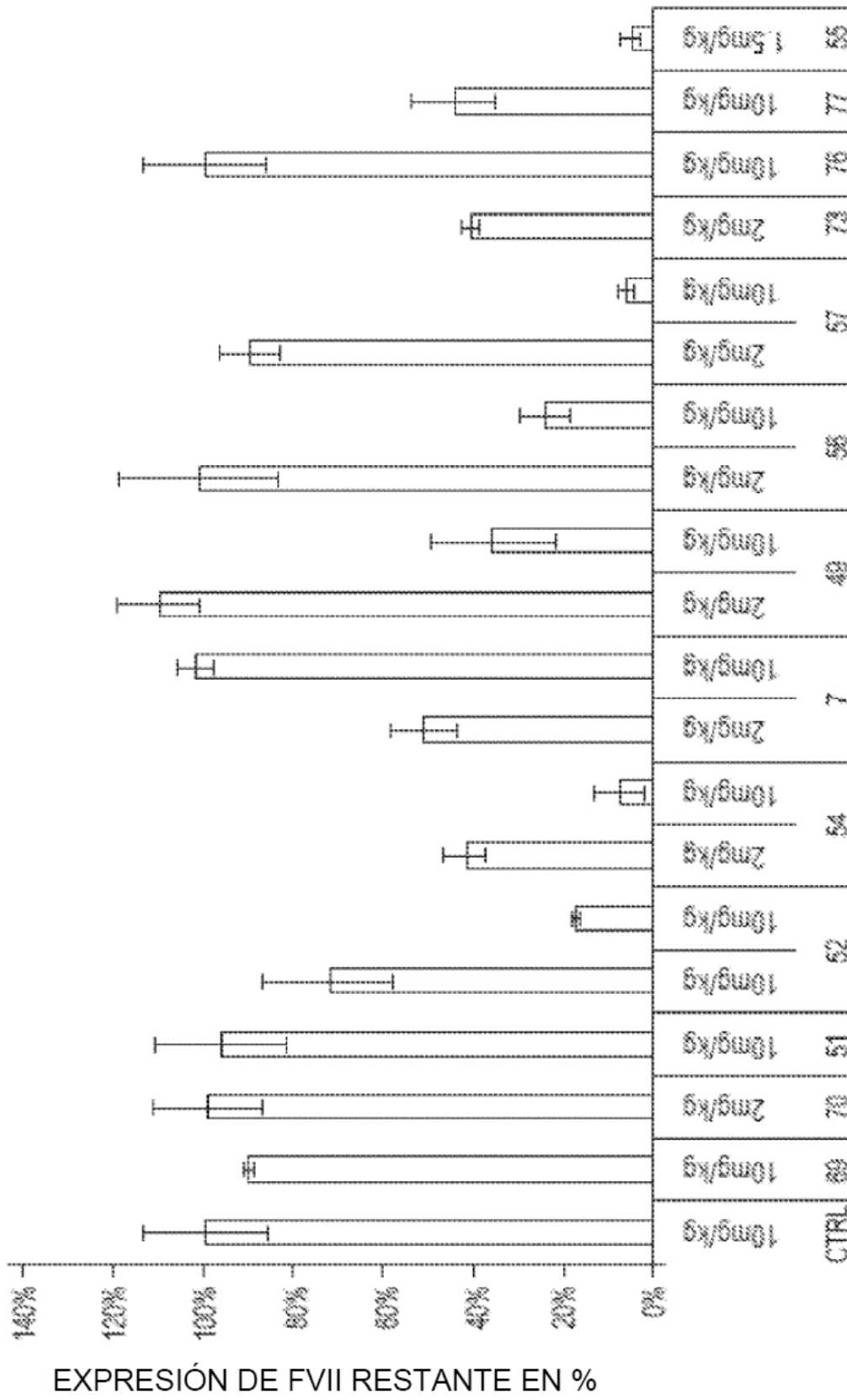


FIG. 1

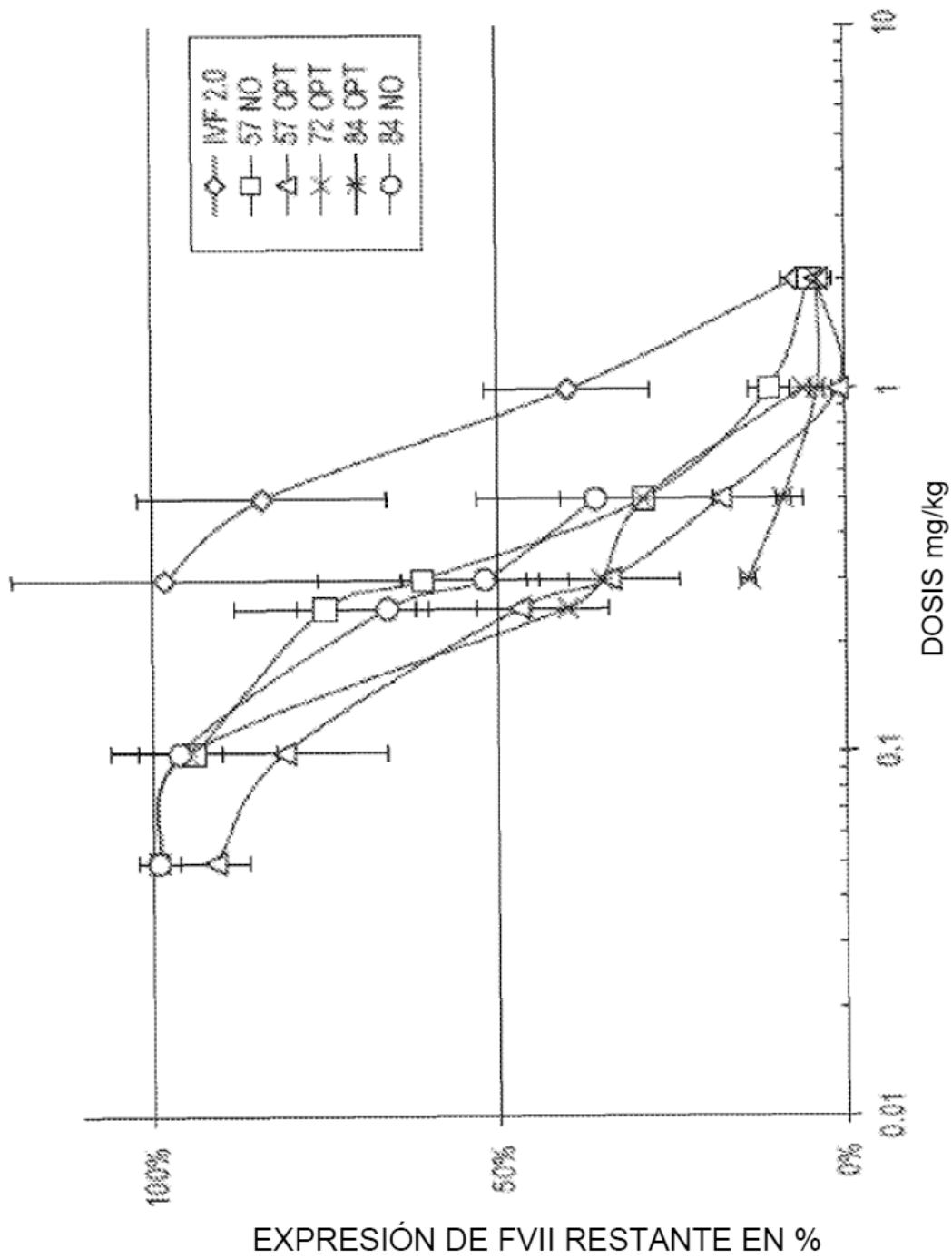


