

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 997**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2019** **PCT/GB2019/050066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019** **WO19138235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2019** **E 19701001 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023** **EP 3737357**

54 Título: **Nanocomplejos aniónicos para la administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

10.01.2018 GB 201800370

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

11.07.2023

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London, Greater London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

HART, STEPHEN y
TAGALAKIS, ARISTIDES

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 945 997 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

Nanocomplejos aniónicos para la administración de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanocomplejos no virales adecuados para la administración de materiales biológicamente activos, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas o moléculas pequeñas, a una célula, y al uso de tales complejos, por ejemplo, en profilaxis, tratamiento y vacunación o investigación de laboratorio *in vitro*.

10 Antecedentes de la invención

La administración de genes para terapia u otros fines es bien conocida, particularmente para el tratamiento de enfermedades tales como la fibrosis quística y determinados cánceres. El término se refiere a la administración en una célula de un gen o parte de un gen para corregir alguna deficiencia o defecto. En la presente memoria descriptiva, el término también se usa para hacer referencia a cualquier introducción de material de ácido nucleico en las células diana, e incluye la vacunación génica y la producción *in vitro* de proteínas comercialmente útiles en las denominadas fábricas de células.

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

En el contexto del tratamiento del cáncer, también puede ser apropiado administrar un gen, u otro compuesto, que no trata de corregir la célula cancerosa defectuosa sino destruirla. Obviamente, en el tratamiento del cáncer, a menudo es especialmente importante que el agente terapéutico se dirija selectivamente a las células cancerosas apropiadas para minimizar el daño a otros tejidos.

Los sistemas de administración de genes no virales se basan en la compactación del material genético en partículas nanométricas mediante la interacción electrostática entre la estructura principal de fosfato cargado negativamente del ADN o el ARN y los 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, a diferencia de los virus, puede dar como resultado una menor toxicidad, especialmente una menor inmunogenicidad; mayor seguridad; coste reducido, direccionamiento razonablemente eficiente y una capacidad de empaquetado mejorada, por ejemplo, la capacidad de tratar con grandes fragmentos de material de ácido nucleico. Desafortunadamente, se han observado eficiencias de transfección más bajas. Los vectores de terapia génica no virales 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.

Los complejos conocidos para la administración de genes incluyen lipoplejo para complejos de ácidos nucleicos basados en lípidos, poliplexo para complejos basados en péptidos o polímeros y lipopoliplexo para sistemas híbridos (Felgner *et al.*, Human Gene Therapy 8, 1997, 511-512). Tal como se usa en el presente documento, el término "LPD" es una forma de lipopoliplexo 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 de LPD logran la transfección a través de una ruta mediada por integrina o por otro receptor; no es necesario que tengan una carga positiva general para que pueda reducirse la interacción sérica indeseable. El componente peptídico proporciona una función de empaquetamiento de ácido nucleico, protegiendo al ADN o al ARN de la degradación intracelular o extracelular, endosomal o de otro tipo. Los componentes lipídicos median en las interacciones con las bicapas lipídicas endosómicas mediante la fusión o permeabilización de la membrana, lo que reduce la degradación endosomal o lisosomal y permite el tráfico de la carga de ácido nucleico en el citoplasma. El componente peptídico puede diseñarse para que sea específico del tipo de célula o específico del receptor de la superficie celular. Por ejemplo, el grado de especificidad por la integrina u otros receptores puede conferir un grado de especificidad celular al complejo LPD. La especificidad resulta del direccionamiento a los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de integrina), y pueden lograrse eficiencias de transfección comparables a las de algunos vectores adenovirales. (Du Z, Munye MM, Tagalakakis 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. 2013;10:127-41; Meng QH, Irvine S, Tagalakakis 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 therapeutics nucleic acids to the brain. *Biomaterials*. 2013;34:9190-200; Tagalakis AD, He L, Saraiva L, Gustafsson KT, Hart SL. Receptor-targeted liposomepeptide nanocomplexes for siRNA delivery. *Biomaterials*. 2011;32:6302-15; Tagalakis AD, Grosse SM, Meng QH, Mustapa MF, Kwok 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 informado péptidos que se dirigen a células epiteliales de las vías respiratorias humanas (WO02/072616). Se han informado péptidos que se dirigen a células dendríticas (documento WO2004/108938).

Los vectores de lípidos/péptidos transfectan una variedad de líneas celulares y cultivos celulares primarios con alta eficiencia y baja toxicidad: células epiteliales (40 % de eficiencia), células del músculo liso vascular (50 % de eficiencia), células endoteliales (30 % de eficiencia) y células hematopoyéticas (10 % de eficiencia). Además, se ha demostrado la transfección *in vivo* del epitelio bronquial del 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, tal como anteriormente).

Las formulaciones de vectores de lípidos no virales que complejan ácido nucleico con lípidos catiónicos tienen problemas de penetración tisular deficiente, unión a células mediada por carga no específica e interacciones con proteínas séricas que pueden conducir a respuestas inflamatorias. El uso de un lípido aniónico como alternativa es atractivo porque ofrece la posibilidad de una citotoxicidad más baja, más especificidad de direccionamiento y menos interacción con los componentes séricos. Sin embargo, debido a que los componentes del vector aniónico y el ácido nucleico tienen ambos una carga negativa, es difícil hacer complejos que comprendan estos dos componentes debido a los desafíos inherentes para lograr el autoensamblaje de los complejos.

Las nanopartículas lipídicas catiónicas de la técnica anterior pueden denominarse vectores LPD o LPR, que significan, respectivamente, "liposoma, policación, ADN" y "liposoma, policación, ARN". La presente invención se basa en la producción de lo que podría llamarse nanopartículas de péptidos y lípidos de "doble capa" que consisten en un ácido nucleico y un núcleo de lípido catiónico (que puede ser un núcleo de LPD o LPR convencional hecho de un liposoma catiónico, un péptido catiónico y el ácido nucleico de interés) y un liposoma pegilado aniónico adicional que recubre las nanopartículas de núcleo para formar una nanopartícula de doble capa (por ejemplo, una nanopartícula LPDL o LPRL). Estos nanocomplejos aniónicos pegilados son estables en el suero y muestran una mayor eficiencia de transfección que las nanopartículas aniónicas y muestran una especificidad dirigida al receptor mucho mayor en comparación con sus contrapartes catiónicas. Esto contrasta con las nanopartículas sintéticas catiónicas en las que la pegilación normalmente reduce la eficiencia de transfección.

Los lípidos aniónicos usados para aplicar el recubrimiento aniónico final a la nanopartícula usan lípidos que se producen de manera natural, incluyendo membranas celulares de los glóbulos blancos o los exosomas, para crear nanopartículas aniónicas. El uso de lípidos de células derivadas de donantes, exosomas u otras fuentes, tales como glóbulos rojos o plaquetas, ofrece la oportunidad para el desarrollo de nanomedicinas personalizadas con propiedades de direccionamiento a tejidos específicos. Se ha demostrado el uso de glóbulos blancos y lípidos derivados de exosomas en transfecciones *in vitro*.

