

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 219**

51 Int. Cl.:

C07C 217/28 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2017 PCT/GB2017/050664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017 WO17153779**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2017 E 17713373 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3426630**

54 Título: **Lípidos y complejos para el suministro de material biológicamente activo a células**

30 Prioridad:

11.03.2016 GB 201604235

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

03.03.2021

73 Titular/es:

**RYBOQUIN COMPANY LTD (100.0%)
Ettrick Riverside, Dunsdale Road
Selkirk TD7 5EB, GB**

72 Inventor/es:

**HAILES, HELEN CLAIRE;
TABOR, ALETHEA BERNICE;
MOHD MUSTAPA, MOHD FIROUZ;
HART, STEPHEN LEWIS y
TAGALAKIS, ARISTIDES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 809 219 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lípidos y complejos para el suministro de material biológicamente activo a células

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados lipídicos adecuados para la administración de materiales biológicamente activos, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas o moléculas pequeñas, a una célula. La invención se refiere además a complejos para uso en la preparación de vectores no virales para la administración de material biológicamente activo a células que incluyen dichos lípidos, por ejemplo, en combinación con péptidos, y al uso de dichos complejos, por ejemplo, en la profilaxis, el tratamiento y la vacunación, o en una instalación de laboratorio *in vitro*.

Antecedentes de la invención

10 La administración de genes para terapia u otros propósitos es bien conocida, particularmente para el tratamiento de enfermedades tales como la fibrosis quística y determinados cánceres. El término se refiere a la administración al interior de una célula de un gen, o de parte de un gen, para corregir alguna deficiencia. En la presente especificación el término se usa también para referirse a cualquier introducción de material de ácido nucleico en células diana, e incluye la vacunación génica y la producción *in vitro* de proteína útiles comercialmente en las denominadas factorías celulares.

15 Los sistemas de administración celular se clasifican en tres clases amplias, a saber, las que implican la inyección directa de ADN o ARN desnudo, las que usan virus o virus modificados genéticamente, y las que usan agentes de administración no virales. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Aunque los virus como agentes de administración presentan las ventajas de una elevada eficiencia y una elevada selectividad celular, tienen las desventajas de la toxicidad, la producción de respuestas inflamatorias y dificultad para tratar fragmentos de ADN grandes.

20 Los sistemas de administración de genes no virales se basan en la compactación de material genético en partículas nanométricas mediante interacción electrostática entre la cadena principal de fosfato cargada negativamente de ADN o ARN y lípidos catiónicos, péptidos u otros polímeros (Erbacher, P. et al., *Gene Therapy*, 1999, 6, 138-145). El uso de vectores de transfección no virales que incluyen lípidos, en lugar de virus, puede dar como resultado una menor toxicidad, especialmente una menor inmunogenicidad; una mayor seguridad; un coste reducido, una aplicación dirigida razonablemente eficiente, y una capacidad de empaquetamiento potenciada, p.ej., la capacidad de tratar con fragmentos grandes de material de ácido nucleico. Desafortunadamente, se han observado menores eficiencias de transfección. Los vectores de terapia génica no viral han sido objeto de revisiones recientes: (Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. *Non-viral vectors for gene-based therapy*. *Nature reviews Genetics*. 2014; 15: 541-55; Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG. *Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery*. *J Intern Med*. 2010; 267: 9-21; Zhao Y, Huang L. *Lipid nanoparticles for gene delivery*. *Adv Genet*. 2014; 88: 13-36.

35 Los complejos conocidos para administración de genes incluyen lipoplex para complejos de ácido nucleico basados en lípidos, polyplex para complejos basados en péptido o polímero y lipopolyplex para sistemas híbridos (Felgner et al., *Human Gene Therapy* 8, 1997, 511-512). Tal como se usa en la presente memoria, el término "LPD" es una forma de lipopolyplex que representa una formulación que comprende un lípido, un péptido de unión a integrina (u otro receptor) y ADN (u otro ácido nucleico). Los complejos LPD alcanzan la transfección a través de una ruta mediada por integrina o de una ruta mediada por otro receptor; no tienen por qué presentar una carga neta positiva por lo que se puede reducir la interacción con suero no deseada. El componente peptídico proporciona una función de empaquetamiento de ácido nucleico, de protección del ADN o ARN frente a la degradación intracelular o extracelular, endosomal o de otro tipo. Los componentes lipídicos median en las interacciones con bicapas de lípidos endosomales mediante fusión de membrana o permeabilización, reduciendo la degradación endosomal o lisosomal y permitiendo el tráfico de la carga de ácido nucleico al citoplasma. El componente peptídico puede diseñarse para ser específico de célula o específico de receptor de superficie celular. Por ejemplo, el grado de especificidad para integrina u otros receptores puede conferir un grado de especificidad celular al complejo LPD. La especificidad es el resultado de la acción dirigida a los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de integrina), y se pueden alcanzar eficiencias de transfección comparables a algunos vectores adenovirales (Du Z, Munye MM, Tagalakis AD, Manunta MD, Hart SL. *The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations*. *Sci Rep*. 2014; 4: 7107; Welser K, Campbell F, Kudsiova L, Mohammadi A, Dawson N, Hart SL, et al. *Gene delivery using ternary lipopolyplexes incorporating branched cationic peptides: the role of Peptide sequence and branching*. *Mol Pharm*. 2013; 10: 127-41; Meng QH, Irvine S, Tagalakis AD, McAnulty RJ, McEwan JR, Hart SL. *Inhibition of neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model following non-viral transfection with human iNOS cDNA*. *Gene Ther*. 2013; 20: 979-86; Manunta MD, McAnulty RJ, McDowell A, Jin J, Ridout D, Fleming J, et al. *Airway deposition of nebulized gene delivery nanocomplexes monitored by radioimaging agents*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013; 49: 471-80; Kenny GD, Bienemann AS, Tagalakis AD, Pugh JA, Welser K, Campbell F, et al. *Multifunctional receptor-targeted nanocomplexes for the delivery of therapeutic nucleic acids to the Brain*. *Biomaterials*. 2013; 34: 9190-200; Tagalakis AD, He L, Saraiva L, Gustafsson KT, Hart SL. *Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for siRNA delivery*. *Biomaterials*. 2011; 32: 6302-15; Tagalakis AD, Grosse SM, Meng QH, Mustapa MF, K wok A, Salehi SE, et al. *Integrin-targeted*

nanocomplexes for tumour specific delivery and therapy by systemic administration. *Biomaterials*. 2011; 32: 1370-6; Manunta MD, McAnulty RJ, Tagalakis AD, Bottoms SE, Campbell F, Hailes HC, et al. *Nebulisation of receptor-targeted nanocomplexes for gene delivery to the airway epithelium*. *PLoS One*. 2011; 6: e26768; Grosse SM, Tagalakis AD, Mustapa MF, Elbs M, Meng QH, Mohammadi A, et al. *Tumor-specific gene transfer with receptor-mediated nanocomplexes modified by polyethylene glycol shielding and endosomally cleavable lipid and peptide linkers*. *FASEB J*. 2010; 24: 2301-13.

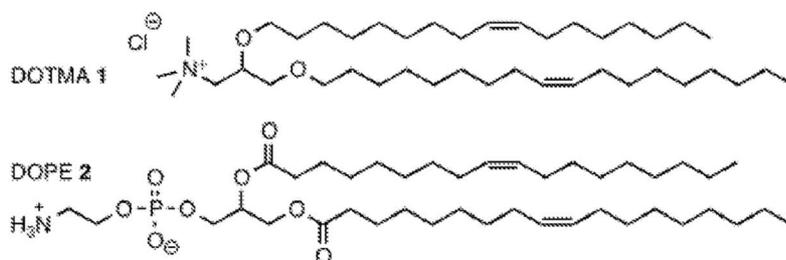
Se han reportado péptidos dirigidos a células epiteliales de vías respiratorias humanas (WO02/072616). Se han reportado péptidos dirigidos a células dendríticas (WO2004/108938).

Los vectores de lípido/péptido transfectan un rango de líneas celulares y cultivos celulares primarios con una elevada eficiencia y una baja toxicidad: células epiteliales (40% de eficiencia), células de músculo liso vascular (50% de eficiencia), células endoteliales (30% de eficiencia) y células hematopoyéticas (10% de eficiencia). Adicionalmente, se ha demostrado la transfección *in vivo* de epitelio bronquial de ratón (Manunta MD, McAnulty RJ, Tagalakis AD, Bottoms SE, Campbell F, Hailes HC, et al. *Nebulisation of receptor-targeted nanocomplexes for gene delivery to the airway epithelium*. *PLoS One*. 2011; 6: e26768; Tagalakis AD, McAnulty RJ, Devaney J, Bottoms SE, Wong JB, Elbs M, et al. *A receptor-targeted nanocomplex vector system optimized for respiratory gene transfer*. *Mol Ther*. 2008; 16: 907-15. Jenkins et al., *Formation of LID vector complexes in water alters physicochemical properties and enhances pulmonary gene expression in vivo*, *Gene Therapy* 2003, 10, 1026-34), pulmón de rata (Jenkins et al., *An integrin-targeted non-viral vector for pulmonary gene therapy*, *Gene Therapy* 2000, 7, 393-400) y pulmón de cerdo (Manunta MD, McAnulty RJ, McDowell A, Jin J, Ridout D, Fleming J, et al. *Airway deposition of nebulized gene delivery nanocomplexes monitored by radioimaging agents*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013; 49: 471-80; Cunningham et al., *Evaluation of a porcine model for pulmonary gene transfer using a novel synthetic vector*, *J Gene Med* 2002, 4, 438-46) y con una eficiencia comparable a la de un vector adenoviral (Jenkins et al., 2000, ver anterior).

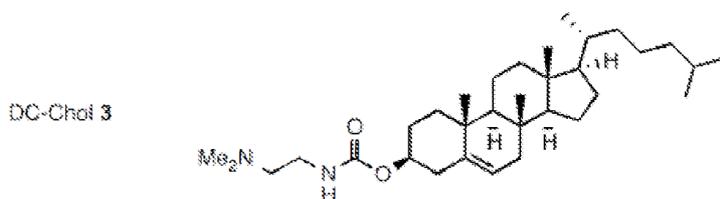
Un péptido para uso en dichos complejos LPD o complejos lípido/péptido debe presentar dos funcionalidades: un "grupo de cabeza" que contiene una secuencia de reconocimiento de receptor de superficie celular (por ejemplo, integrina) y una "cola" que se puede unir a ADN de forma no covalente. Los péptidos conocidos en los que estos dos componentes se encuentran unidos covalentemente a través de un espaciador, de modo tal que no se interfieren en sus funciones individuales, incluyen péptidos en los que la "cola" es un componente de unión a ácido nucleico policatiónico, tal como el péptido 6 descrito en el documento WO96/15811.

Los experimentos iniciales que implican complejos LPD que incluyen dichos péptidos han indicado propiedades de transfección insuficientemente elevadas en la ruta de administración sistémica o intravenosa. El problema probable, como se ha descrito para otros vectores policatiónicos, es la asociación del vector a proteínas del suero y a las membranas de eritrocitos, lo que conduce a una mala solubilidad y una rápida eliminación del vector por los sistemas reticuloendoteliales (Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A, Seymour, L. W. (1999) *Gene Therapy* 6, 643-50). Los vectores que han presentado alguna actividad de transfección por administración sistémica han sido efectivos mayormente en los lechos capilares de primer paso de órganos tales como el hígado y el pulmón (Fenske, D. B., MacLachlan, I., Cullis, P. R. (2001). *Curr OpinMol Ther* 3, 153-8). Aunque dicha actividad de transfección no específica puede tener algunas aplicaciones terapéuticas, el uso clínico seguro para aplicaciones específicas demanda vectores con una especificidad de diana mucho mayor.

En relación al componente lipídico de los complejos LPD, los lípidos catiónicos para dicho uso fueron desarrollados por Felgner a finales de la década de 1980, y se publicaron en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417, 1987 y en el documento US 5.264.618. Felgner desarrolló el liposoma catiónico disponible comercialmente en la actualidad conocido bajo el nombre comercial "Lipofectin" que consiste en la citofectina, DOTMA 1 y el lípido neutro DOPE 2 en una proporción de 1:1.