FIG. 3

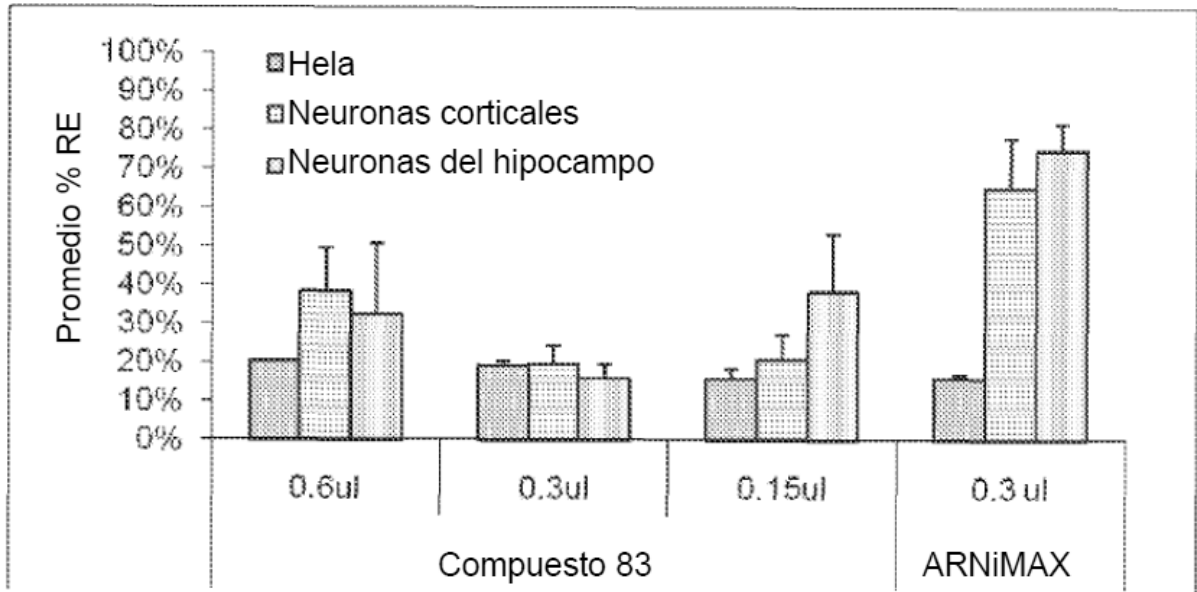


FIG. 4

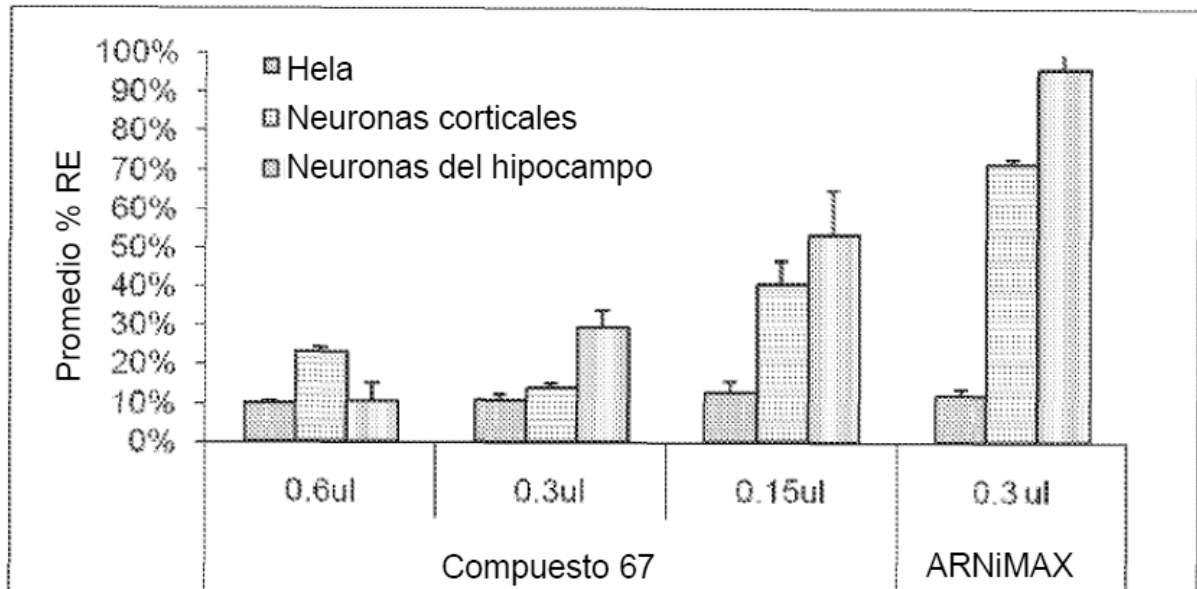