También se demuestra según la invención que los nanocomplejos de la invención muestran una capacidad superior para penetrar a través de la mucosa, lo que los hace especialmente prometedores como agentes para administrar agentes de terapia génica a las células de las vías respiratorias de sujetos que tienen fibrosis quística porque tales individuos tienen niveles anómalamente altos de mucosidad en sus pulmones.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un complejo de administración no viral que, comprende:

A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

5

B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas.

10

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención mezclado o junto con un portador farmacéuticamente adecuado.

15

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para elaborar un complejo de administración no viral, que comprende:

20

A, elaborar un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula, y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

25

B, añadir un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto y, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas.

30

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un complejo de administración no viral, o una composición farmacéutica, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un sujeto por un defecto y/o una deficiencia en un gen o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia antisentido o ARNi.

35

En el presente documento se da a conocer, pero no forma parte de la invención reivindicada, un quinto aspecto que proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer que comprende administrar un complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención al sujeto.

40

En un sexto aspecto, la invención proporciona el uso de un complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención o composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer en un sujeto.

45

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un complejo de administración no viral para su uso como medicamento que comprende:

50

A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

55

B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas, opcionalmente en el que el complejo de administración no viral tiene uno o más de las características adicionales del primer aspecto.

60

En el presente documento se da a conocer, pero no forma parte de la invención reivindicada, un octavo aspecto que proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo de administración no viral según el séptimo aspecto.

65

Breve descripción de las figuras

70

- La figura 1 muestra los resultados de una comparación de estabilidad entre complejos de administración no virales de la invención y complejos de la técnica anterior tal como se evalúan por cambios en la turbidez en suero al 50 %.

75

- La figura 2 muestra los resultados de una comparación de estabilidad entre complejos de administración no virales de la invención y complejos de la técnica anterior en tampón PBS.

80

- La figura 3 muestra los resultados de un experimento de estabilidad de tamaño de partícula de hasta 4 horas para diversos complejos.

- La figura 4 muestra el resultado de un experimento para medir los cambios en el tamaño de partícula (como sustituto de la estabilidad) de diversas partículas de la invención tal como se describe en los ejemplos.

- La figura 5 muestra el potencial zeta de los complejos de administración de la invención.

- La figura 6 muestra el grado de la expresión génica tras la transfección del gen con diversos vectores.

- La figura 7 muestra el grado de la expresión génica después de la transfección de células con diversos vectores. Muestra los resultados de un experimento que replica el que produjo los resultados mostrados en la figura 6.

- La figura 8 muestra datos de citometría de flujo que miden la apoptosis.

- La figura 9 muestra el resultado de un experimento para comparar la eficacia de la translocación de un constructo genético de marcador de GFP.

- La figura 10 muestra los resultados de experimentos de estabilidad comparativa para diversos complejos.

- La figura 11 muestra los resultados de experimentos de estabilidad comparativa para diversos complejos.

- La figura 12 muestra los resultados de una comparación de las eficiencias de transfección tal como se evalúan usando un constructo indicador GFP. Las fotografías muestran imágenes de células N2A después de la transfección con un complejo de la invención que contiene el constructo indicador. La primera fotografía de cada par muestra campos de contraste de fase de las células y la segunda fotografía de cada par es una fotografía de fluorescencia que muestra (en verde en el original) células transfectadas que emiten luz verde.

- La figura 13 muestra datos de citometría de flujo de las mismas transfecciones celulares tal como se muestran en las imágenes de la figura 12.

- La figura 14 muestra fotografías de células de ratones portadores de tumores que ilustran que las nanopartículas de la invención pueden usarse para dirigirse a las células.

- La figura 15 muestra datos de citometría de flujo que comparan la especificidad de diferentes nanopartículas en a) células N2A, b) células H441 o c) células 16-HBE.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un complejo de administración no viral que comprende:

A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas.

Preferiblemente, al menos una proporción del recubrimiento aniónico consiste en lípidos pegilados. Esos lípidos pueden producirse sintéticamente y pueden introducirse con grupos PEG ya unidos en la bicapa lipídica del recubrimiento catiónico. Alternativa o adicionalmente, pueden ser lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto que han tenido grupos PEG unidos para convertirlos en derivados pegilados.

Según determinadas realizaciones, el recubrimiento aniónico es al menos el 50, el 60, el 70, el 80 o el 90 % (en peso) previamente extraído de las membranas plasmáticas de células humanas (especialmente células del sujeto que va a tratarse). En algunas realizaciones, al menos el 50, el 60, el 70, el 80 o el 90 % del recubrimiento aniónico puede extraerse de las membranas plasmáticas de células humanas (especialmente células del sujeto que va a tratarse) y la proporción restante del recubrimiento aniónico consiste en lípidos que se han pegilados.

Las células humanas pueden ser células humanas primarias (por ejemplo, glóbulos rojos recién separados de un

sujeto) o pueden ser células humanas cultivadas. Los exosomas pueden obtenerse del plasma sanguíneo de un sujeto (o en algunas realizaciones de otro líquido corporal tal como orina, saliva o leche materna) o pueden obtenerse del sobrenadante de un cultivo celular. Las membranas plasmáticas pueden separarse de células humanas o exosomas mediante cualquier técnica convencional, por ejemplo, las descritas en H. Evans (Ed.), Biological Membranes. A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC, 1987, págs. 1-35.

En los ejemplos en el presente documento se describe un método adecuado para obtener exosomas a partir de un cultivo celular.

Según algunas realizaciones, el núcleo catiónico comprende todos los componentes (i), (ii) y (iii).

Según algunas realizaciones, la razón de núcleo catiónico A con respecto a recubrimiento aniónico B está entre 2 y 50, por ejemplo, entre 5 y 40, 5 y 30, 8 y 25 o 10 y 20. Estas razones se calculan preferiblemente en peso.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar a un sujeto que comprende el complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención mezclado o junto con un portador farmacéuticamente adecuado.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para elaborar un complejo de administración no viral para su uso en el tratamiento de un sujeto, que comprende:

A, elaborar un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

B, añadir un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de células de un sujeto (por ejemplo glóbulos rojos) o exosomas.

Preferiblemente, al menos una proporción de los lípidos del recubrimiento, ya sean lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto, o lípidos de otra fuente mezclados con los mismos, son derivados pegilados.

Según algunas realizaciones, el núcleo catiónico comprende todos los componentes (i), (ii) y (iii).

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un complejo de administración no viral, o una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un sujeto por un defecto y/o deficiencia en un gen o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia antisentido o ARNi.

En el presente documento se da a conocer, pero no forma parte de la invención reivindicada, un quinto aspecto que proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer que comprende administrar un complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención al sujeto.

En un sexto aspecto, la invención proporciona el uso de un complejo de administración no viral del primer aspecto de la invención o composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer en un sujeto.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un complejo de administración no viral para su uso como medicamento, que comprende:

A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende: (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular, (ii) un ácido nucleico y (iii) un lípido catiónico.

B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos u opcionalmente exosomas, en el que el complejo de administración no viral tiene uno o más de las características adicionales del primer aspecto.

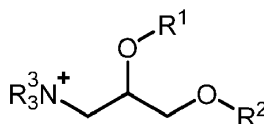
En el presente documento se da a conocer, pero no forma parte de la invención reivindicada, un octavo aspecto que proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo de administración no viral según el séptimo aspecto.