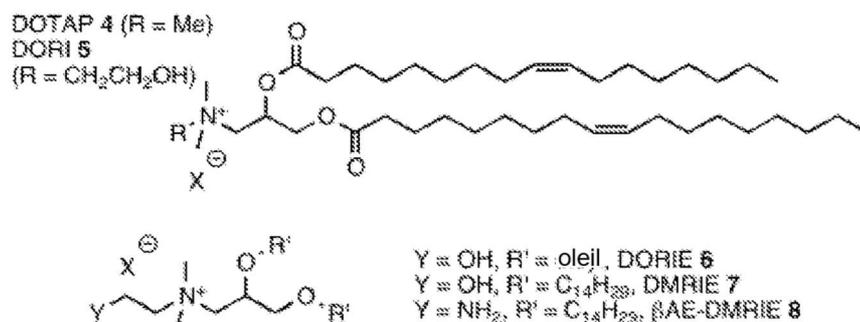
Desde entonces se han concebido otras formulaciones de liposomas catiónicos, la mayoría de las cuales combinan una citofectina catiónica sintética y un lípido neutro. Algunas, por ejemplo, se basan en el esqueleto del glicerol (tal como DOTMA) o en el colesterol, tal como DC-Chol 3.



El objetivo al desarrollar nuevas citofectinas a menudo ha sido optimizar las propiedades de administración del vector resultante para una amplia variedad de tipos celulares, y para aplicaciones *in vivo*.

5 Las citofectinas y otros lípidos catiónicos son moléculas cargadas positivamente que tienen un grupo de cabeza catiónico unido a través de un espaciador a una cola hidrofóbica. Además de los análogos de DOTMA 1, se ha reportado una serie de análogos con enlaces éter o éster al esqueleto de glicerol, con grupos de cadena alquílica y grupos de cabeza funcionalizados alternativos, tal como el diéster DOTAP 4. Se puede encontrar una revisión de estos materiales, y de los mecanismos mediante los cuales operan, en *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1768-1785, 1998. Una característica común de muchas citofectinas de análogo de DOTMA 1 es la presencia de dos colas hidrofóbicas unidas al grupo de cabeza catiónico.

Hay estudios que han establecido que, para muchos tipos de células, los experimentos *in vitro* con DOTMA 1 y DOTAP 4 proporcionaron niveles de transfección comparables, pero cuando se usaron *in vivo* el DOTMA 1 exhibió mayores actividades de transfección. Otros análogos reportados incluyen el diéster DORI 5 con un grupo de cabeza *N,N*-dimetil *N*-etanolamina, el correspondiente diéster DORIE 6, y el análogo C14:0 DIMRIE 7.



15 Las citofectinas que contienen dichos grupos funcionales hidroxialquilo de amina cuaternaria han demostrado ser particularmente interesantes, y los lípidos con grupos hidroxialquilo más cortos dieron lugar a propiedades mejoradas. Por ejemplo, la co-formulación de DORIE 6 con un resto hidroxietilo en el grupo de cabeza con el lípido colaborador DOPE 2, dio lugar a mayores eficacias de transfección en células COS.7, en comparación con lípidos con grupos hidroxipropilo-hidroxipentilo. Todas estas hidroxialquil citofectinas con más actividad que DOTMA 1 y DIMRIE 7 también han sido destacadas como uno de los lípidos más eficientes.

Se creyó que las citofectinas con grupos hidroxilo terminales eran particularmente efectivas, debido a que el grupo hidroxilo era capaz de aumentar la interacción del liposoma con el ADN o con las membranas celulares, o debido a que era capaz de estabilizar la estructura bicapa de lípido catiónico:DOPE 2, a través de neutralización de la carga y/o formación de enlaces de hidrógeno.

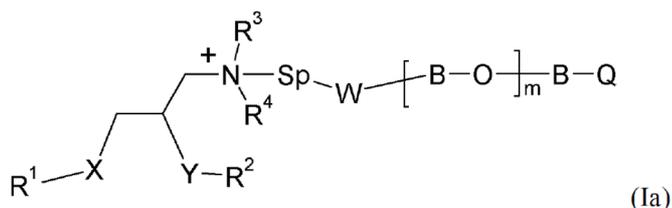
El documento WO 2005/117985 describe lípidos que comprenden uno o más grupos de polietilen glicol (PEG) (es decir, lípidos PEGilados) y muestra que dichos lípidos PEGilados presentan beneficios respecto a los lípidos sin grupos PEG (es decir, lípidos no PEGilados). En concreto, el problema de la rápida eliminación de los lípidos por parte del sistema reticuloendotelial provocada por su unión a proteínas del plasma y por la agregación de vector puede aliviarse protegiendo los vectores con grupos funcionales PEG poliméricos. Sin embargo, la PEGilación a menudo conduce a una reducción grande de la eficiencia de transfección, y sigue existiendo una necesidad de lípidos que no sean eliminados rápidamente por parte del sistema reticuloendotelial, pero que muestren una eficiencia de transfección satisfactoria.

35 El lípido, DODEG4 13, un lípido de diéster basado en glicerol que posee un grupo de cabeza de *n*-etilen glicol corto y su aplicación en la administración dirigida de lipopolyplex (lípido-péptido-ADN) ha sido reportado previamente en Hurlley, C. A; Wong, J. B.; Ho, J.; Writer, M.; Irvine, S. A; Lawrence, M. J.; Hart, S. L.; Tabor, A B.; Hailes, H. C. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 2554-2559 y en Welser, K.; Campbell, F.; Kudsiyova, L.; Mohammadi, A; Dawson, N.; Hart, S.L.; Barlow, D.J.; Hailes, H.C.; Lawrence, M.J.; Tabor, A.B.; *Mol. Pharm.* 2013, 10, 127-141.

Sumario de la invención

Los inventores de la presente han descubierto una nueva clase de compuestos iónicos que son útiles como la parte lipídica, o como componentes de la misma, de un complejo LPD. Los compuestos iónicos son lípidos catiónicos tri-cadena que presentan tres colas hidrofóbicas unidas al grupo de cabeza catiónico, uno de los cuales estando unido a través de un enlace de alquilen glicol. Se ha descubierto que los nuevos lípidos tri-cadena mejoran la eficiencia de transfección de los vectores de transfección sintéticos a los que se incorporan, por ejemplo, en comparación con el análogo de citofectina di-cadena DOTMA **1** que incluye dos colas hidrofóbicas unidas al grupo de cabeza catiónico.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto iónico de fórmula (Ia):



10 en donde:

- cada uno de X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan entre -O-, y -O-C(O)- donde el carbono carbonilo está enlazado al grupo R¹ o R²;
- R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₋₁₀ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR¹, -C(O)OH, -CN, -N(R¹)₂ y -C(O)R¹, donde cada R¹ es igual o diferente y es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- Sp y W forman juntos un enlace; o
- Sp es un grupo alquilen C₁₋₈ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR¹, donde R¹ es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆; y W se selecciona entre enlace, -O-C(O)-, -C(O)-O- y -O-;
- cada B es igual o diferente y es un grupo alquilen C₁₋₆ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR^A, -NR^AR^A y -OC(O)R^A;
- donde cada R^A se selecciona de forma independiente entre hidrocarbilo C₁₋₄;
- m es un número entero entre 1 y 8; y
- Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵, donde R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₇₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆.

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo de transfección no viral que comprende (i) un compuesto iónico del primer aspecto de la invención. De forma ventajosa, el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención comprende además (iv) un ácido nucleico u otro compuesto activo para la administración a una célula. De forma ventajosa, el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención es adecuado para uso como medicamento o como vacuna.

35 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención mezclado o en conjunción con un vehículo farmacéuticamente adecuado.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un compuesto iónico del primer aspecto de la invención o un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso en terapia.

40 En un quinto aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi, que comprende administrar el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención al humano o al animal no humano.

En un sexto aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento de un humano o de un animal no humano que padece un cáncer que comprende administrar el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o del complejo de transfección del segundo aspecto de la invención al humano o al animal no humano.

5 En un séptimo aspecto, la invención proporciona el uso del compuesto iónico del primer aspecto de la invención o del complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi.

10 En un octavo aspecto, la invención proporciona el uso del compuesto iónico del primer aspecto de la invención o del complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de cáncer en un humano o en un animal no humano.

En un noveno aspecto, la invención proporciona el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi.

15 En un décimo aspecto, la invención proporciona el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o del complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer en un humano o en un animal no humano.

En un undécimo aspecto, la descripción proporciona un kit que comprende:

20 (i) un compuesto iónico del primer aspecto de la invención ácido nucleico; un péptido que comprende (ii) un componente unido a ácido nucleico policatiónico y (iii) un componente de unión a receptor de superficie celular; y, opcionalmente, (iv) un ácido nucleico.

25 Se observó que las eficacias de transfección de lipopoliplexos LPD (lípido-péptido-ácido nucleico) que comprenden lípidos de tres cadenas de la invención eran significativamente superiores a las de análogos de dos cadenas. Previamente hemos demostrado que los componentes lipídicos de los complejos LPD son particularmente importantes para el tráfico intracelular a través de la membrana endosomal, y por tanto se propone la hipótesis de que dichos lípidos potencian la eficiencia de transfección contribuyendo a dicho proceso (Du Z, Munye MM, Tagalakis AD, Manunta MD, Hart SL. *The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplexformulations*. Sci Rep. 2014; 4: 7107). También pueden afectar a la estructura interna del nanocomplejo, permitiendo una liberación más eficiente del ácido nucleico dentro de la célula (Munye MM, Ravi J, Tagalakis AD, McCarthy D, Ryadnov MG, Hart SL. *Role of liposome and peptide in the synergistic enhancement of transfection with a lipopolyplex vector*. Sci Rep. 2015; 5: 9292). Los nuevos lípidos tri-cadena de la invención proporcionan por tanto una nueva generación de vectores de administración génica de citofectina efectivos, basados en el uso de tres cadenas hidrofóbicas.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra transfecciones de células NIH3T3 con formulaciones LPD que contienen el péptido ME27 y el plásmido pCI-Luc en combinación con un lípido divisible PEG-éster (ME42), un lípido no divisible PEG-éster (CH300), un lípido PEG-éster tri-cadena de la invención (FMM30), o un lípido relacionado con ME42 con oleilo ligado a través de un enlace éster (FMM32), algunos de los cuales estaban en combinación con el lípido neutro fusogénico DOPE.

La figura 2 muestra el resultado del mismo experimento descrito en la Figura 1 pero llevado a cabo con una segunda línea celular, 1HAEo-.

40 La figura 3 muestra la transfección con formulaciones LPD que contienen un lípido divisible PEG-éster (ME42), un lípido no divisible PEG-éster (CH300) o un lípido PEG-éster tri-cadena de la invención (FMM30), un lípido relacionado con ME42 con oleilo ligado a través de un enlace éster (FMM32), un diéster, lípido insaturado con cola de alquilo C16 (106a), algunos de los cuales estaban en combinación con el lípido neutro fusogénico DOPE. Los lípidos se combinaron con los péptidos ME27, K16CY, K16Y y K16P, y se usaron para transfectar células NIH3T3 con pCI-Luc.

45 La figura 4 muestra la transfección con complejos LPD que contienen un lípido divisible PEG-éster (ME42), un lípido no divisible PEG-éster (CH300) o un lípido PEG-éster tri-cadena de la invención (FMM30) combinados con los péptidos K16Y o ME27. Las transfecciones se llevaron a cabo en células de neuroblastoma de ratón, Neuro 2A.

La figura 5 muestra imágenes de microscopio electrónico de transmisión (EM) de partículas LPD que comprenden FMM30 con el péptido ME27 en una proporción en peso de 0,75:4:1 (L:P:D).

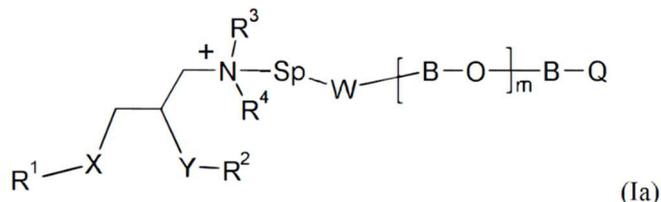
50 La figura 6 muestra imágenes de microscopio electrónico de transmisión (EM) de partículas LPD que comprenden FMM30/DOPE con el péptido ME27 en una proporción en peso de 0,75:4:1 (L:P:D).

La figura 7 muestra el tamaño de las nanopartículas LPD que contienen péptido ME27 con los lípidos FMM30 o FMM30/DOPE a diferentes proporciones en peso de liposoma a ADN (p/p).