FIG. 5

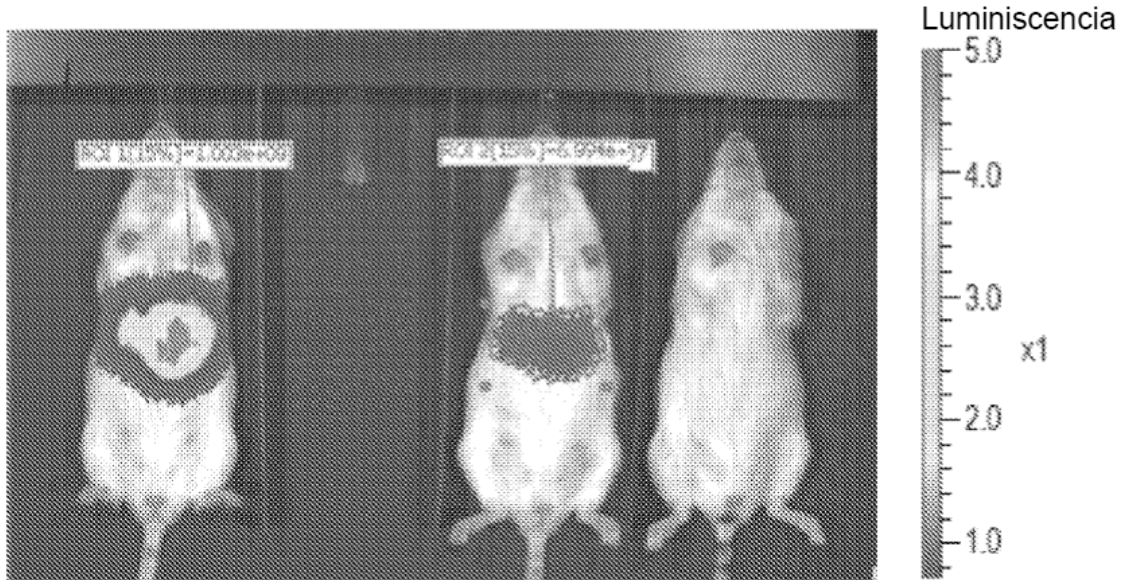


FIG. 6A

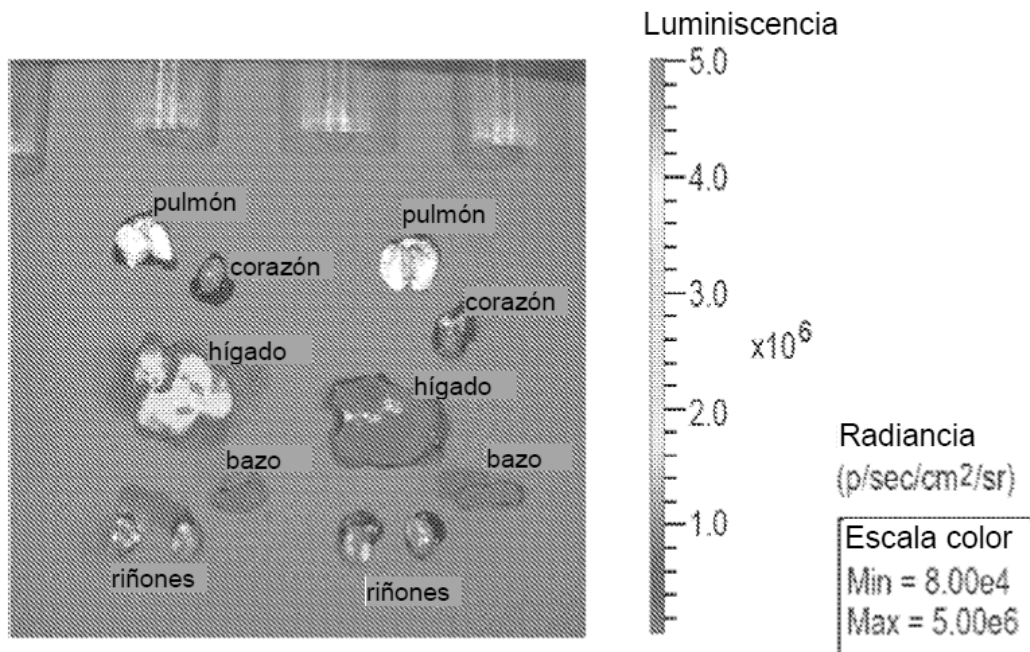