Debe entenderse que las características de la invención descritas con referencia a un aspecto también se contemplan para su uso con otros aspectos de la invención.

Lípidos catiónicos

Los lípidos catiónicos son lípidos con una carga global positiva en condiciones fisiológicas. Normalmente son derivados de ácidos grasos tales como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos. Según algunas realizaciones de todos los aspectos de la invención, los lípidos contienen un grupo etanolamina que proporciona una carga positiva.

El lípido catiónico para su uso según la invención en todos sus aspectos preferiblemente comprende un catión de fórmula (1):



Fórmula (1)

en la que R^1 y R^2 son cada uno independientemente una cadena de alquilo insaturado C_{10-22} .

Ventajosamente, R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son cada uno independientemente un grupo alquenilo insaturado C_{10-22} que incluye uno o dos dobles enlaces $C=C$ insaturados, preferiblemente un doble enlace $C=C$. Los dobles enlaces $C=C$ son preferiblemente *cis*-. Opcionalmente, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un grupo alquenilo C_{12-20} , por ejemplo, un grupo alquenilo C_{14-18} . R^1 y R^2 tienen opcionalmente cadenas de alquilo lineales (es decir, no ramificadas). Por ejemplo, R^1 y R^2 pueden seleccionarse cada uno independientemente de grupos alquenilo de cadena lineal C_{12-20} que tienen un doble enlace $C=C$ insaturado; o por ejemplo, R^1 y R^2 pueden seleccionarse cada uno independientemente de grupos alquenilo de cadena lineal C_{14-18} que tienen un doble enlace insaturado *cis*- $C=C$. Opcionalmente, R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son cada uno independientemente un grupo alquenilo C_{14} , C_{16} o C_{18} de cadena lineal insaturado que tiene un doble enlace. Opcionalmente, R^1 y R^2 se seleccionan de

$-(CH_2)_{6-12}CH=CH(CH_2)_{1-9}CH_3$, especialmente $-(CH_2)_{7-11}CH=CH(CH_2)_{1-8}CH_3$

o $-(CH_2)_{8-10}CH=CH(CH_2)_{1-7}CH_3$, tal como $-(CH_2)_{10}CH=CH(CH_2)_1CH_3$, $-(CH_2)_8CH=CH(CH_2)_7CH_3$

o $-(CH_2)_{10}CH=CH(CH_2)_3CH_3$. Preferiblemente, el doble enlace es *cis* y R^1 y R^2 se seleccionan de $-(CH_2)_{6-12}CH[Z]=CH(CH_2)_{1-9}CH_3$, especialmente $-(CH_2)_{7-11}CH[Z]=CH(CH_2)_{1-8}CH_3$ o $-(CH_2)_{8-10}[Z]CH=CH(CH_2)_{1-7}CH_3$, tal como $-(CH_2)_{10}[Z]CH=CH(CH_2)CH_3$, $-(CH_2)_8[Z]CH=CH(CH_2)_7CH_3$

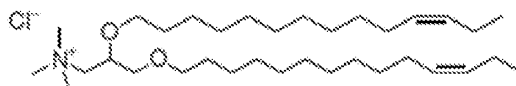
o $-(CH_2)_{10}[Z]CH=CH(CH_2)_3CH_3$. Preferiblemente, R^1 y R^2 son iguales.

Cada grupo R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Preferiblemente, cada R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno o metilo. Cada R^3 puede ser hidrógeno o cada R^3 puede ser metilo. En una realización preferida, cada R^3 es metilo.

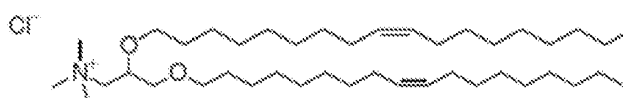
Además del catión, los lípidos catiónicos pueden comprender un contraión, por ejemplo, un contraión inorgánico, especialmente un anión farmacéuticamente aceptable tal como cloruro o bromuro.

Ejemplos de cationes especialmente adecuados son DTDMA (ditetradeciltrimetilamonio), DOTMA (2,3-dioleiloxipropil-1-trimentilamonio) y DHDTMA (dihexadeciltrimetilamonio). Los lípidos catiónicos que comprenden los cationes anteriores y los contraaniones de cloruro se ilustran a continuación:

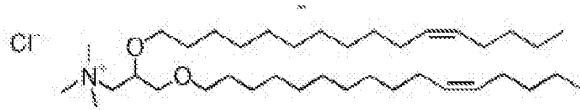
DTDMA (C14)



DOTMA (C18)



DHDTMA (C16)



Debe entenderse que el lípido catiónico según todos los aspectos de la invención puede no ser necesariamente el único lípido presente en el núcleo catiónico. También pueden estar presentes otros lípidos que pueden ser neutros, aniónicos o catiónicos. Preferiblemente, el/los lípido(s) catiónico(s) global(es) está(n) presente(s) como el lípido más predominante en el núcleo (en base de razón molar). Preferiblemente, al menos el 60, el 70, el 80, el 85 o el 90 % del lípido total presente en el núcleo catiónico es un lípido catiónico, por ejemplo, al menos el 60, el 70, el 80, el 85 o el 90 % del lípido total presente en el núcleo catiónico puede ser DDTMA, DOTMA o DHDTMA o mezclas de los mismos.

Péptidos

El péptido para su uso según la invención en todos sus aspectos es de estructura A-B-C en la que:

A es un componente de unión a ácido nucleico policationico,

B es un elemento espaciador que comprende la secuencia de aminoácidos RVRR (SEQ ID NO: 1), y

C es un componente de unión al receptor de la superficie celular que comprende la secuencia de aminoácidos LX⁶HK en la que X⁶ es Q o P (SEQ ID NO: 2).

El componente de unión a ácido nucleico policationico A es cualquier polication que pueda unirse a ADN o ARN. Un polication puede ser policationico en sí mismo o puede tener cualquier número de monómeros catiónicos siempre que se conserve la capacidad de unirse a ADN o ARN. Por ejemplo, pueden estar presentes de 3 a 100 monómeros catiónicos, por ejemplo, de 10 a 20, por ejemplo de 14 a 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 de aminoácidos catiónicos repetidos u otra unidad catiónica que porta grupos cargados positivamente, siendo tales polímeros capaces de formar un complejo con un ácido nucleico en condiciones fisiológicas. Un ejemplo de una molécula policationica que se une a un ácido nucleico es un oligopéptido que comprende uno o más aminoácidos catiónicos. Un oligopéptido de este tipo puede ser, por ejemplo, una molécula de oligo-lisina, una molécula de oligo-histidina, una molécula de oligo-arginina, una molécula de oligo-ornitina, una molécula de ácido oligo-diaminopropiónico o una molécula de ácido oligo-diaminobutírico, o un oligómero combinado que comprende o consiste en cualquier combinación de restos de histidina, arginina, lisina, ornitina, ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico. Cualquiera de los oligopéptidos anteriores puede tener, por ejemplo, un total de desde 3 hasta 35, por ejemplo, desde 5 hasta 25 residuos, preferiblemente desde 10 hasta 20 residuos, por ejemplo, desde 14 hasta 18 residuos, por ejemplo, 16 residuos.