Descripción detallada de la invención

Lípidos

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto iónico de fórmula (Ia):



5 en donde:

- cada uno de X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan entre -O-, y -O-C(O)- donde el carbono carbonilo está enlazado al grupo R¹ o R²;
- R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₋₁₀ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR¹, -C(O)OH, -CN, -N(R¹)₂ y -C(O)R¹, donde cada R¹ es igual o diferente y es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;

10

- Sp y W forman juntos un enlace; o

15

- Sp es un grupo alquileo C₁₋₈ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR¹, donde R¹ es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆; y W se selecciona entre enlace, -O-C(O)-, -C(O)-O- y -O-;

20

- cada B es igual o diferente y es un grupo alquileo C₁₋₆ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR^A, -NR^AR^A y -OC(O)R^A;

en donde cada R^A se selecciona de forma independiente entre hidrocarbilo C₁₋₄;

- m es un número entero entre 1 y 8; y

- Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵, donde R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆.

25

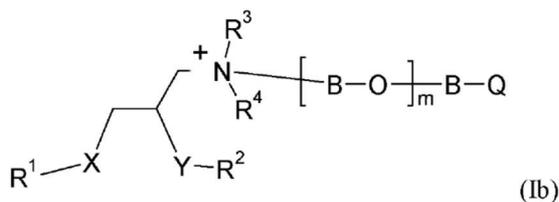
Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia) donde tanto Sp como W son ambos enlaces, o Sp es un grupo alquileo C₁₋₈ no sustituido y W es un enlace, -O-C(O)-, -C(O)-O- o -O-, especialmente un enlace, -C(O)-O- o -O-. De forma ventajosa, Sp y W son ambos enlaces, o Sp es un grupo alquileo C₁₋₈ no sustituido y W es -C(O)-O-.

30

El término "alquileo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un radical divalente derivado de eliminar dos átomos de hidrógeno de un alcano, también conocido como grupo alcanodiilo, por ejemplo, -CH(CH₃)CH₂- (propano-1,2-diilo).

El término "hidrocarbilo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo univalente formado eliminando un átomo de hidrógeno de un hidrocarburo, por ejemplo, etilo o fenilo.

El compuesto iónico del primer aspecto de la invención opcionalmente tiene la fórmula (Ib):

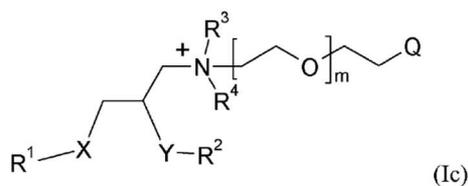


35

en donde:

- cada uno de X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan entre -O-, y -O-C(O)- donde el carbono carbonilo está enlazado al grupo R¹ o R²;
 - R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
 - R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₋₁₀ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR¹, -C(O)OH, -CN, -N(R¹)₂ y -C(O)R¹, donde cada R¹ es igual o diferente y es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
 - cada B es igual o diferente y es un grupo alquileo C₁₋₆ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR^A, -NR^AR^A y -OC(O)R^A;
- en donde cada R^A se selecciona de forma independiente entre hidrocarbilo C₁₋₄;
- m es un número entero entre 1 y 8; y
 - Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵, grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆.
- Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia) o (Ib), donde cada B se selecciona entre un grupo alquileo C₁₋₃ sin sustituir, especialmente etileno.

El compuesto iónico del primer aspecto de la invención opcionalmente tiene la fórmula (Ic):



en donde:

- cada uno de X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan entre -O-, y -O-C(O)- donde el carbono carbonilo está enlazado al grupo R¹ o R²;
- R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₋₁₀ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR¹, -C(O)OH, -CN, -N(R¹)₂ y -C(O)R¹, donde cada R¹ es igual o diferente y es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- m es un número entero entre 1 y 8; y
- Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵, donde R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, en donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆.

El término "hidrocarbilo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo saturado o insaturado, lineal o ramificado, a menos que se indique lo contrario.

- Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia), (Ib) o (Ic), donde R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno independientemente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₂ que tiene uno, dos o tres dobles enlaces, especialmente un doble enlace.

- De forma ventajosa, R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ de cadena lineal insaturado que presenta un doble enlace. Opcionalmente, R¹ y R² se seleccionan entre -(CH₂)₅₋₁₀CH=CH(CH₂)₅₋₉CH₃, especialmente -(CH₂)₆₋₉CH=CH(CH₂)₆₋₈CH₃, tal como -(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ o -(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃. Preferiblemente, el doble enlace es *cis* y R¹ y R² se seleccionan entre -(CH₂)₅₋₁₀CH[Z]=CH(CH₂)₅₋₉CH₃, especialmente -(CH₂)₆₋₉CH[Z]=CH(CH₂)₆₋₈CH₃, tal como -(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ o -(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃. Preferiblemente X-R¹ e Y-R² se selecciona entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃. Preferiblemente, cada uno de X e Y son iguales. Preferiblemente, cada uno de R¹ y R² son iguales. Preferiblemente, cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales. Preferiblemente, cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃.

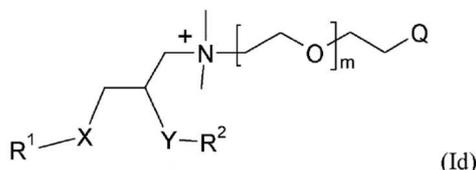
Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia), (Ib) o (Ic), donde R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo alquilo C₁₋₁₀ lineal o ramificado, sin sustituir, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, sin sustituir, especialmente un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, sin sustituir, tal como metilo o etilo. De forma ventajosa, R³ y R⁴ son ambos iguales, por ejemplo, ambos metilo o ambos etilo, especialmente ambos metilo.

Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia), (Ib) o (Ic), donde m se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6, especialmente 2, 3, 4 o 5. En una realización adicional del primer aspecto de la invención, m es 3 o 4.

Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Ia), (Ib) o (Ic), donde Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵ y R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄, tal como un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₂ insaturado que tiene uno, dos o tres dobles enlaces, especialmente un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ de cadena lineal, insaturado, que tiene un doble enlace, especialmente un doble enlace *cis*. Opcionalmente R⁵ es -(CH₂)₅₋₁₀CH=CH(CH₂)₅₋₉CH₃, especialmente -(CH₂)₆₋₉CH=CH(CH₂)₆₋₈CH₃, tal como -(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ o -(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃. Preferiblemente, el doble enlace es *cis* y R⁵ es -(CH₂)₅₋₁₀CH[Z]=CH(CH₂)₅₋₉CH₃, especialmente -(CH₂)₆₋₉CH[Z]=CH(CH₂)₆₋₈CH₃, tal como -(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ o -(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃. Preferiblemente, Q se selecciona entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃.

Para evitar dudas, cualquiera de los elementos opcionales de los lípidos del primer aspecto de la invención puede combinarse en realizaciones adicionales del primer aspecto de la invención. Por ejemplo, en una realización del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ia) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂; Sp y W son ambos enlaces; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, sin sustituir; cada B se selecciona entre un grupo alqueno C₁₋₃ sin sustituir; y m es 3, 4, 5, 6 o 7. De forma similar, en una realización del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ib) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, sin sustituir; cada B se selecciona entre un grupo alqueno C₁₋₃ sin sustituir; y m es 3, 4, 5, 6 o 7. Nuevamente de forma similar, en una realización del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ic) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, sin sustituir; y m es 3, 4, 5, 6 o 7. En una realización adicional del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ia) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ que tiene uno o dos o tres dobles enlaces; Sp y W son ambos enlaces; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, sin sustituir; cada B se selecciona entre un grupo alqueno C₁₋₃ sin sustituir; m es 3, 4, 5 o 6; y R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ insaturado, que tiene uno, dos o tres dobles enlaces. De forma similar, en una realización adicional del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ib) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ que tiene uno o dos o tres dobles enlaces; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, sin sustituir; cada B se selecciona entre un grupo alqueno C₁₋₃ sin sustituir; m es 3, 4, 5 o 6; y R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ insaturado, que tiene uno, dos o tres dobles enlaces. Nuevamente de forma similar, en una realización del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ic) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ que tiene uno o dos o tres dobles enlaces; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, sin sustituir; m es 3, 4, 5 o 6; y R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₀, por ejemplo, un grupo alqueno C₁₄₋₂₀ insaturado, que tiene uno, dos o tres dobles enlaces. En otra realización adicional del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ia) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace; Sp y W son ambos enlaces; R³ y R⁴ son cada uno metilo o etilo; cada B es un grupo etileno; m es 3, 4 o 5; y R⁵ es un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace. De forma similar, en otra realización adicional del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ib) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace; R³ y R⁴ son cada uno metilo o etilo; cada B es un grupo etileno; m es 3, 4 o 5; y R⁵ es un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace. Nuevamente de forma similar, en otra realización del primer aspecto de la invención, el compuesto iónico tiene la fórmula (Ic) donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace; R³ y R⁴ son cada uno metilo o etilo; m es 3, 4 o 5; y R⁵ es un grupo alqueno C₁₆ o C₁₈ insaturado que tiene un doble enlace.

El compuesto iónico del primer aspecto de la invención opcionalmente tiene la fórmula (Id):



en donde:

- cada uno de X-R¹ e Y-R² y Q se selecciona entre
-O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃;
y

- m es un número entero entre 2 y 5.

Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Id), donde m es 3 o 4.

Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Id), donde cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃. Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Id), donde cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃, Q se selecciona entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃, y m es 3 o 4.

Opcionalmente, el compuesto iónico del primer aspecto de la invención tiene la fórmula (Id), donde cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃, y Q es -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃. Opcionalmente, el lípido del primer aspecto de la invención comprende un catión de fórmula (Id), donde cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃, Q es -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃, y m es 3 o 4.

El compuesto iónico del primer aspecto de la invención incluye típicamente un contraión inorgánico, por ejemplo, un anión farmacéuticamente aceptable tal como cloruro o bromuro.

20 Complejos de transfección

En un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo de transfección no viral que comprende (i) un compuesto iónico del primer aspecto de la invención. El complejo de transfección del segundo aspecto de la invención opcionalmente comprende de forma adicional (ii) un componente de unión a ácido nucleico policatiónico y (iii) un componente de unión a receptor de superficie celular. Típicamente, el componente de unión a ácido nucleico policatiónico (ii), y el componente de unión a receptor de superficie celular (iii) forman juntos un derivado peptídico. De forma ventajosa, el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención comprende además (iv) un ácido nucleico.

El complejo de transfección no viral del segundo aspecto de la invención es, por ejemplo, un complejo LPD (o LID).

En un undécimo aspecto, la descripción proporciona un kit que comprende:

- (i) un ácido nucleico,
- (ii) un compuesto iónico de la invención como se ha definido anteriormente,
- (iii) un componente de unión a ácido nucleico policatiónico, y
- (iv) un componente de unión a receptor superficial.

Por ejemplo, la descripción proporciona un kit que comprende:

- (i) un compuesto iónico del primer aspecto de la invención ácido nucleico; un péptido que comprende (ii) un componente de unión a ácido nucleico policatiónico y (iii) un componente de unión a receptor de superficie celular; y, opcionalmente, (iv) un ácido nucleico.

El kit del undécimo aspecto de la descripción puede, por ejemplo, usarse para construir un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención.

- En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención mezclado o en conjunción con un vehículo farmacéuticamente adecuado.

Péptidos

En una realización, el derivado peptídico del segundo aspecto de la invención tiene la fórmula A-B-C, donde:

- A es un componente de unión a ácido nucleico policatiónico,
- B es un elemento espaciador, y

C es un componente de unión a receptor de superficie celular.

Se ha observado que los complejos de transfección del segundo aspecto de la invención que comprenden un péptido de elemento espaciador que es susceptible de división dentro de una célula son más eficiente para producir la transfección de una célula diana que los complejos de la técnica anterior que incluyen péptidos sin el espaciador que es susceptible de división dentro de una célula.

El componente de unión a ácido policationico A es cualquier polication que es capaz de unirse a ADN o ARN. Un polication puede ser policationico por sí mismo o puede presentar una serie de monómeros cationicos, siempre que se retenga la capacidad de unión a ADN o ARN. Por ejemplo, puede haber presentes entre 3 y 100 monómeros cationicos, por ejemplo, entre 10 y 20, por ejemplo entre 14 y 18, por ejemplo, aproximadamente 16.