FIG. 6B

Gráfico de amplificación

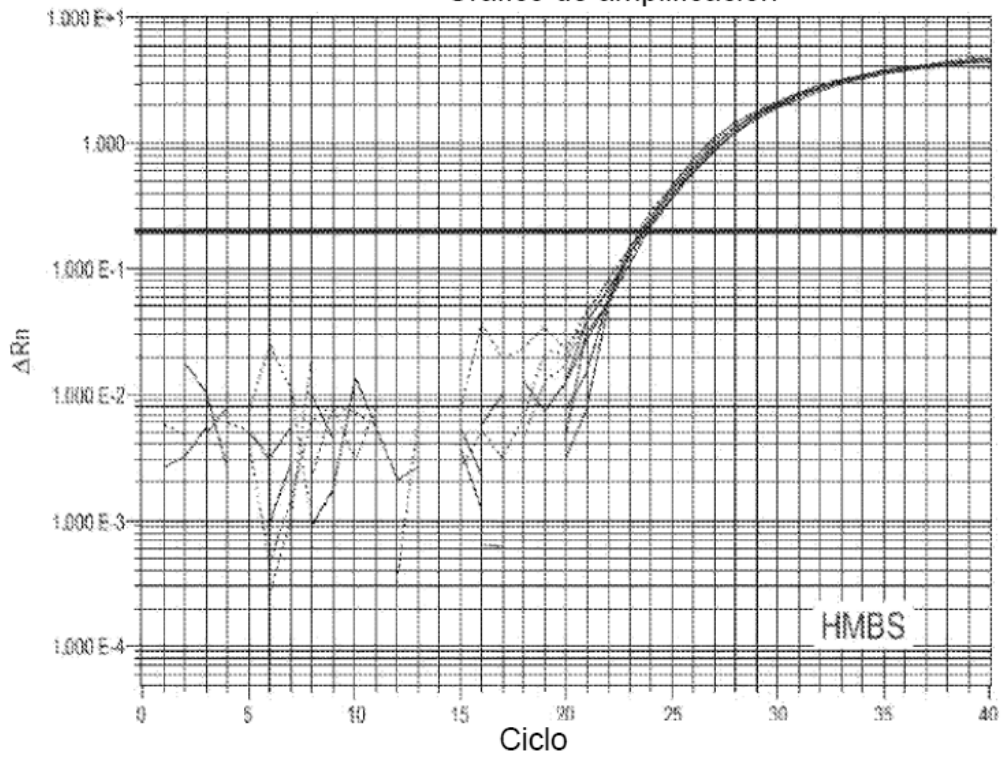


FIG. 7A