Se prefiere particularmente una oligo-lisina, por ejemplo, que tiene de desde 3 hasta 35, por ejemplo, desde 2 hasta 25, por ejemplo, desde 10 hasta 20 residuos de lisina, por ejemplo, desde 13 hasta 19, por ejemplo, desde 14 hasta 18, por ejemplo, desde 15 hasta 17 residuos, por ejemplo, 16 residuos, es decir, [K]₁₆, "K" indica lisina (SEQ ID NO: 3).

Otros ejemplos de componentes policationicos incluyen dendrímeros y polietilenimina. La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico reticulado no tóxico con potencial de administración de genes (Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92, 7297-7301). La polietilenimina puede obtenerse de Fluka (800 kDa) o de Sigma (50 kDa) o, alternativamente, prediluirse para fines de transfección de PolyPlus-transfection (Illkirch, Francia). Normalmente, PEI es más eficiente cuando se usa en un exceso de 9 veces con respecto al ADN, calculándose la razón de exceso como nitrógeno de PEI: fosfato de ADN, y a un pH de 5 a 8. Tales parámetros pueden optimizarse de una manera familiar para el experto en la técnica.

El péptido de elemento espaciador B comprende ventajosamente tres o más aminoácidos, por ejemplo, cuatro o más, por ejemplo, cinco o más, por ejemplo, diez aminoácidos o más, por ejemplo, hasta doce aminoácidos. El elemento espaciador puede comprender, por ejemplo, desde 4 hasta 10 aminoácidos, tal como desde 6 hasta 8 aminoácidos. Los aminoácidos pueden producirse de manera natural o no producirse de manera natural. Pueden tener configuración L o D. Los aminoácidos pueden ser iguales o diferentes, pero generalmente debe evitarse el uso de múltiples residuos de lisina (u otros aminoácidos catiónicos adecuados para su uso en el componente de unión a ácido nucleico policationico de un complejo de vector) en el espaciador ya que secuencias de oligo-lisina tienen actividad como componente de unión a ácido nucleico policationico.

El péptido de elemento espaciador B incluye ventajosamente una porción escindible que es susceptible de escindirse dentro de una célula. Un péptido de elemento espaciador B que incluye una porción escindible que es

susceptible de escisión dentro de una célula puede ser susceptible de escisión dentro del endosoma, lisosoma y/o citoplasma de una célula. En el presente documento, por susceptible de escisión se entiende que el elemento es susceptible de escisión durante una escala de tiempo durante la cual los componentes A y C permanecen intactos. El elemento B se escinde más rápidamente de lo que tienen efecto las rutas de degradación de los péptidos celulares. La porción escindible normalmente incluye de desde 3 hasta 6 aminoácidos, por ejemplo, 4 aminoácidos. El elemento espaciador B incluye ventajosamente la secuencia de aminoácidos RVRR como porción escindible. La secuencia de aminoácidos RVRR es susceptible de escisión enzimática por la proteasa endosomal furina. Ventajosamente, la porción escindible del péptido de elemento espaciador B está unida al componente de unión al ácido nucleico A.

El péptido de elemento espaciador B puede comprender adicionalmente un ligador, que es preferiblemente o bien un péptido, es decir, comprende residuos de aminoácidos, o bien un grupo de polietilenglicol, o una mezcla de los dos. Los aminoácidos pueden producirse de manera natural o no producirse de manera natural. Pueden tener configuración L o D. El ligador puede tener dos o más aminoácidos. Puede comprender, por ejemplo, tres o más aminoácidos, por ejemplo, cuatro o más, por ejemplo, cinco o más, por ejemplo, hasta diez aminoácidos. El ligador normalmente incluye de desde 2 hasta 7 aminoácidos, por ejemplo desde 3 hasta 5 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser iguales o diferentes. El ligador puede comprender, por ejemplo, el dipéptido glicina-glicina (GG) o glicina-alanina (GA). El ligador puede comprender un espaciador hidrófobo. El ligador puede incluir la secuencia de aminoácidos XSX en la que X es ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -Ahx), también conocido como ácido 6-aminohexanoico, un aminoácido sintético, es decir, que no se produce de manera natural. El ácido aminocaproico funciona como un espaciador hidrófobo. Los ejemplos de ligadores adecuados incluyen GG, GA, XSXGG (SEQ ID NO: 4) y XSXGA (SEQ ID NO: 5). Los ligadores particularmente preferidos son XSXGA (SEQ ID NO: 5) y GA. Preferiblemente, el ligador está al final del péptido de elemento espaciador B que está unido al componente de unión al receptor de la superficie celular C.

El péptido de elemento espaciador B comprende ventajosamente una porción escindible que comprende la secuencia RVRR (SEQ ID NO: 1) que está unida al componente de unión al ácido nucleico A y un ligador que está unido al componente de unión al receptor de la superficie celular C. El elemento espaciador B puede, por ejemplo, incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos RVRR (SEQ ID NO: 1), RVRRG (SEQ ID NO: 6), RVRRG (SEQ ID NO: 7), RVRRXS (SEQ ID NO: 8), RVRRXS (SEQ ID NO: 9) o RVRRXS (SEQ ID NO: 10), especialmente RVRRG (SEQ ID NO: 6) o RVRRXS (SEQ ID NO: 9).

Preferiblemente, el componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende un péptido. Cuando el componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende un péptido, el péptido puede tener una longitud de hasta 20 aminoácidos, 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 de desde 6 hasta 20 inclusive. Generalmente, se prefiere que el péptido tenga 15 aminoácidos o menos, más preferiblemente 12 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 de 7 a 10 aminoácidos.

El componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende una porción de unión al receptor que comprende una secuencia de aminoácidos que se une a los receptores de la superficie celular. El componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende ventajosamente una porción de unión al receptor que puede unirse a las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (HAE). Los ejemplos de péptidos de unión a células HAE se describen en el documento WO 02/072616. La porción de unión al receptor comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos LX⁶HK en la que X⁶ es Q o P (SEQ ID NO: 2). Preferiblemente X⁶ es P. El componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos YGLPHKF (SEQ ID NO: 11).

El componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende ventajosamente un péptido que comprende una región cíclica. Los péptidos cíclicos pueden formarse mediante la provisión de al menos dos residuos de cisteína en el péptido, lo que permite la formación de un enlace disulfuro. Por consiguiente, los componentes de unión al receptor de la superficie celular C preferidos consisten en o comprenden un péptido que tiene dos o más residuos de cisteína que pueden formar uno o más enlaces disulfuro. Preferiblemente, los residuos de cisteína flanquean la porción de unión al receptor primario.

El componente de unión al receptor de la superficie celular C comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos CYGLPHKF (SEQ ID NO: 12).

El péptido de estructura A-B-C puede comprender, por ejemplo, un policonjugado de unión a ácido nucleico, tal como polilisina, unido a RVRR (SEQ ID NO: 1), la porción escindible de un elemento espaciador, seguido de una porción ligadora que comprende la secuencia de aminoácidos XSXGA (SEQ ID NO: 5) o GA unida a un componente de unión al receptor de la superficie celular YGLPHKF (SEQ ID NO: 11), opcionalmente flanqueado por dos residuos de cisteína.