El término “componente de unión a ácido nucleico policationico” es bien conocido en la técnica y se refiere a polímeros que tienen al menos 3 residuos repetidos de aminoácido cationico u de otra unidad cationica que porta grupos cargados positivamente, siendo capaces dichos polímeros de formar complejos con un ácido nucleico en condiciones fisiológicas. Un ejemplo de molécula policationica de unión a ácido nucleico es un oligopéptido que comprende uno o más aminoácidos cationicos. Dicho oligopéptido puede, por ejemplo, ser una molécula de oligo-lisina, una molécula de oligo-histidina, una molécula de oligo-arginina, una molécula de oligo-ornitina, una molécula de oligo-ácido diaminopropiónico, o una molécula de oligo-ácido diaminobutírico, o un oligómero combinado que comprende cualquier combinación de residuos de histidina, arginina, lisina, ornitina, ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico. Cualquiera de los anteriores oligopéptidos puede presentar, por ejemplo, un total den entre 3 y 35, por ejemplo, entre 5 y 25 residuos, preferiblemente entre 10 y 20 residuos, por ejemplo, entre 14 y 18 residuos, por ejemplo 16 residuos.

Es particularmente preferida una oligolisina, por ejemplo, que tiene entre 3 y 35, por ejemplo, entre 2 y 25, por ejemplo, entre 10 y 20 residuos de lisina, por ejemplo, entre 13 y 19, por ejemplo, entre 14 y 18, por ejemplo, entre 15 y 17 residuos, por ejemplo, 16 residuos, es decir $[K]_{16}$, denotando “K” lisina.

Otros ejemplos de componentes policationicos incluyen dendrímeros y polietilenimina. La polietilenimina (PEI) es un polímero cationico reticulado no tóxico con potencial para la administración de genes (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, 92, 7297-7301). La polietilenimina se puede obtener en Fluka (800 kDa) o en Sigma (50 kDa) o alternativamente pre-diluida para fines de transfección en PolyPlus-tranfection (Illkirch, Francia). Típicamente, la PEI presenta una eficiencia máxima cuando se usa en un exceso de 9 con respecto al ADN, calculándose la razón de exceso como nitrógeno de PEI: fosfato de ADN, y a pH entre 5 y 8. Dichos parámetros pueden optimizarse de un modo familiar para el especialista en la técnica.

El elemento espaciador péptido B de forma ventajosa es susceptible de división dentro de una célula. Un elemento espaciador péptido B que es susceptible de división dentro de una célula puede ser susceptible de división dentro del endosoma, el lisosoma y/o el citoplasma de una célula. En la presente memoria, “susceptible a división” pretende indicar que el elemento es susceptible de división en una escala temporal durante la cual los componentes A y C permanecen intactos. El elemento B se divide más rápidamente que lo que necesitan para tener efecto las rutas de degradación de péptido celulares.

Preferiblemente, el elemento espaciador péptido es susceptible de división enzimática, división reductiva o división dependiente del pH, p.ej., hidrólisis. En el caso de división enzimática, en un aspecto de la invención, los péptidos preferidos son aquellos que son susceptibles de división por una enzima seleccionada entre NOX (NADH-oxidasa), GILT (tiol reductasa lisosomal inducible por interferón gamma) y PDI (proteína disulfuro isomerasa). En otro aspecto de la invención, los péptidos preferidos son aquellos que son susceptibles de división por una enzima que está presente en el endosoma, por ejemplo, una proteasa endosomal, tal como furina o catepsina.

Preferiblemente, el elemento espaciador péptido B comprende un grupo seleccionado entre:

- a) una cadena de péptido que comprende un enlace disulfuro;
- b) una cadena de péptido que comprende un enlace éster;
- c) una secuencia de aminoácido susceptible de división por furina; y
- d) una secuencia de aminoácido susceptible de división por una enzima catepsina.

El enlace disulfuro preferiblemente es uno que es estable en condiciones atmosféricas y fisiológicas normales, pero que puede ser dividido reductivamente en un endosoma. De forma similar, un enlace de éster en una cadena de péptido de la invención preferiblemente es uno que es estable a pH neutro, pero que se divide en el entorno ácido de un endosoma (por ejemplo, a pH por debajo de 6,0, preferiblemente a pH por debajo de 5,5, o a pH por debajo de 5,0).

Por ejemplo, las secuencias de aminoácido susceptibles de división por furina incluyen secuencias seleccionadas entre

i) RX^1KR ; y

ii) RX^2RR ;

donde X^1 y X^2 , que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno cualquier residuo de aminoácido (Zimmer et al., *J Biol. Chem.*, 2001, 276, 31642-31650; Nakayama, *Biochem. J.*, 1997, 327, 625-635)

5 Los residuos de aminoácido X^1 preferidos incluyen Lys (K) y Val (V), por ejemplo, Lys (K). Los residuos de aminoácido X^2 preferidos incluyen Lys (K) y Val (V), por ejemplo, Val (V).

Por ejemplo, la enzima catepsina puede ser cualquier enzima catepsina adecuada (véase Pillay et al., *Biochem. J.*, 2002, 363, 417-429). Por ejemplo, puede ser catepsina B. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido susceptibles de división por catepsina B (véase Pechar et al., *Macromol. Chem. Phys.*, 1997, 198, 1009-1020) incluyen secuencias seleccionadas de:

10 iii) X^3X^4 donde X^3 se selecciona entre Tirosina (Tyr, Y), Fenilalanina (Phe, F), Leucina (Leu, L), Valina (Val, V) e Isoleucina (Ile, I) y X^4 se selecciona entre Glicina (Gly, G), Alanina (Ala, A) y Ácido glutámico (Glu, E).

Preferiblemente, X^3 se selecciona entre Tirosina (Tyr, Y), Fenilalanina (Phe, F) y Leucina (Leu, L).

15 Por ejemplo, la secuencia X^3X^4 puede estar presente como GFX^3X^4 , por ejemplo como GFLG (tal como se usa en Pechar et al., *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 131-139)

20 El elemento espaciador péptido B puede comprender adicionalmente un ligando, que preferiblemente es un péptido, es decir, comprende residuos de aminoácido, o un grupo polietilenglicol, o una mezcla de los dos. Los aminoácidos pueden ser naturales o no naturales. Pueden tener configuración L o D. El ligando puede presentar dos o más aminoácidos. Por ejemplo, puede comprender tres o más aminoácidos, por ejemplo, cuatro o más, por ejemplo, cinco o más, por ejemplo, hasta diez aminoácidos o más. Los aminoácidos pueden ser iguales o diferentes, pero el uso de múltiples residuos de lisina (o de otros aminoácidos catiónicos adecuados para uso en el componente de unión de ácido nucleico policatiónico de un complejo vector) generalmente debería evitarse en el espaciador, ya que las secuencias de oligo-lisina tienen actividad como componente de unión a ácido nucleico policatiónico.

El ligando puede ser, por ejemplo, el dipéptido glicina-glicina (GG) o glicina-alanina (GA).

25 El ligando puede ser, o puede incluir un grupo funcional polietilenglicol. El resto polietilenglicol puede comprender entre 1 y 30 unidades de etilenglicol, preferiblemente entre 1 y 15 unidades, más preferiblemente entre 1 y 8 unidades, por ejemplo entre 2 y 6 unidades, por ejemplo 4 unidades.

Preferiblemente, el ligando está al final del elemento espaciador péptido B que está enlazado al componente de unión a ácido nucleico policatiónico A.

30 Preferiblemente, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido. Cuando el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido, el péptido puede tener hasta 20 aminoácidos de longitud, o puede ser más largo. El péptido generalmente tiene al menos 5 aminoácidos, pero puede tener menos. Generalmente, el péptido tiene cualquier número de aminoácidos entre 6 y 20, inclusive. Generalmente, se prefiere que el péptido tenga 15 aminoácidos o menos, más preferiblemente 12 aminoácidos o menos, lo más preferiblemente 10 aminoácidos o menos. Generalmente, se prefiere que el péptido tenga 5 o más aminoácidos, por ejemplo, 6 o más aminoácidos. Lo más preferiblemente, el péptido tiene 7 aminoácidos.

35 Preferiblemente, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprender un péptido que comprende una región cíclica. Los péptidos cíclicos se pueden formar mediante la provisión de al menos dos residuos de cisteína en el péptido, posibilitando de este modo la formación de un enlace disulfuro. Por consiguiente, los componentes C de unión a receptor de superficie celular preferidos constan o consisten en un péptido que tiene dos o más residuos de cisteína que son capaces de formar uno o más enlaces de disulfuro. Preferiblemente, los residuos de cisteína flanquean a la porción de unión a receptor primaria.

40 En una realización de la invención, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido de unión a integrina. Un péptido de unión a integrina es cualquier péptido que es capaz de unirse específicamente a las integrinas presentes en la superficie de las células. El péptido de unión a integrina puede ser un ligando de unión a integrina natural, por ejemplo, una proteína de matriz extracelular, una proteína de cápsida viral, la proteína invasina bacteriana, una proteína desintegrina de veneno de serpiente, o un fragmento de unión a integrina de cualquiera de dichas proteínas. Dichas proteínas de unión a integrina, y los fragmentos de las mismas, pueden obtenerse de fuentes naturales o mediante técnicas recombinantes. Es preferible usar péptidos de unión a integrina, en particular debido a su facilidad de síntesis, purificación y almacenamiento, a su potencial para modificación química, y a su inmunogenicidad *in vivo* potencialmente baja. Los péptidos de unión a integrina preferidos son aquellos descritos en el documento WO 96/15811, y especialmente en el WO 98/54347. Por ejemplo, un péptido de unión a integrina puede ser específico para integrinas $\alpha 4\beta 1$.

En esta realización, el componente C de unión a receptor de superficie celular preferiblemente comprende un péptido seleccionado entre:

- 5 a) RGD;
b) RRETAWA;
c) LDV

En una realización adicional de la invención, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido que es capaz de unirse a células epiteliales de las vías respiratorias humanas (HAE). Los péptidos de unión a célula HAE preferidos son aquellos como los descritos en el documento de patente WO 02/072616. En esta realización, el componente C de unión a receptor de superficie celular preferiblemente comprende un péptido seleccionado entre:

- 10 a) X⁵SM;
b) LX⁶HK;
c) PSGX⁷ARA;
d) SX⁸RSMNF; y
e) LX⁹HKSMP;

15 en el que X⁵ es un residuo de aminoácido básico, X⁶ es Q o P, X⁷ es A o T, X⁸ es un residuo de aminoácido ácido y X⁹ es P o Q.

Preferiblemente, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido seleccionado entre:

- a) X⁵SM;
b) LX⁶HK; y
20 c) PSGAARA,

en el que X⁵ es un residuo de aminoácido básico y X⁶ es Q o P.

Preferiblemente X⁵ es K o R. Preferiblemente X⁶ es P. Preferiblemente X⁷ es A. Preferiblemente X⁸ es E o Q. Más preferiblemente X⁸ es E. Preferiblemente X⁹ es P. Por consiguiente, los péptidos preferidos son aquellos que comprenden una secuencia seleccionada entre LQHKSMMP, LPHKSMMP, VKSMVTH, SERSMNF, VGLPHKF, YGLPHKF, PSGAARA, SQRSMNF y PSGTARA.

25

En otra realización de la invención, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido que es capaz de unirse a células dendríticas humanas. Los péptidos de unión a célula dendrítica humana preferidos son aquellos como los descritos en el documento de patente WO 2004/108938. Por ejemplo, dicho péptido puede seleccionarse entre un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- 30 a) PX¹⁰X¹¹X¹²T;
b) PSX¹³S;
c) QX¹⁴X¹⁵X¹⁶Q;
d) SX¹⁷S,

en la que X¹⁰, X¹¹ y X¹², que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno un residuo de aminoácido;

35 X¹³ representa un residuo de aminoácido;

X¹⁴ y X¹⁶, que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno un residuo de aminoácido, y X¹⁵ representa un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral de amida, por ejemplo, N o Q.

X¹⁷ representa un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral alifática, por ejemplo, L o I.

40 En una realización preferida, el componente C de unión a receptor de superficie celular comprende un péptido seleccionado entre:

- a) CRGDCLG;
b) CRGDCLG;

- c) ACDCRGDCFCG;
- d) CRGDMFGCA;
- e) CRRETAWACG;
- f) CRGEMFGCA;
- 5 g) CSERSMNFCG;
- h) CYGLPHKFCG; y
- i) CLPHKSMPCG.