Gráfico de amplificación

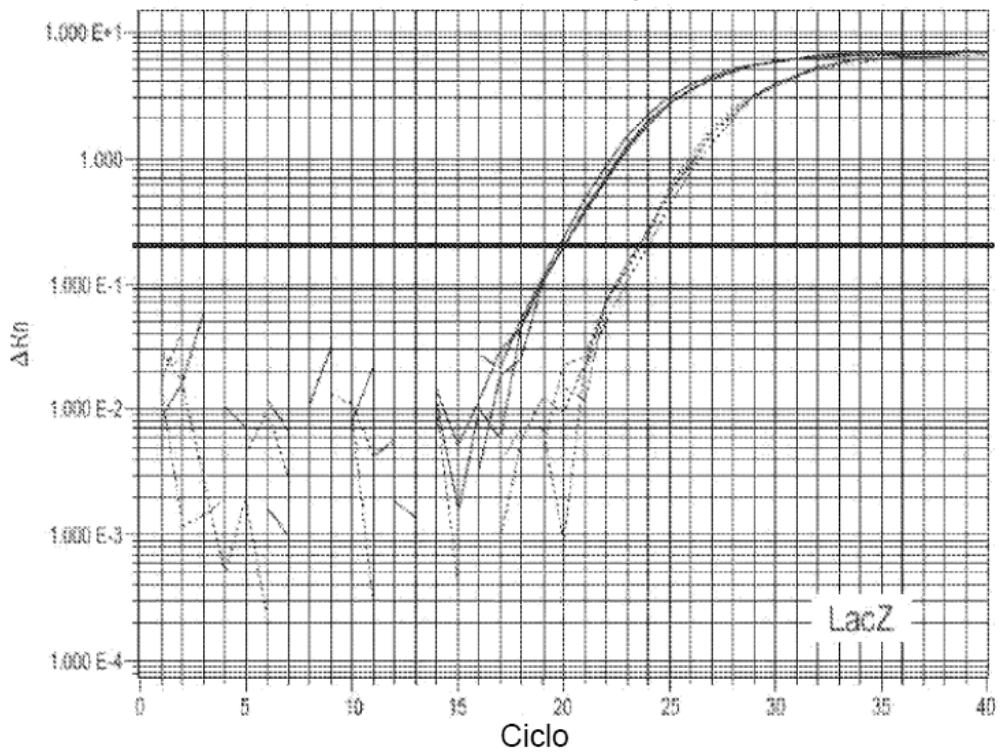


FIG. 7B

Gráfico de amplificación