Los péptidos particulares adecuados para su uso según la invención son:

Péptido 35: K₁₆-RVRR-XSXGA-CYGLPHKFCG (SEQ ID NO: 13); y

5 Péptido 32: K₁₆-RVRR-GA-CYGLPHKFCG (SEQ ID NO: 14).

Recubrimiento aniónico

10 El recubrimiento aniónico según la presente invención en todos sus aspectos es preferiblemente un liposoma de bicapa lipídica que comprende lípidos aniónicos. Se entiende que el recubrimiento aniónico no necesita comprender exclusivamente lípidos aniónicos, sino simplemente que el número de cargas negativas de lípidos aniónicos en el recubrimiento es mayor que el número de cargas positivas en otros lípidos del recubrimiento aniónico.

15 Según la invención, el recubrimiento aniónico comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto, por ejemplo glóbulos rojos o exosomas o derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto constituyen al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 60, el 70, el 80 o el 90 %) de los lípidos del recubrimiento aniónico en peso. El lípido extraído de una fuente de este tipo puede purificarse sustancialmente o puede permanecer mezclado con otros componentes de la membrana plasmática (por ejemplo, proteínas y azúcares).
20 Según algunas realizaciones, el recubrimiento aniónico es sustancialmente (por ejemplo, al menos el 50, el 60, el 70, el 80 o el 90 %) membrana plasmática “en bruto” tal como se extrae de una célula o exosoma. Si ese es el caso, se apreciará que los componentes no lipídicos tienen potencial antigénico y, por tanto, se prefiere que la célula o el exosoma sea autólogo (es decir, obtenido del sujeto individual al que va a administrarse el complejo de administración no viral).
25

En algunas realizaciones, el recubrimiento aniónico comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática del mismo tipo celular que el que va a ser la diana del complejo de administración viral. En algunas realizaciones, la membrana plasmática puede extraerse directamente de las células. En otras realizaciones, las células pueden multiplicarse en primer lugar en cultivo antes de recoger su membrana plasmática. En otras realizaciones, la membrana plasmática puede recogerse de exosomas vertidos en un medio en el que se han cultivado células o extraerse de material acelular recogido de un sujeto (por ejemplo, del plasma sanguíneo de un sujeto). En algunas realizaciones, la membrana plasmática puede recogerse de un sujeto diferente del sujeto que va a tratarse. En otras realizaciones, la membrana plasmática puede recogerse del mismo sujeto que el que va a tratarse.
30
35

Debe entenderse que el lípido aniónico según todos los aspectos de la invención puede no ser necesariamente el único lípido presente en el recubrimiento de lípido aniónico. También pueden estar presentes otros lípidos que sean neutros, aniónicos o catiónicos. Sin embargo, debe predominar una carga negativa global en los lípidos del recubrimiento aniónico. La preponderancia de lípidos cargados negativamente en las membranas plasmáticas asegurará una carga negativa general.
40

El recubrimiento catiónico consiste principalmente en lípido, pero puede contener otro material, por ejemplo, material derivado de la célula o exosomas en los que el lípido se extrae de un plasmalema. Preferiblemente, al menos el 70, el 80 o el 90 % en peso del recubrimiento catiónico es lípido. Preferiblemente, al menos el 2, el 3 o el 5 % (en peso o razón molar) del lípido del recubrimiento catiónico es lípido pegilado. El lípido pegilado puede ser una fracción del lípido extraído de un plasmalema, pero en la mayoría de las realizaciones será un lípido prepegilado mezclado con lípido extraído de un plasmalema.
45

50 En algunas realizaciones, los métodos de la invención implican el uso de lípidos que se han extraído previamente (es decir, no se reivindica la etapa de extraer el lípido). En otras realizaciones, los métodos de la invención incluyen la etapa adicional de extraer el lípido pero no reivindican las etapas de obtener las células del sujeto. En otras realizaciones, los métodos de la invención incluyen las etapas de obtener células del sujeto y extraer el lípido de la membrana plasmática de esas células.
55

Pegilación

El recubrimiento aniónico comprende preferentemente lípidos pegilados. La pegilación es el procedimiento de unión covalente de polietilenglicol (PEG) a un lípido. Pueden usarse PEG de diversas longitudes según todos los aspectos de la invención. Por ejemplo, la invención en todos los aspectos puede usar de PEG 500 a PEG 5000, por ejemplo, de PEG 700 a PEG 4000, por ejemplo, de PEG 800 a PEG 3000, por ejemplo, de PEG 1000 a PEG 2500, por ejemplo, de PEG 1800 a PEG 2200 (según por convención, el número designa el peso molecular promedio de la molécula de PEG). Según la invención, los lípidos pegilados pueden introducirse en la bicapa lipídica aniónica del recubrimiento de la partícula mezclando lípidos prepegilados, por ejemplo, PEG2000-DPPE, PEG2000-DOPE, PEG2000-DSPE, en una bicapa lipídica formada a partir de lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática. Alternativa o adicionalmente, los lípidos de la membrana plasmática. En cualquier
60
65

caso, la proporción de moléculas pegiladas puede ser preferiblemente de al menos el 2, el 5, el 10, el 20 o el 30 % del número total de moléculas lipídicas según determinadas realizaciones. En otras realizaciones, no se pegilan más del 1, el 2 o el 3 % del número total de moléculas lipídicas. En algunas realizaciones, el número total de moléculas lipídicas que están pegiladas se encuentra entre el 1 y el 5 %, por ejemplo, entre el 1 y el 3 % o entre el 1 y el 2 % o entre el 1,5 y el 3 %. La pegilación del recubrimiento puede llevarse a cabo usando cualquier método disponible comercialmente, por ejemplo, por coformulación usando lípidos en evaporación rotatoria para producir liposomas mediante una película delgada o mediante un procedimiento de deshidratación/rehidratación. La pegilación normalmente aumenta la semivida del complejo *in vivo*. En la mayoría de las realizaciones, los lípidos pegilados se añadirán al recubrimiento aniónico mezclando los lípidos prepegilados con el resto de los componentes del recubrimiento. Los lípidos pegilados suelen ser solubles en agua, pero debido a que el componente lipídico del lípido pegilado se estabiliza cuando se inserta en una bicapa lipídica, es posible añadir lípidos pegilados a un recubrimiento aniónico de bicapa de liposomas según la invención simplemente añadiendo lípidos pegilados a la disolución acuosa en la que se suspenden los complejos nacientes de la invención

Puede usarse cualquier método disponible de pegilación de lípidos según todos los aspectos de la invención. Una variedad de agentes de pegilación están disponibles comercialmente, por ejemplo, de ThermoScientific.

Ácido nucleico

Según determinadas realizaciones, el ácido nucleico es un ARNm. Según otras realizaciones, es un ARN de interferencia (ARNi). El ARNi puede ser micro ARN de interferencia (miARN) o ARN de interferencia pequeño (ARNip). En algunas realizaciones, el ARNi puede ser antiviral o anticancerígeno. Por ejemplo, puede ser un ARNip que silencia un gen regulado por incremento de manera diferencial en células cancerosas.