La invención proporciona el uso de un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención en la formación de un vector de transfección lipopolyplex (LPD). El vector de transfección puede usarse para dirigir una entidad a una célula, siendo la entidad un ácido nucleico u otra molécula, por ejemplo, una molécula terapéutica o farmacéuticamente activa, o una molécula que comprende una marca detectable.

Usos médicos

Se ha descubierto además que un compuesto iónico de la invención mejora la acción dirigida de un complejo vector a células tumorales, particularmente cuando se usa en conjunción con un péptido divisible. El compuesto iónico de la primera invención tiene utilidad por tanto en el tratamiento de cáncer, la inmunización terapéutica o profiláctica, o la terapia anti-sentido o de ARNi. La descripción proporciona por tanto un método de tratamiento de cáncer, de inmunización terapéutica o profiláctica, o de terapia anti-sentido o de ARNi que comprende administrar un compuesto iónico del primer aspecto de la invención en un complejo adecuado al paciente en una cantidad efectiva. Los complejos de transfección del segundo aspecto de la invención tienen utilidad en el tratamiento de cánceres, para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi. La descripción proporciona por tanto un método para el tratamiento de cáncer, la inmunización terapéutica o profiláctica, o la terapia anti-sentido o de ARNi que comprende administrar un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención al paciente en una cantidad efectiva. El compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención pueden administrarse en una composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención, que comprende el compuesto iónico o el complejo de transfección mezclados o en conjunción con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un compuesto iónico del primer aspecto de la invención o un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso en terapia. La invención proporciona además un compuesto iónico del primer aspecto de la invención o un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso como medicamento o como vacuna. Por ejemplo, el cuarto aspecto de la invención proporciona un compuesto iónico del primer aspecto de la invención o un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de la afección producida por un defecto y/o una deficiencia en un gen, para uso en el tratamiento de cáncer, para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi.

El componente de ácido nucleico (D) puede ser cualquier ácido nucleico adecuado. Puede ser ADN o ARN o un mimético de ácido nucleico modificado químicamente, por ejemplo una molécula PNA. Por ejemplo, puede codificar para una proteína que presenta utilidad en la célula diana. Puede ser un ácido nucleico anti-sentido o un ácido nucleico de ARNi. El ARNi se consigue exponiendo las moléculas de ARN mensajero celular (ARNm) producidas por el gen diana a moléculas de ARN de cadena doble (ARNds) que contienen secuencias complementarias a una porción corta de la molécula de ARNm. Dentro de la célula, las moléculas de ARN de cadena doble se dividen para producir fragmentos de cadena doble e individual cortos (21-23 nucleótidos de longitud), que pueden unirse a las moléculas de ARNm diana. Dicha unión conduce a la división del ARNm diana por nucleasas, dando como resultado de este modo una reducción de los niveles de expresión del gen diana. Por tanto, el propio componente de ácido nucleico puede ser un ARNi (un "ARNsi"); alternativamente, el ácido nucleico administrado puede ser una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando se transcribe, produce una molécula de ARNi, es decir, un ARN que es capaz de suprimir la expresión de un gen diana a través de interferencia de ARN.

La descripción también proporciona procesos para la producción de un complejo de transfección de la invención.

En un quinto aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección producida en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, que comprende administrar el compuesto iónico del primer aspecto de la invención o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención al humano o al animal no humano.

El término "un defecto y/o una deficiencia en un gen" tal como se usa en la presente memoria denota no solo un defecto o deficiencia en la región codificadora de un gen, sino un defecto o deficiencia en un elemento de control para

el gen, por ejemplo, un elemento de control en *trans* o en *cis*, o un defecto o deficiencia en cualquier otro elemento que esté implicado en la transcripción o la traducción del gen, tanto directa como indirectamente.

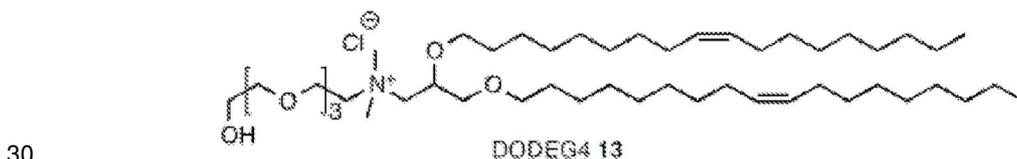
En un sexto aspecto, la descripción proporciona un método para la inmunización terapéutica o profiláctica de un humano o un animal no humano, que comprende administrar el compuesto iónico del primer aspecto de la invención junto con, o el complejo de transfección del segundo aspecto de la invención que comprende, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo ARN anti-sentido) o un ácido nucleico adecuado para terapia de ARNi al humano o al animal no humano. La descripción también proporciona un método de terapia anti-sentido, que comprende administrar el compuesto iónico del primer aspecto de la invención junto con un ácido nucleico, o un complejo de transfección del segundo aspecto de la invención que comprende ácido nucleico, a un humano o un animal no humano en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico (por ejemplo ARN) adecuado para uso en terapia anti-sentido o un ácido nucleico adecuado para terapia de ARNi.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los disolventes y los reactivos para las síntesis fueron de grado reactivo y de proveedores comerciales, y se usaron sin purificación adicional. El CH_2Cl_2 seco se obtuvo usando columnas de alúmina anhidra con el procedimiento descrito en Pangbom, A. B.; Giardello, M. A.; Grubbs, R. H.; Rosen, R. K.; Timmers, F. J. *Organometallics* 1996, 15, 1518-1520. Todas las reacciones sensibles a la humedad fueron llevadas a cabo en atmósfera de nitrógeno o en atmósfera de argón usando material de vidrio secado en estufa. Las reacciones se monitorizaron mediante TLC en placas Kieselgel 60 F_{254} con detección mediante UV, permanganato potásico y tinciones de ácido fosfomolibdico. Se llevó a cabo una cromatografía flash en columna usando gel de sílice (tamaño de partícula 40-63 μm). Los espectros de RMN de ^1H y de RMN de ^{13}C se registraron en equipos Bruker AMX300 MHz, Avance-500 MHz y Avance-600 MHz. Las constantes de acoplamiento se midieron en hercios (Hz) y, a menos que se indique lo contrario, los espectros se adquirieron a 298 K. Los espectros de masas se registraron en espectrómetros de masas Thermo Finnegan MAT 900XP, Micromass Quattro LC electrospray y VG70-SE. Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Shimadzu FTIR-8700.

DODEG4 (13)

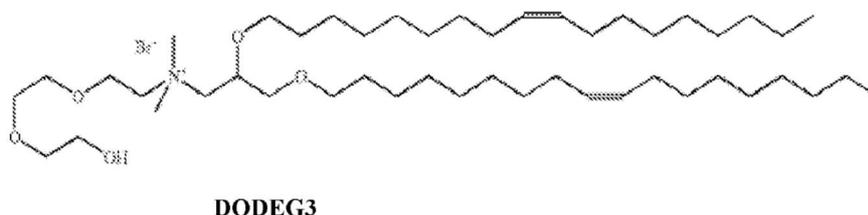
Cloruro de {2,3-di[(Z)-octadeci-9-eniloxi]-propil}-N-{2-[2-(2-{2-hidroxi-etoxi}-etoxi)-etil]-N,N-dimetil-amonio (DODEG4) (13) (CH300), se sintetizó como se ha publicado previamente, por Dori, Y.; Bianco-Peled, H.; Satija, S.; Fields, G. B.; McCarthy, J. B.; Tirrell, M. *J Biomed Mater. Res.* 2000, 50, 75-81, a partir de (2,3-bis-octadec-9-eniloxipropil)-dimetilamina y bromuro 4-EG ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Br}$).



DODEG4 (13) (CH300) también puede sintetizarse como se describe en el documento US 7.598.421, Ejemplo 4.

Análogos de DODEG4

Se pueden preparar sales similares a DODEG4 (13) (CH300) con grupos hidrocarbilo R^1 y R^2 de diferentes longitudes de cadena y con diferentes valores de m , es decir diferentes longitudes de cadena de polietilen glicol, como se describe en el documento US 7.598.421 (ver los Ejemplos 3, 5, 6 y 7 en particular). Por ejemplo, DODEG3 se puede sintetizar mediante el protocolo del Ejemplo 3 de US 7.598.421.



DOesDEG4 (15)

El análogo de diéster DOesDEG4 (15) se preparó de forma similar a DODEG4 (13) mediante cuaternización de (2,3-bis-heptadec-9-enilcarboxipropil)-dimetilamina con bromuro 4-EG.

Amina terciaria (16)

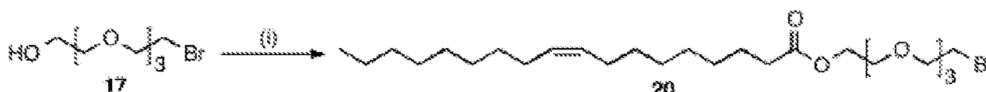
2,3-di-((9Z)-octadecenilo)propil-*N,N*-dimetilamina (16) se prepara como se describe en Hurley, C. A.; Wong, J. B.; Hailes, H. C.; Tabor, A. B. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 980-983 a partir de mesilato de octadec-9-enilo y 3-dimetilamino-1,2-propanodiol.

Bromuro 4-EG (17)

- 5 11-Bromo-3,6,9-trioxoundecan-1-ol (17) se preparó como se describe en Hurley, C. A.; Wong, J. B.; Ho, J.; Writer, M.; Irvine, S. A.; Lawrence, M. J.; Hart, S. L.; Tabor, A. B.; Hailes, H. C. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 2554-2559.

4-EG éster de oleoilo (20)

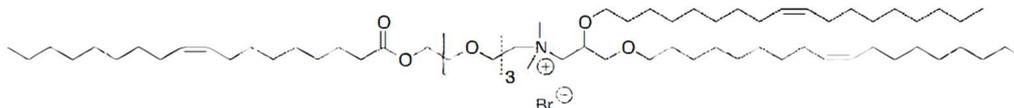
4-EG éster de oleoilo (20) se preparó mediante la reacción de bromuro 4-EG (17) con ácido oleico, en presencia de DMAP y DIC en CH₂Cl₂.



- 10 Una disolución de ácido oleico (2,00 mL, 6,30 mmol), el bromuro 4-EG 17 (1,50 g, 5,83 mmol), y DMAP (70 mg, 0,58 mmol) en diclorometano anhidro (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de enfriar a 0 °C, se añadió gota a gota *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (1,20 mL, 7,75 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El diclorometano se eliminó a vacío, se añadió acetato de etilo (60 mL), y la mezcla se lavó con hidrogenocarbonato sódico (2 x 60 mL), salmuera (60 mL), se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío. Una purificación mediante cromatografía flash de sílice (EtOAc/hexano, 1:4) dio lugar a 20 en forma aceite amarillo (1,65 g, 54%). *R_F* 0,19 (EtOAc/hexano, 1:4); *v_{max}* (crudo)/cm⁻¹ 2923, 1736, 1457; RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 0,84 (t, J = 6,7 Hz, 3H), 1,18-1,30 (m, 20H), 1,58 (m, 2H), 1,93-2,00 (m, 4H), 2,29 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,43 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,59-3,67 (m, 10H), 3,77 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 4,19 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 5,27-5,36 (m, 2H); RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 14,1, 22,6, 24,9, 27,2, 29,1-29,8 (señales superpuestas), 30,4, 31,9, 34,0, 63,3, 69,2, 70,4-70,6 (señales superpuestas), 71,2, 129,7, 130,0, 173,6; *m/z* [HRMS ES⁺] experimental [MNa]⁺ 543,2671. C₂₆H₄₉O₅⁷⁹BrNa requiere 543,2661.
- 15
- 20

TC-DODEG4 (14)

- 25 El compuesto iónico TriCadena bromuro de (9Z)-*N*-(2,3-bis((9Z)-octadecenilo)propil)-*N,N*-dimetil-13-oxo-3,6,9,12-tetraoxatriacont-21-en-1-aminio (TC-DODEG4) (14) se sintetizó mediante cuaternización de (2,3-bis-octadec-9-eniloxipropil)-dimetilamina (16) con el 4-EG éster de oleoilo (20).