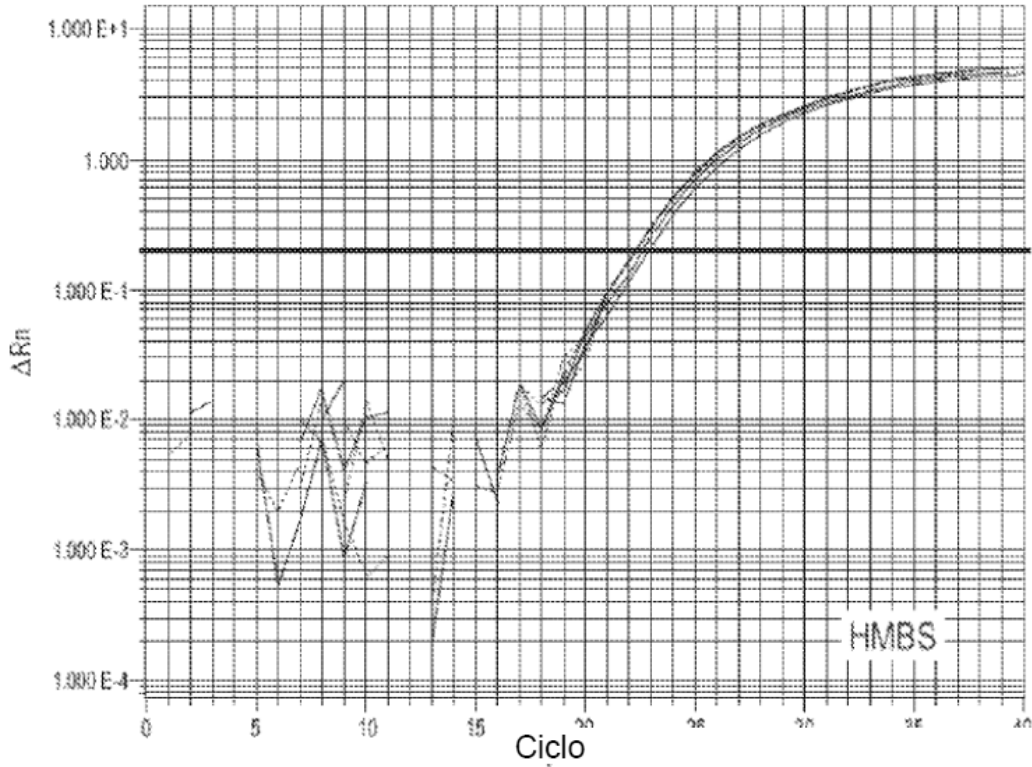


FIG. 7C

Gráfico de amplificación