Según determinadas realizaciones, el ácido nucleico puede tener una longitud de entre 15 y 30 pares de bases, o entre 50 y 500 pares de bases (por ejemplo, una longitud de entre 18 y 28, 60 y 400, 200 y 500, 300 y 500 pares de bases). El ARN puede ser monocatenario o bicatenario.

Según otras realizaciones, el ácido nucleico es ADN.

Según realizaciones relacionadas con el tratamiento de la fibrosis quística, el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica para el regulador de conductancia transmembranario de fibrosis quística (CFTR), opcionalmente unida operativamente a una secuencia promotora activa en células epiteliales de pulmón humano. En tales realizaciones, el componente de unión a la superficie celular preferiblemente se une a la superficie celular de las células epiteliales de pulmón humano. En tales realizaciones, el recubrimiento aniónico comprende preferiblemente una composición lipídica en la que dichos lípidos varían de la composición lipídica del plasmalema de las células epiteliales de pulmón humano en no más del 20 %. Opcionalmente, el recubrimiento aniónico puede derivarse, al menos en parte, de células epiteliales de pulmón humano (por ejemplo, una línea celular de epitelio de pulmón humano o un cultivo primario, que opcionalmente puede ser autólogo con el sujeto que va a tratarse).

Tamaño de partícula del complejo de administración no viral

Se prefiere según todos los aspectos de la invención que los complejos de administración no virales tengan un tamaño de partícula de menos de 500 nm, por ejemplo, menos de 250 nm, por ejemplo, menos de 100 nm. En una población de partículas habrá alguna variación en el tamaño de partícula, pero los criterios anteriores se considerarán cumplidos si al menos el 80 % de las partículas son de menos de 500 nm, por ejemplo, menos de 250 nm, por ejemplo, menos de 100 nm.

Portadores farmacéuticos

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender complejos de administración no virales de la invención mezclados con un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un excipiente adecuado para una vía de administración específica. La composición también puede proporcionarse en un dispositivo adecuado de almacenamiento o administración. Por ejemplo, la composición puede formularse con excipientes (por ejemplo, polvos y/o propulsores de aerosoles) adecuados para administración por inhalación para administración a los pulmones. En tales realizaciones, puede envasarse opcionalmente en un bote de inhalador. Puede formularse en una disolución para inyección i.v. y, opcionalmente, envasarse en una jeringa u otro dispositivo de inyección. Puede formularse en forma de crema, ungüento o loción para administración sobre la piel u otra superficie corporal o puede formularse para inyección intratumoral o intraperitoneal.

Enfermedades que van a tratarse

Las enfermedades específicas contempladas para su tratamiento mediante los complejos de administración no virales y/o las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen enfermedades respiratorias que incluyen fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, EPOC y asma, y también cáncer tanto del sistema respiratorio como en

otros sitios del cuerpo. Según todos los aspectos de la invención, el componente de unión al receptor de la superficie celular puede seleccionarse opcionalmente para unirse a un tipo de célula elegido con referencia a la enfermedad que va a tratarse. Según algunas realizaciones, el tipo de célula es un tipo de célula epitelial, por ejemplo, un tipo de célula epitelial respiratoria tal como una célula columnar ciliada, una célula caliciforme o una célula basal; un tipo de células epiteliales de la piel, un tipo de células epiteliales nasales o intestinales, o un tipo de células epiteliales de los vasos sanguíneos, glándulas submandibulares, encías, lengua, paladar, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto, ano, vesícula biliar, tiroides, vaso linfático, piel, mesotelio, ovarios, trompas de Falopio, endometrio uterino, cuello uterino, vagina, epidídimo, conducto deferente, laringe, tráquea, riñón, próstata, nariz o córnea.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los disolventes y los reactivos para la síntesis eran de calidad para reactivo de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Se obtuvo CH_2Cl_2 seco usando columnas de alúmina anhidra usando el procedimiento descrito en Pangborn, AB; Giardello, MA; Grubbs, R. H.; Rosen, R. K.; Timmers, F. J. *Organometallics* 1996, 15, 1518-1520. Todas las reacciones sensibles a la humedad se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno o argón usando objetos de cristal secados al horno. Las reacciones se monitorizaron mediante CCF en placas de F_{254} Kieselgel 60 con detección por UV, tinciones con permanganato de potasio y ácido fosfomolibdico. La cromatografía en columna ultrarrápida se llevó a cabo usando gel de sílice (tamaño de partícula 40-63 μm). Se registraron los espectros de ^1H RMN de H y ^{13}C RMN en máquinas Bruker AMX300 MHz, Avance-500 MHz y Avance-600 MHz. Las constantes de acoplamiento se miden en hercios (Hz) y, a menos que se especifique 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 infrarrojos se registraron en un espectrómetro Shimadzu FTIR-8700.

En los siguientes ejemplos, los liposomas se indican usando la abreviatura "Cnn DXXX nn", donde Cnn es el lípido catiónico, por ejemplo, C14 (D(TD)TMA), C18 (D(TD)TMA) o C16 (D(HD)TMA); DXXX es el fosfolípido, por ejemplo, DOPE (fosfatidil etanolamina o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (fosfatidilcolina o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) o DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina); y nn es el péptido, por ejemplo, ME27 (27), péptido 35 (35), Y (Y) o péptido 32 (32).

Lípidos

- D(TD)TMA (C14), D(TD)TMA (C18) y D(HD)TMA (C16) se prepararon según el método descrito en Hurley CA, Wong JB, Hailes HC y Tabor AB, *Asymmetric Synthesis of Dialkyl-3-alkylammonium Cationic Lipids*. *J. Org. Chem.* 2004, 69:980-983.

- DOPE está disponible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.

- DSPC está disponible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.

- DOPC está disponible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.

Síntesis de péptidos

Los péptidos descritos (tabla 1A) se sintetizaron usando instrumentos y técnicas convencionales.

Tabla 1A: secuencia peptídica

Péptido	Secuencia
K16	KKKKKKKKKKKKKKKK (SEQ ID NO: 3)
ME27	(K) ₁₆ RVRRGACRGDCLG (SEQ ID NO: 15)
Péptido 32	(K) ₁₆ RVRRGACYGLPHKFCG (SEQ ID NO: 14)
Y	(K) ₁₆ GACYGLPHKFCG (SEQ ID NO: 16)
Péptido 35*	(K) ₁₆ RVRRXSXXGACYGLPHKFCG (SEQ ID NO: 13)
* en el péptido 35 X = ϵ -Ahx	

Tabla 1B - Masa peptídica

Péptido	Masa (g.mol ⁻¹)
---------	-----------------------------

K16	2068
ME27	3467,5
Péptido 35	4184,38
Y	3303,28
Péptido 32	3870,98

Secuencias peptídicas lineales: el péptido se sintetizó en una escala de 20 μ mol usando jeringas de 2 ml con fritas de teflón y un volumen de acoplamiento de 500 μ l. Para estas secuencias se usaron resina de NovaSyn TGT precargada con Fmoc-Gly o resina de Fmoc-Gly-2-Cl-Trt. Se sintetizó Fmoc-Peg4-COOH siguiendo un procedimiento descrito previamente (véase 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 esa memoria descriptiva). La resina de TGT se hinchó inicialmente durante 10 min, sin embargo, la resina de 2-Cl-Trt necesitó un tiempo de hinchamiento inicial prolongado (algunas horas) en DMF. El acoplamiento de rutina se realizó con HBTU (en DMF) y DIPEA (en NMP) usando un exceso de cuatro veces de reactivos. Se escindió Fmoc con una disolución al 40 % de piperidina en DMF durante 3 min y una disolución al 20 % durante 10 min. Los ciclos de síntesis consistieron en un tiempo de acoplamiento de 40 min, 3 min para la desprotección de Fmoc con piperidina al 40 %, otros 10 min para la 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 se lavaron con DCM, metanol y dietil éter (3 veces cada uno) usando la función "manual"/"vacío" del equipo Syro. Se aplicó succión durante algún tiempo más para ayudar a evaporar el éter.