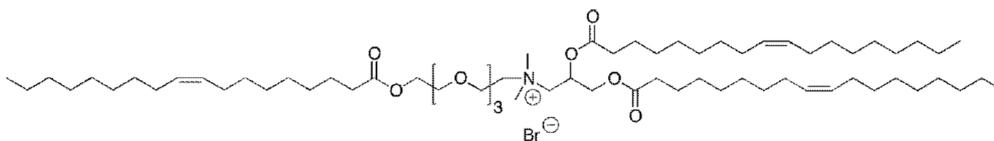
- 30 Se agitó una disolución de la amina (16) (0,260 g, 0,420 mmol) y el 4-EG éster de oleoilo (20) (0,240 g, 0,460 mmol) en acetona (2 mL) en un tubo sellado a 90 °C durante 48 h. La acetona se eliminó a vacío. La purificación mediante cromatografía flash de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 19:1) dio lugar a TC-DODEG4 (14) en forma de aceite amarillo claro (171 mg, 36%). *R_F* 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); *v_{max}* (crudo)/cm⁻¹ 2950, 2859, 1740, 1464; RMN de ¹H (600 MHz; CDCl₃) δ 0,83 (t, J = 7,0 Hz, 9H), 1,13-1,22 (m, 64H), 1,51 (m, 4H), 1,57 (m, 2H), 1,92-1,97 (m, 12H), 2,29 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 3,38-3,51 (m, 14H), 3,51 (m, 6H), 3,58 (m, 4H), 3,92-4,05 (m, 4H), 4,08 (m, 1H), 4,18 (m, 2H), 5,27 (m, 6H); RMN de ¹³C (150 MHz; CDCl₃) δ 14,2, 22,8, 25,0, 26,1, 26,3, 27,26, 27,30, 29,0, 29,1-29,9 (señales superpuestas), 30,1, 32,1, 32,7, 34,2, 53,3, 53,4, 63,3, 65,0, 65,2, 66,8, 68,6, 69,29, 69,32, 70,3, 70,4, 70,5, 70,6, 72,1, 73,5, 127,9-130,5 (señales superpuestas), 173,9; *m/z* [HRMS ES⁺] experimental [M-Br]⁺ 1060,9904. C₆₇H₁₃₀NO₇ requiere 1060,9847; *m/z* (+ES) 1061 ([M-Br]⁺, 100%), 980 (60), 931 (70), 843 (65), 306 (63).
- 35

Amina terciaria (18)

- 40 Se preparó dioleato de (9Z)-3-(dimetilamino)propano-1,2-diilo (18) como se describe en Narang, AS.; Thoma, L.; Miller, D. D.; Mahato, R. I. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 156-168.

TC-DOesDEG4 (19)

El compuesto iónico TriCadena bromuro de (9Z)-*N,N*-dimetil-*N*-(3-(oleoiloxi)-2-((9Z)-2-oxooctadecenilo)propil)-13-oxo-3,6,9,12-tetraoxatriacont-21-en-1-aminio (TC-DOesDEG4) (19) se sintetizó mediante cuaternización de (2,3-bis-heptadec-9-enilcarboxipropil)-dimetilamina (18) con el 4-EG éster de oleoilo (20).



Se agitó una disolución de la amina **18** (0,610 g, 0,941 mmol) y el 4-EG éster de oleoilo **20** (0,640 g, 1,22 mmol) en acetona (2 mL) en un tubo sellado a 80 °C durante 48 h. La acetona se eliminó a vacío. La purificación mediante

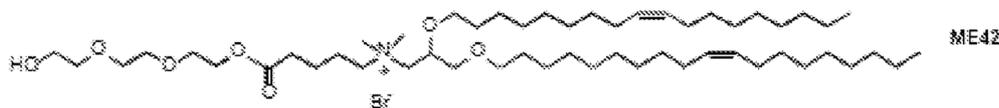
- 5 *R_F* 0,24 (CH₂Cl₂/MeOH, 19:1); *v*_{max} (crudo)/cm⁻¹ 2924, 2854, 1740, 1465; RMN de ¹H (500 MHz; CDCl₃) δ 0,86 (t, J = 6,8 Hz, 9H), 1,25-1,32 (m, 60H), 1,58 (m, 6H), 1,99 (m, 12H), 2,30 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 2,34 (m, 2H), 3,44 (s, 3H), 3,51 (s, 3H), 3,64-3,68 (m, 11H), 3,82 (dd, J = 13,5 y 10,0 Hz, 1H), 3,94 (m, 2H), 4,05 (m, 2H), 4,13 (m, 1H), 4,20 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,35 (d, J = 13,5 Hz, 1H), 4,48 (dd, J = 12,3 y 3,3 Hz, 1H), 5,28-5,35 (m, 6H), 5,64 (m, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz; CDCl₃) δ 14,2, 22,7, 24,7, 24,8, 25,0, 25,7, 27,2, 27,3, 29,1-29,8, 31,6, 32,0, 34,0, 34,3, 52,8, 52,9, 63,2, 63,3, 64,0, 64,9, 65,6, 65,8, 69,3, 70,1, 70,45, 70,48, 70,6, 129,7-130,1 (señales superpuestas), 172,9, 173,2, 173,8; *m/z* [HRMS ES⁺] experimental [M-Br]⁺ 1088,9382. C₆₇H₁₂₆NO₉ requiere 1088,9433; *m/z* (+ES) 1089 ([M-Br]⁺, 100%).

Análogos de TC-DOesDEG4

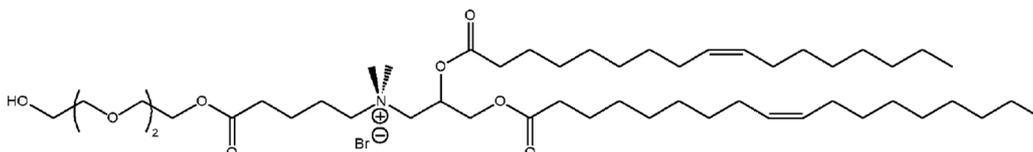
- 15 Los lípidos tri-cadena TC-DODEG3 y TC-DOesDEG3, en los que *m* = 2 pueden sintetizarse de forma similar mediante cuaternización de (2,3-bis-octadec-9-eniloxipropil)-dimetilamina (16) y (2,3-bis-heptadec-9-enilcarboxipropil)-dimetilamina (18) respectivamente con el 3-EG éster de oleoilo.

Lípido ME42 (comparativo)

Se preparó bromuro de (2,3-bis-octadec-9-eniloxipropil)-(8-hidroxi-3,6-dioxooctiloxicarbonilbutil)-dimetilamonio (ME42) como se describe en el documento WO 2007/138324 (ver páginas 41 y 42).



- 20 Lípido FMM32 (comparativo)



Lípido DHDTMA (106a) (comparativo)

- 25 El DHDTMA es un lípido catiónico basado en una cadena principal de glicerol con dos cadenas alquílicas C16 insaturadas ligadas mediante enlaces de diéter, descrito en Writer M, Hurley CA, Sarkar S, Copeman DM, Wong JB, et al. *Analysis and optimization of the cationic lipid component of a lipid/peptide vector formulation for enhanced transfection in vitro and in vivo*. J Liposome Res. 2006; 16: 373-389.

Síntesis de péptidos

Los péptidos descritos (Tabla IA) se sintetizaron usando instrumentos y técnicas estándar.

Tabla IA. Secuencia de péptidos

Péptido	Secuencia
K16	KKKKKKKKKKKKKKKK
ME27	(K) ₁₆ RVRRGACRGDCLG
K16CY	(K) ₁₆ RVRRGACYGLPHKFCG
K16Y	(K) ₁₆ GACYGLPHKFCG
K16P	(K) ₁₆ GACLPKSMPCG

Tabla IB. Masa de péptidos

Péptido	Masa (g·mol ⁻¹)
K16	2068
ME27	3467,5
K16CY	3871
K16Y	3326,8
K16P	3148,1

ME27 se sintetizó en un sintetizador de péptidos automatizado SYRO.

5 *Secuencias de péptido lineales:* El péptido se sintetizó en una escala de 20 μ mol usando jeringas de 2 mL con fritas de Teflon y un volumen de acoplamiento de 500 μ L. Se usó resina NovaSyn TGT precargada Fmoc-Gly o resina Fmoc-Gly-2-Cl-Trt para estas secuencias. Fmoc-Peg4-COOH se sintetizó siguiendo un procedimiento publicado previamente (ver la síntesis de Fmoc-Haa4-COOH en la página 82 del documento WO 2005/117985 - Fmoc-Haa4-COOH fue el nombre dado a Fmoc-Peg4-COOH en dicha especificación). La resina TGT fue hinchada inicialmente durante 10 minutos, sin embargo la resina 2-Cl-Trt necesitó de un tiempo de hinchamiento inicial prolongado (algunas horas) en DMF. Se llevó a cabo un acoplamiento de rutina con HBTU (en DMF) y DIPEA (en NMP) usando un exceso de cuatro veces de los reactivos. El Fmoc se dividió con una disolución al 40% de piperidina en DMF durante 3 minutos y una disolución al 20% durante 10 minutos. Los ciclos de síntesis consistieron en un tiempo de acoplamiento de 40 minutos, 3 minutos para la desprotección de Fmoc con piperidina al 40%, otros 10 minutos para desprotección de Fmoc con piperidina al 20% y etapas de lavado. Después de la síntesis y el último ciclo de lavado con DMF, los péptidos fueron lavados con DCM, metanol y dietil éter (3 veces con cada uno) usando la función "manual"/"empty" del Syro. Se aplicó succión durante algún tiempo para ayudar a evaporar el éter.

20 *Formación de enlace de disulfuro en la resina:* para formar puentes de disulfuro en la resina, la resina se colocó en una jeringa con frita de PE y se hinchó en DMF. Tras eliminar el exceso de DMF, se añadió una disolución recién preparada de yodo en una cantidad mínima de DMF (p.ej., 500 μ L para una jeringa de 2 mL, 10 equivalentes de yodo para carga de resina) y la jeringa se sometió a vórtice durante 4 h, 20 s cada 4 minutos. La disolución de reactivo se eliminó y la resina se lavó de 10 a 20 veces con DMF, y 3 veces cada vez con DCM, metanol y éter.

25 *División y desprotección:* las jeringas fueron transferidas a la campana extractora para la división. La división se llevó a cabo con un cóctel de TFA al 95%, TIS al 2,5% y H₂O al 2,5%. Se añadió una cantidad mínima de cóctel preparado para cubrir la resina (p.ej., < 500 μ L en las jeringas de 2 mL). Después de 4 h, las disoluciones de división fueron pasadas a tubos de polipropileno (PP) usando un pistón y las resinas fueron lavadas con otra pequeña cantidad de cóctel de división (p.ej., 200 μ L en las jeringas de 2 mL). A continuación, los péptidos fueron precipitados con éter (p.ej., a las fracciones combinadas de las jeringas de 2 mL se añadieron unos 4 mL de dietil éter). Los tubos de PP fueron mantenidos en el congelador durante al menos 15 minutos, a continuación se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos y la disolución se decantó del pellet de péptido. La centrifugación y la decantación se repitieron dos veces con aproximadamente 2 mL de éter. Finalmente, los péptidos fueron disueltos en agua o tBuOH/agua (4:1) y se secaron por congelación. Algunas secuencias de péptido mostraron una muy baja solubilidad y a veces fueron necesarios varios procesos de liofilización / disolución con diferentes mezclas de disolventes (agua, tBuOH o acetonitrilo) para obtener un péptido esponjoso.

35 El péptido se analizó mediante HPLC de fase inversa y se purificó mediante HPLC de fase inversa hasta una pureza >90%. Se registraron los espectros de masas usando el Micromass Quattro ES-MS (Software: Masslynx) y las masas se registraron en la tabla IB.

K16CY, K16Y y K16P fueron comprados a AMS Bio Ltd., Birmingham, R.U., y se sintetizaron usando química de síntesis de péptidos semi-automatizada. El péptido se analizó mediante HPLC de fase inversa y se purificó cuando fue necesario mediante HPLC de fase inversa hasta una pureza del 85%. Las masas moleculares relativas se proporcionan en la tabla IB.

40 K16 se adquirió como se ha descrito previamente (Hart et al., Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector. *Hum Gene Ther.*, 1998, 9, 575-585). Las masas moleculares relativas se proporcionan en la tabla IB.

Todos estos péptidos secados por descongelación se diluyeron a 10 mg/mL en agua y se almacenaron a -20°C durante varios meses. Una vez descongelados, las alícuotas de péptidos se mantienen a 4°C durante varias semanas.