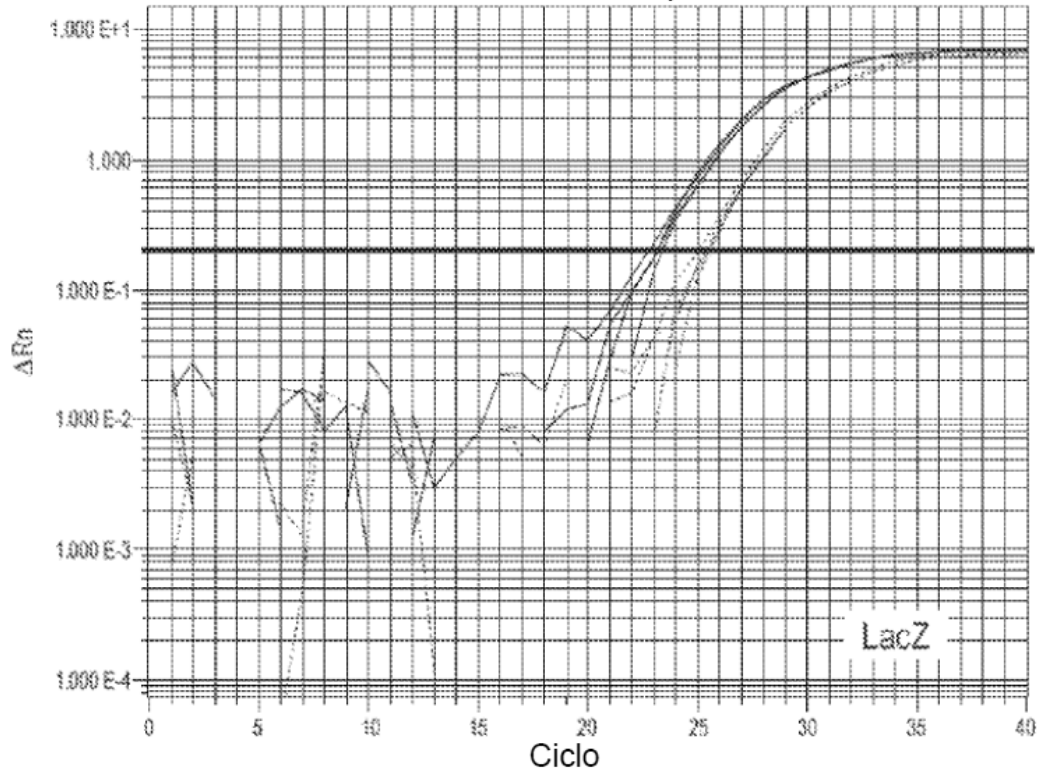


FIG. 7D

Gráfico de amplificación

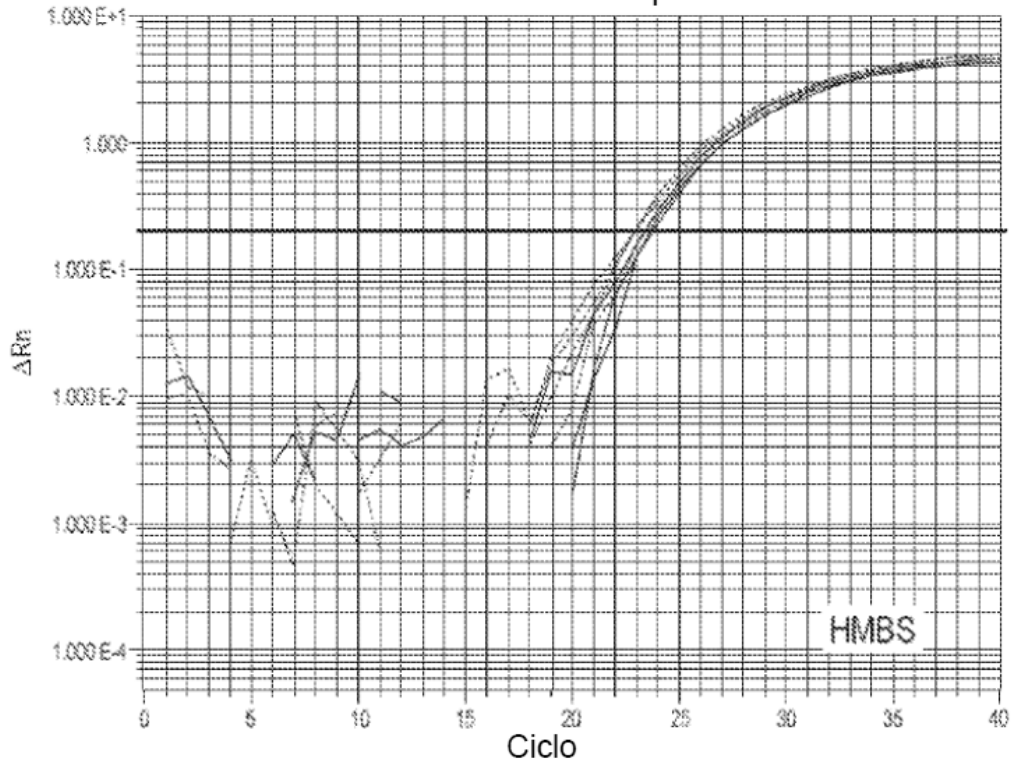