Formación de enlaces disulfuro en resina: para formar puentes disulfuro en la resina, la resina se colocó en una jeringa con frita de PE y se hinchó en DMF. Después de eliminar el exceso de DMF, se añadió una disolución de yodo recién preparada en una cantidad mínima de DMF (por ejemplo, 500 μ l para una jeringa de 2 ml, 10 eq de yodo para carga de resina) y la jeringa se agitó con vórtex durante 4 h durante 20 s cada 4 min. Se eliminó la disolución de reactivo y se lavó la resina de 10 a 20 veces con DMF y 3 veces con cada uno de DCM, metanol y éter.

Escisión y desprotección: las jeringas se transfirieron a la campana extractora de humos para su escisión. La escisión se realizó con un cóctel de TFA al 95 %, TIS al 2,5 % y H₂O al 2,5 %. Se añadió una cantidad mínima de cóctel recién preparado para cubrir la resina (por ejemplo, < 500 μ l en las jeringas de 2 ml). Después de 4 h, las disoluciones de escisión se pasaron a tubos de polipropileno (PP) usando un émbolo y las resinas se lavaron con otra pequeña cantidad de cóctel de escisión (por ejemplo, 200 μ l en las jeringas de 2 ml). A continuación, los péptidos se precipitaron con éter (por ejemplo, a las fracciones combinadas de las jeringas de 2 ml se añadieron unos 4 ml de éter dietílico). Los tubos de PP se mantuvieron en el congelador durante al menos 15 min, luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min y la disolución se decantó del sedimento de péptido. La centrifugación y la decantación se repitieron dos veces con aproximadamente 2 ml de éter. Finalmente, los péptidos se disolvieron en agua o tBuOH/agua (4:1) y se liofilizaron. Algunas secuencias de péptidos mostraron una solubilidad muy baja y, en ocasiones, fueron necesarios varios procedimientos de liofilización/disolución con diferentes mezclas de disolventes (agua, tBuOH o acetonitrilo) para obtener un péptido esponjoso.

El péptido se analizó mediante HPLC de fase inversa y se purificó mediante HPLC de fase inversa hasta una pureza >90 %. Los espectros de masas se registraron usando Micromass Quattro ES-MS (Software: Masslynx) y las masas se registran en la tabla 1B.

El péptido 35, K16Y y el péptido 32 se adquirieron de AMS Bio Ltd., Birmingham, RU, y se sintetizaron usando química de síntesis de péptidos semiautomática. 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 dan en la tabla 1B.

Se adquirió K16 tal como se describió anteriormente (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 dan en la tabla 1B.

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

ARNm

Se adquirió ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (CleanCap FLuc mRNA) de TriLink Biotech, San Diego, CA. Se usaron tanto ARNm sin modificaciones como ARNm con modificaciones de pseudouridina.

Obtención de imágenes de partículas

El tamaño de las nanopartículas de RLP que contenían péptidos con lípidos se determinó en diferentes razones en peso de liposoma con respecto a ARNm (p/p) mediante dispersión de luz dinámica usando un NanoZS Zetasizer (Malvern). Los complejos se prepararon tal como se describió anteriormente excepto que se formularon en agua libre de nucleasas en lugar de Opti-MEM. Se analizaron muestras de 1 ml (que contenían 1,5 µg de ARNm) para determinar su tamaño y potencial zeta. El tamaño se registró como el promedio de la distribución de partículas basada en la intensidad.

10 Preparación de diversos nanocomplejos no virales de la invención

Razón en peso para la preparación de LPRL-RTN (lípidos/péptido/ARNm/lípido - nanopartículas dirigidas al receptor, DD = mezcla DOTMA-DOPE)

RTN (RTN = nanocomplejos dirigidos al receptor)	Núcleo catiónico interno LPR-RTN	Razón en peso del núcleo catiónico interno LPR-RTN, razón de mezcla de lípidos: péptido: ácido nucleico	Liposoma aniónico externo (véase la tabla a continuación)	Razón en peso de liposoma aniónico
LPRL1-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	GK24	20
LPRL2-RTN	DD/ME27/ARNip	1/3/1	GK24	20
LPRL3-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	AT3	19
LPRL4-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	AT4	10,84
LPRL5-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	AT5	9,9
LPRL6-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	AT6	14
LPRL7-RTN	DD/ME27/ARNip	0,75/3/1	AT7	13,5
Nota: las razones en peso se optimizaron para obtener LPRL-RTN aniónicos con un uso mínimo de liposomas y péptidos.				

15

Composición del recubrimiento de liposomas de la invención.

Liposoma	Lípido 1 (% molar)	Lípido 2 (% molar)	Lípido 3 (% molar)
GK24	DOPG (47,5 %)	DOPE (47,5 %)	mDPPE-PEG2000 (5 %)
GK25	DOPG (47,5 %)	DOPE (47,5 %)	DOPE-PEG2000 (5 %)
GK27	DOTMA (47,5 %)	DOPE (47,5 %)	mDPPE-PEG2000 (5 %)
GK28	DOTMA (47,5 %)	DOPE (47,5 %)	DOPE-PEG2000 (5 %)
AT1	DOTMA (49,5 %)	DOPE (49,5 %)	mDPPE-PEG2000 (1 %)
A LAS 2	DOTMA (49,5 %)	DOPE (49,5 %)	DOPE-PEG2000 (1 %)
AT3	DOPG (49,5 %)	DOPE (49,5 %)	mDPPE-PEG2000 (1 %)
AT4	DOPG (95 %)	-	mDPPE-PEG2000 (5 %)
AT5	DOPG (99 %)	-	mDPPE-PEG2000 (1 %)
AT6	DOPG (71,25 %)	DOPE (23,75 %)	mDPPE-PEG2000 (5 %)
AT7	DOPG (74,25 %)	DOPE (24,75 %)	mDPPE-PEG2000 (1 %)

20

Se prepararon LPRL1-RTN a LPRL7-RTN usando componentes tal como se indica en la tabla anterior usando los métodos descritos en el presente documento y se colocaron en solución salina tamponada con fosfato normal (ThermoFisher (anteriormente Life Technologies), n. ° de catálogo 14190-094), tampón PBS, durante hasta 4 horas. A continuación, se analizó el tamaño de las partículas tal como se describió anteriormente.