ADN plásmido

El plásmido pCI-Luc (5,7 kb) consiste en pCI (Promega, Southampton, R.U.) que contiene el gen de luciferasa dirigido por el citomegalovirus (CMV) promotor-potenciador inmediato/temprano. Los plásmidos se crecieron en *Escherichia coli* DH5a y se purificaron, tras lisis alcalina bacteriana, en columnas de resina (Qiagen Ltd., Crawley, R.U.). Se lavaron los pellets de ADN precipitados en isopropanol con etanol al 70%, y a continuación se disolvieron en agua a 1 mg/mL.

Transfección *in vitro*

Las células evaluadas incluyeron células epiteliales de vías respiratorias humanas 1HAEo-, fibroblastos de ratón NIH3T3, y células de neuroblastoma de ratón Neuro2A. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a aproximadamente 2×10^4 células por pocillo, a continuación se incubaron durante una noche a 37°C en medio de crecimiento completo. Al siguiente día, se prepararon las formulaciones lipopolyplex (LPD) esencialmente como se ha descrito previamente (Hart et al., 1998), mezclando los componentes en el siguiente orden: 50 µL de lípido (L) a 80 µg/mL en OptiMEM, 70 µL de péptido (P) a 110 µg/mL en OptiMEM y 50 µL de plásmido pCI-Luc (D) a 40 µg/mL en OptiMEM correspondiente a una razón en masa de 2:4:1, respectivamente. Todos los complejos fueron mezclados pipeteando brevemente, se mantuvieron durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se diluyeron en OptiMEM hasta un volumen final de 1,57 mL. Se añadieron doscientos microlitros de complejos correspondientes a 0,25 µg de ADN plásmido a cada pocillo de cultivo después de eliminar el medio de crecimiento completo. Todas las transfecciones fueron llevadas a cabo en 6 pocillos cada una. Se pudo realizar una centrifugación (1500 rpm, durante 5 minutos) para promover la sedimentación del complejo y el contacto celular. Las células fueron incubadas con los complejos durante 4 h a 37°C antes de reemplazar con medio fresco durante 24 h, tras lo cual se analizó la expresión de gen indicador mediante un ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

A menos que se especifique lo contrario, los liposomas catiónicos que comprenden mezclas de dos compuestos iónicos, p.ej., FMM30 y DOPE, comprenden los compuestos iónicos en una proporción de 1:1.

Las células NIH3T3 y 1HAEo- fueron transfectadas con formulaciones LPD que contenían el péptido ME27 y el plásmido pCI-Luc y una de las formulaciones de lípido:

- CH300/DOPE en una razón molar de 1:1,
- FMM30/DOPE en una razón molar de 1:1,
- CH300/FMM30/DOPE en una razón molar de 4:1:5,
- CH300/FMM30/DOPE en una razón molar de 1:1:2,
- FMM32/DOPE en una razón molar de 1:1.

Como control positivo, se transfectó células con el reactivo de transfección comercial Lipofectamina 2000 (L2K adquirido en Life Technologies Inc.). Lípido total: las razones de lípido: péptido: ADN fueron 1:4:1, 2:4:1 o 4:4:1. Las formulaciones LPD se prepararon todas mezclando en el orden L:P:D como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 1 y en la Figura 2.

Las formulaciones LPD que contienen diferentes combinaciones de lípidos se prepararon para cuatro péptidos diferentes, ME27, K16CY, K16Y y K16P, y se usaron para transfectar células NIH3T3 con pCI-Luc como se ha descrito anteriormente. Los lípidos usados fueron:

- CH300/DOPE en una razón molar de 1:1,
- FMM30/DOPE en una razón molar de 1:1,
- CH300/FMM30/DOPE en una razón molar de 4:1:5,
- CH300/FMM30/DOPE en una razón molar de 1:1:2,
- FMM32/DOPE en una razón molar de 1:1,
- 106a (DHDTMA)/DOPE en una razón molar de 1:1, y
- DOTMA/DOPE en una razón molar de 1:1.

Los reactivos comerciales DOTAP, Lipofectina y Lipofectamina 2000 (L2K) también se compararon en la combinación LPD con péptidos y ADN. Todas las razones en peso L:P:D fueron 2:4:1 y todos los pocillos recibieron cada uno 0,25 µg de pCI-Luc. Los resultados se presentan en la Figura 3.

Las formulaciones LPD que contienen diferentes lípidos ME42/DOPE (ME42), CH300/DOPE (CH300) o FMM30/DOPE fueron preparadas con los péptidos de acción dirigida ME27 o K16Y y se usaron para transfectar células de

neuroblastoma de ratón Neuro-2A. Los resultados se muestran en la Figura 4. (las referencia N.b al péptido “Y” de la Figura 4 deberían referirse de forma más correcta a “K16Y”, ya que el péptido evaluado incluyó un resto de polilisina junto con la estructura de base GACYGLPHKFCG “Y”).

Ensayos de luciferasa y de proteína

- 5 Las células fueron lavadas una vez con PBS antes de la adición de 20 µL de tampón de lisis indicador 1X (Promega, Madison, WI, EE.UU.) a las células durante 20 minutos a 4°C antes de congelar a -80°C durante al menos 30 minutos, seguido de descongelación a temperatura ambiente. A continuación se midió la actividad de luciferasa durante 10 segundos usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y un lector de placas Optima Fluostar (BMG Labtech). La cantidad de proteína presente en cada lisato de transfección se determinó con un reactivo
- 10 ensayo de proteína Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 20 µL del ensayo de luciferasa a 180 µL del reactivo diluido 1 en 5 e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de comparar la DO590 con un rango de patrones de BSA. La actividad de luciferasa *in vitro* se expresó como Unidades de Luz Relativas (RLU) por miligramo de proteína (RLU/mg).

Imágenes de partículas

- 15 Las imágenes de Microscopio Electrónico de Transmisión de partículas LPD que comprenden FMM30 con el péptido ME27 en una razón en peso de 0,75:4:1 (L:P:D) se muestran en la Figura 5 (FMM30-PD-0,75) y los lípidos FMM30/DOPE en la misma razón en peso se muestran en la Figura 6 (FMM30/DOPE-PD 0,75).

- El tamaño de las nanopartículas LPD que contienen péptidos ME27 con lípidos FMM30 o FMM30/DOPE se determinó para diferentes razones en peso de liposoma a ADN (p/p) mediante dispersión de luz dinámica usando un NanoZS Zetasizer (Malvern). Los resultados se muestran en la Figura 7.
- 20

Resultados y discusión

Eficiencia de transfección *in vitro* de lípidos en células NIH3T3 y 1HAEO-

- La Figura 1 y la Figura 2 muestran que los niveles de transfección que usan las formulaciones LPD que contienen el compuesto iónico tri-cadena FMM30 eran mucho mayores que el lípido bi-cadena CH300 en ambas líneas celulares, NIH3T3 y 1HAEO-. Las formulaciones LPD que contienen mezclas de lípidos (CH300/FMM30/DOPE) en una
- 25 proporción elevada de FMM30 también funcionaron bien en comparación con las que contenían una pequeña proporción de FMM30. Las formulaciones que contienen FMM32/DOPE proporcionaron de forma similar niveles bajos de transfección a las formulaciones CH300/DOPE.

- La Figura 3 muestra que las formulaciones de cada péptido en una formulación LPD que contiene FMM30/DOPE produjeron los mayores niveles de transfección, y los niveles de transfección correspondientes a las formulaciones LPD que contienen FMM30/DOPE fueron mayores que los tres reactivos comerciales, así como el lípido C16 106a, previamente conocido como óptimo para la transfección.
- 30

Eficiencia de transfección *in vitro* de lípidos en líneas celulares Neuro 2A

- Resultados previos habían demostrado que ME27/ME42 era óptimo para células de neuroblastoma de ratón Neuro-2A. Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que los lípidos FMM30/DOPE eran entre igual de efectivos y ligeramente mejores en una razón de 1:4:1 (L:P:D). FMM30/DOPE nuevamente fue significativamente mejor que la combinación original de lípido CH300/DOPE en transfecciones LPD.
- 35

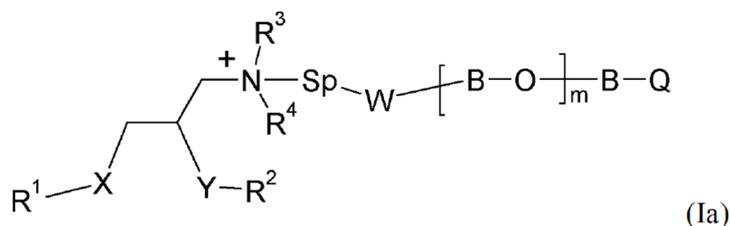
Imágenes de partículas LPD

- Ambas nanopartículas que comprende FMM30 con el péptido ME27 en una proporción másica de 0,75:4:1 (L:P:D) mostradas en la Figura 5, y los lípidos FMM30/DOPE en la misma proporción másica mostrados en la Figura 6, presentan tamaños bastante similares, con una combinación de formas que incluyen varillas y esferas.
- 40

Tal como se muestra en la Figura 7, las nanopartículas que contienen lípidos FMM30/DOPE fueron más pequeñas que las que contienen FMM30 (no DOPE) en todas las razones másicas excepto para 0,75:4:1, en la que ambas partículas presentaron su valor más pequeño de tamaño, en aproximadamente 80 nm.

REIVINDICACIONES

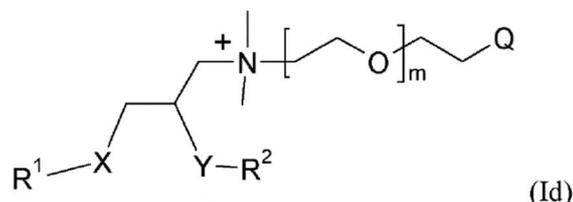
1. Un compuesto iónico de fórmula (Ia):



en donde:

- 5
- cada uno de X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan entre -O-, y -O-C(O)- donde el carbono del carbonilo está enlazado al grupo R¹ o R²;
 - R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, en donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
- 10
- R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre un grupo hidrocarbilo C₁₋₁₀ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR', -C(O)OH, -CN, -N(R')₂ y -C(O)R', en donde cada R' es igual o diferente y es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆;
 - Sp y W forman juntos un enlace; o
- 15
- Sp es un grupo alquileo C₁₋₈ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR', en donde R' es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆; y W se selecciona entre enlace, -O-C(O)-, -C(O)-O- y -O-;
 - cada B es igual o diferente y es un grupo alquileo C₁₋₆ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, -OR^A, -NR^AR^A y -OC(O)R^A;
- en donde cada R^A se selecciona de forma independiente entre hidrocarbilo C₁₋₄;
- 20
- m es un número entero de desde 1 a 8; y
 - Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵, en donde R⁵ se selecciona entre un grupo hidrocarbilo C₁₂₋₂₄ que está sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno y OR^A, en donde R^A es un grupo hidrocarbilo C₁₋₆.
- 25
2. El compuesto iónico reivindicado en la reivindicación 1, en donde R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂ que tiene uno o más dobles enlaces.
3. El compuesto iónico de cualquier reivindicación precedente, en donde tanto Sp como W son ambos enlaces, o Sp es un grupo alquileo C₁₋₈ no sustituido y W es enlace, -C(O)-O- o -O-.
4. El compuesto iónico de cualquier reivindicación precedente, en donde R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, no sustituido.
- 30
5. El compuesto iónico de cualquier reivindicación precedente, en donde cada B se selecciona entre un grupo alquileo C₁₋₃ no sustituido.
6. El compuesto iónico de cualquier reivindicación precedente, en donde m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
7. El compuesto iónico de la reivindicación 1, en donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es de forma independiente un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂ que tiene un doble enlace; Sp y W son ambos enlace; R³ y R⁴ son cada uno un grupo alquilo C₁₋₄ lineal o ramificado, no sustituido; cada B se selecciona entre un grupo alquileo C₁₋₃ no sustituido; m es 2, 3, 4, 5 o 6; y Q se selecciona entre -OR⁵ y -O-C(O)-R⁵ y R⁵ es un grupo hidrocarbilo C₁₄₋₂₂ que tiene un doble enlace.
- 35

8. El compuesto iónico de la reivindicación 1 que comprende un catión de la fórmula (Id):



en donde:

- 5
- cada uno de X-R¹ e Y-R² y Q se selecciona entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃; y
 - m es un número entero de desde 2 hasta 5.

9. El compuesto iónico de cualquier reivindicación precedente, en donde cada uno de X-R¹ e Y-R² son iguales y se seleccionan entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃; Q se selecciona entre -O-(CH₂)₈CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃ y -O-C(O)-(CH₂)₇CH[Z]=CH(CH₂)₇CH₃; y m es 3 o 4.