FIG. 7E

Gráfico de amplificación

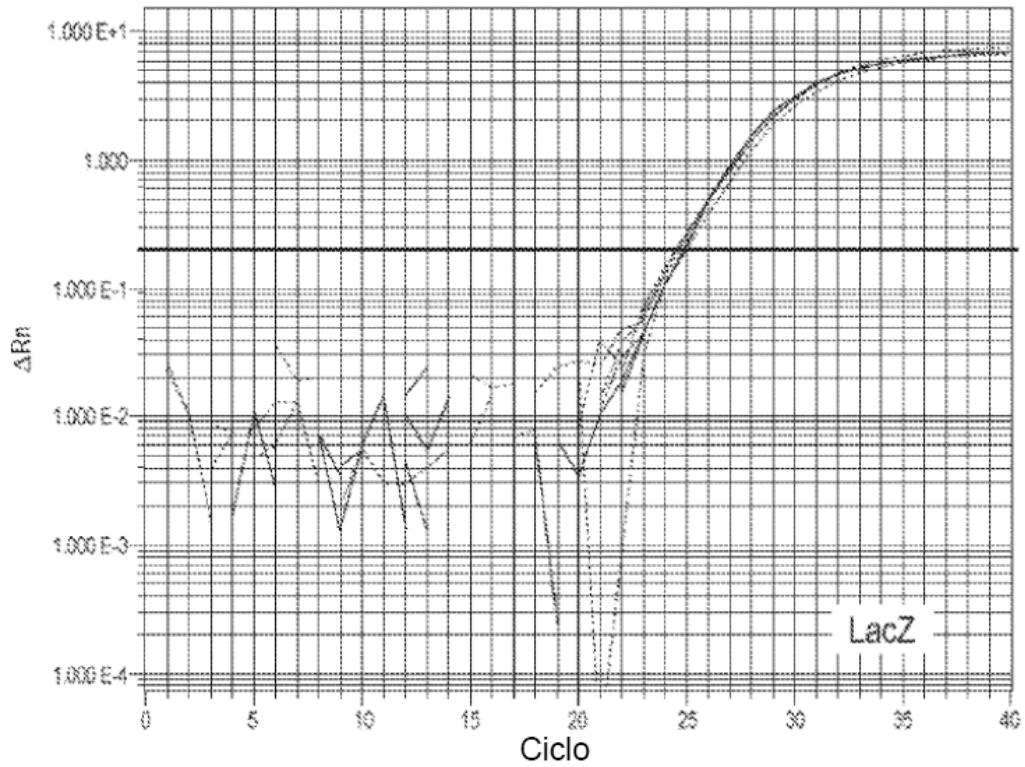


FIG. 7F