10 10. Un complejo de transfección no viral que comprende (i) un compuesto iónico como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un complejo de transfección no viral como el reivindicado en la reivindicación 10, que además comprende (ii) un componente de unión a ácido nucleico policatiónico, (iii) un componente de unión a receptor de superficie celular y, opcionalmente, (iv) un ácido nucleico.

15 12. Una composición farmacéutica que comprende un complejo de transfección como el reivindicado en la reivindicación 10 o la reivindicación 11, mezclado o en conjunción con un vehículo farmacéuticamente adecuado.

13. Un complejo de transfección como el reivindicado en la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso como medicamento, por ejemplo como vacuna.

20 14. Un complejo de transfección como el reivindicado en la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi, o para el tratamiento de un cáncer.

25 15. Uso de un complejo de transfección como el reivindicado en la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un humano o en un animal no humano por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia anti-sentido o de ARNi, o para el tratamiento de un cáncer.

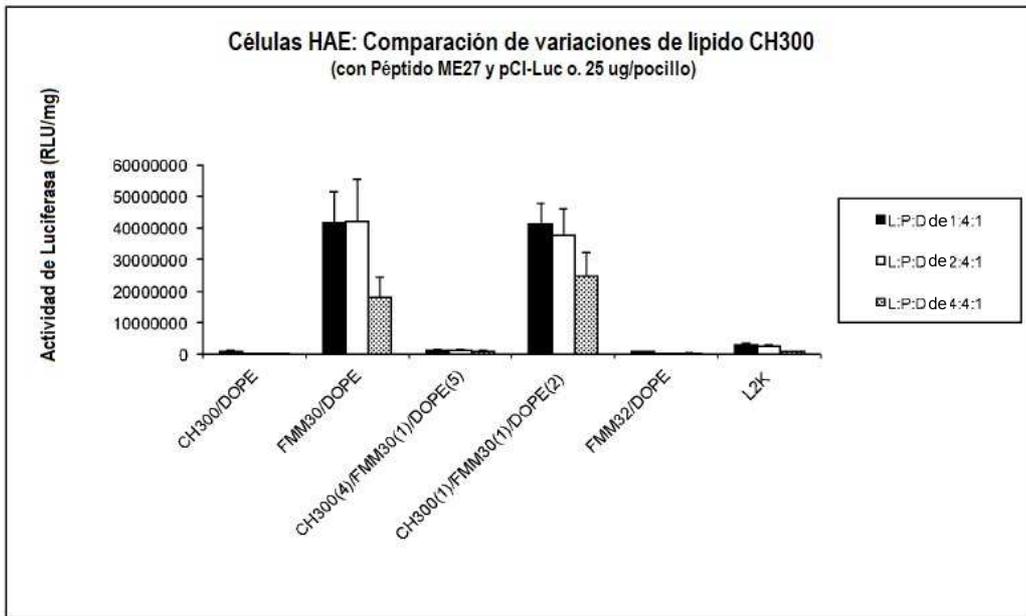


Fig. 1

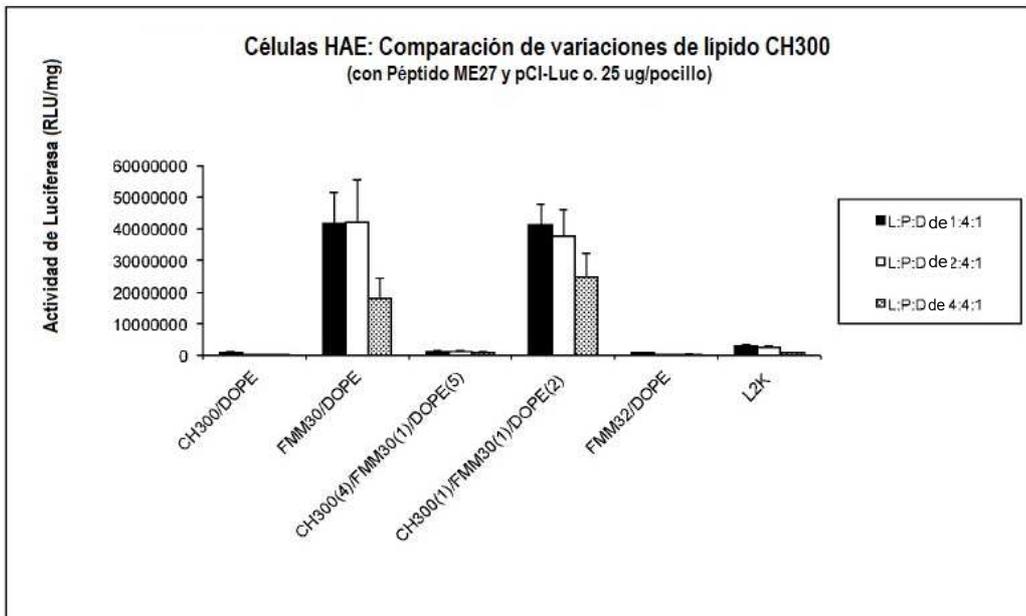


Fig. 2.

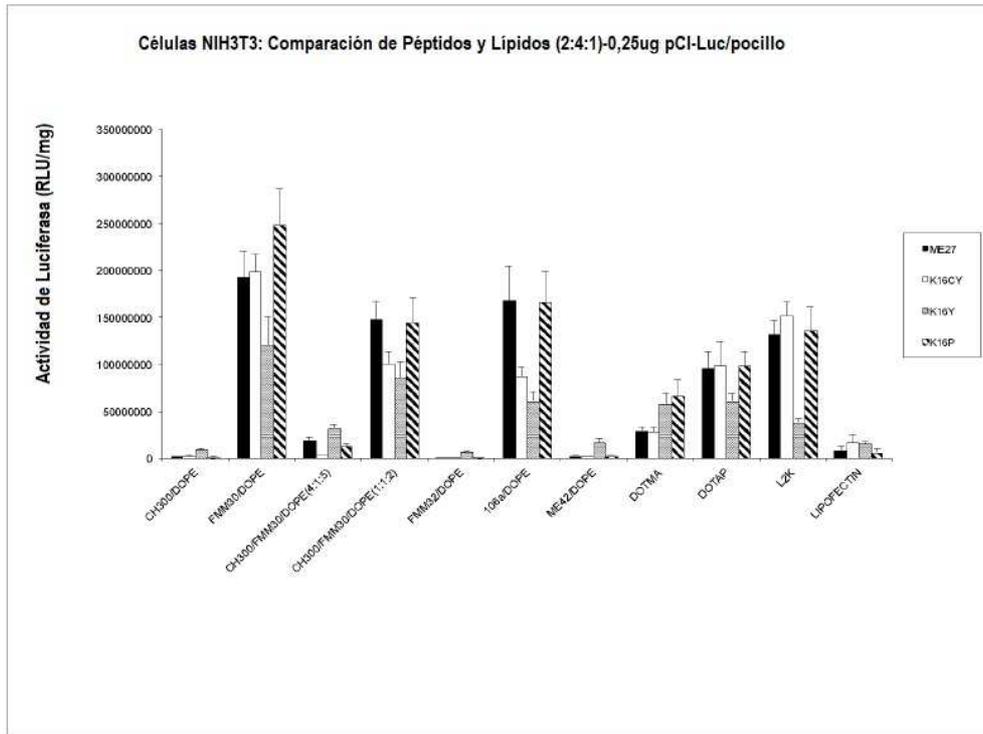


Fig.3.

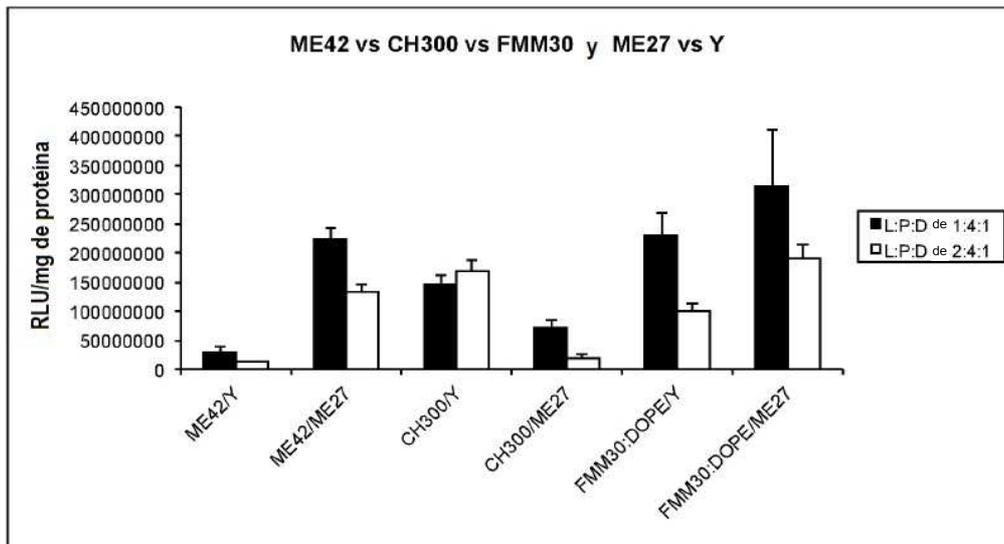


Fig. 4

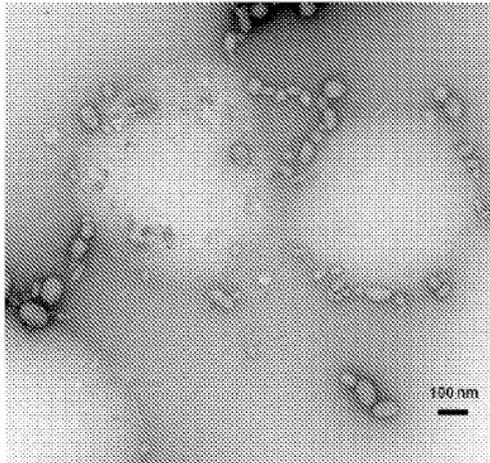


Fig. 5

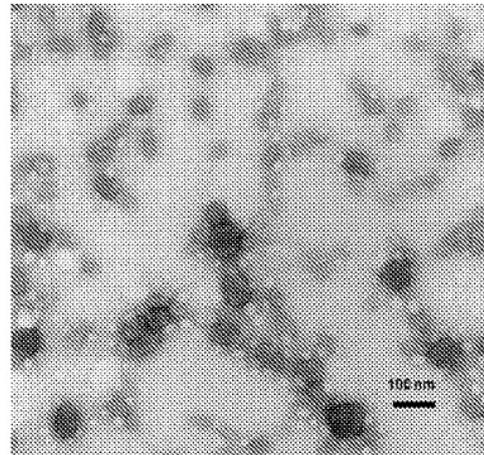


Fig. 6

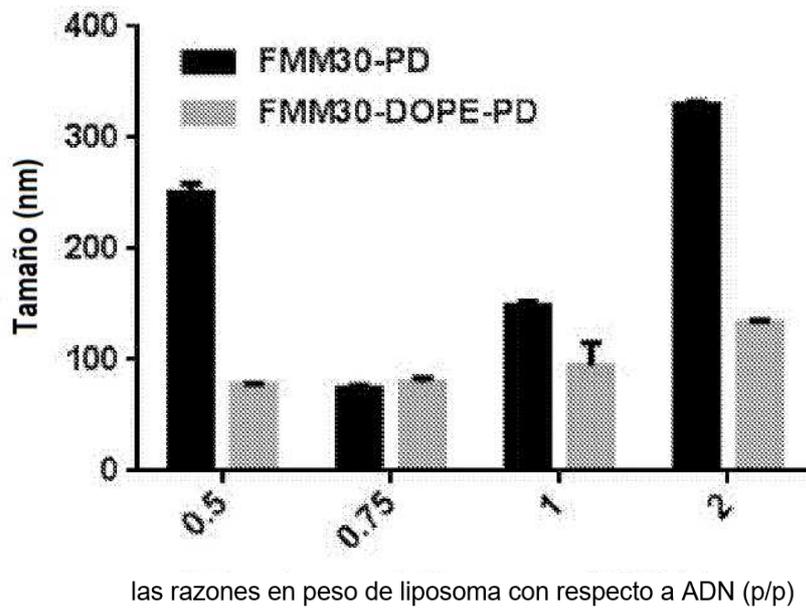


Fig. 7