Producción de exosomas

25

Los exosomas pueden recogerse de cualquier líquido corporal adecuado o de un medio de cultivo celular. Como ejemplo para ilustrar cómo pueden recogerse los exosomas de un cultivo celular, la línea celular U937 se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Las células U937 se cultivaron en

suspensión y se expandieron en matraces verticales T75 en aproximadamente 30 ml de medio. Los cultivos se sometieron a pase cada 3-4 días y se añadieron nuevos medios cada dos días si era necesario. La línea celular se expandió hasta que hubo al menos ocho matraces T75 para tener un número suficiente de células (de $1,5 \times 10^6$ a $2,0 \times 10^6$ células por matraz).

5

Para la extracción de exosomas, U937 debe cultivarse en medios acondicionados para evitar la contaminación del suero FBS que es rico en exosomas fetales bovinos. Las líneas celulares U937 se cultivaron en medios tal como se describió anteriormente. Al menos 2 días antes de la recolección de exosomas, se cambiaron a medios acondicionados. Los protocolos de extracción y purificación se tomaron de Thery *et al.*, 2006 – isolating and

10

characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, Current Protocols in Cell Biology.

El medio acondicionado (medio libre de exosomas) se preparó tal como sigue:

15

1. A medio de 1640 RPMI se añadió FBS al 20 %.

2. Este medio completo se centrifugó en tubos de policarbonato de 38 ml a 100.000 g a 4 °C durante la noche en una ultracentrífuga (ultracentrífuga Optima XPN-100 de Beckman Coulter).

20

3. Se eliminó el sobrenadante asegurándose de que el sedimento (no siempre presente) no se alterara y se esterilizó por filtración con filtros de 0,22 µm.

4. Este medio acondicionado se diluyó con volúmenes iguales de medio de 1640 RPMI que no contiene FBS.

25

5. El medio acondicionado puede almacenarse a 4 °C hasta 4 semanas.

Extracción de lípidos celulares

30

Este protocolo para recoger fosfolípidos del cultivo celular se adaptó del método de Bligh y Dyer (1959) J. Biochem, Physiol. 37(8):911-7. Esencialmente, se mezclaron razones específicas de cloroformo, metanol y agua para garantizar la separación de la fase líquida en función de las interacciones hidrófobas/hidrófilas de las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos presentes en las membranas celulares.

35

1. Se centrifugaron células U937 a una densidad de 3×10^6 durante 5 minutos a 1200 g en un tubo Falcon de 15 ml. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se lavó tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

2. Se añadió 1 ml de PBS al sedimento y se resuspendió.

40

3. Adaptado del método de Bligh y Dyer, este procedimiento debe realizarse en una campana de vacío:

○ Se añadieron 1,25 ml de cloroformo usando una jeringa Hamilton al sedimento celular y se agitó con vórtex.

45

○ Luego se añadieron 2,5 ml de metanol y se agitó la muestra con vórtex.

○ Se añadieron 1,25 ml de cloroformo y se agitó la muestra con vórtex.

○ Finalmente se añadieron 1,25 ml de dH_2O y se agitó la muestra con vórtex.

50

4. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1200 g a 4 °C. Se observaron tres fases distintas: la fase superior que contiene la región metanol/agua, todas las moléculas polares estarán en esta región, una pequeña banda, esto se conoce como disco de proteína y contiene las diversas proteínas que se encuentran en las células, la fase inferior contiene la cloroformo con moléculas no polares tales como lípidos.

55

5. La fase de metanol se eliminó usando una jeringa y luego, usando una jeringa Hamilton, el cloroformo se eliminó cuidadosamente aplicando presión positiva mientras se perforaba el anillo de proteína. Antes de añadir el cloroformo, el tubo de ensayo se limpió a fondo, se dejó secar y luego se pesó con una báscula científica precisa (MC1 Analytic AC 120S). La disolución de cloroformo-lípido se almacenó en un matraz de fondo redondo y se tapó con un tapón de vidrio a 4 °C.

60

6. La mezcla de cloroformo-lípido se sometió a evaporación rotatoria a vacío hasta que se observó una película lipídica delgada. Luego se pesó el tubo de ensayo y se calculó la diferencia entre el tubo de ensayo vacío y el tubo de ensayo que contenía la película lipídica. Esto dio un valor aproximado para la masa de los lípidos extraídos.

65

7. Se preparó DOPE con la misma masa que los lípidos derivados de células y los dos se mezclaron en cloroformo en una razón de 1:1 y luego se sometieron al mismo protocolo de evaporación, hidratación y sonicación descrito en Bligh y Dwyer.

5 Extracción de exosomas

La extracción de exosomas se realizó siguiendo el protocolo de Thery *et al.*, 2006 con un procedimiento de purificación adicional. Era importante usar tantas células como fuera posible para garantizar un alto rendimiento en la extracción de exosomas. Normalmente, 150 ml de sobrenadante de cultivo celular fueron suficientes.

10

1. Se centrifugaron las líneas celulares U937 cultivadas en el medio acondicionado tal como se describió anteriormente durante 2 días a 1500 g en tubos Falcon durante 10 minutos; se recogió el sobrenadante y se descartó el sedimento.

15

2. Se transfirió el sobrenadante a tubos de policarbonato de 38 ml y se centrifugó en una ultracentrífuga a 10.000 g durante 30 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se descartó el sedimento de restos celulares.

20

3. Se centrifugó el sobrenadante a 110.000 g durante 70 minutos a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante con mucho cuidado; debe observarse un pequeño sedimento blanco tenue en el fondo del tubo. A continuación, el sedimento se mezcló con 300 µl de PBS y luego se transfirió a un tubo Eppendorf.

25

4. Se purificaron adicionalmente los exosomas usando el reactivo de aislamiento de exosomas total (ThermoFisher, número de catálogo 4478359). Brevemente, la disolución de exosoma/PBS se mezcló completamente con la mitad del volumen del reactivo del kit y se almacenó en posición vertical durante la noche a 4 °C.

5. A continuación, la disolución se centrifugó durante 1 hora a 10.000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y luego se resuspendió el sedimento de exosomas en 100 µl de PBS y se sonicó para formar liposomas.

30 Producción de núcleo catiónico.

La formación de complejos de lípido/péptido/ácido nucleico requiere la adición del ácido nucleico y el péptido al lípido catiónico en disolución acuosa. Para liposomas catiónicos tales como DOTMA:DOPE, el lípido de núcleo se mezcló completamente en primer lugar con el péptido en disolución acuosa y luego se añadió el ácido nucleico. A continuación, los componentes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar los complejos de núcleo. Las razones en masa de los componentes se dan en la tabla anterior.

35

Aplicación de liposoma de recubrimiento.

Según la invención, el recubrimiento exterior del complejo de administración es aniónico (en su carga neta, puede contener compuestos lipídicos individuales que tengan diversas cargas). Para los ejemplos, se prepararon recubrimientos exteriores que eran aniónicos y también los que eran catiónicos con fines de comparación. En primer lugar, se preparó el liposoma de recubrimiento usando técnicas convencionales de preparación de liposomas (deshidratación, rehidratación y sonicación) y luego se aplicó al núcleo mezclando completamente una disolución acuosa de los complejos de núcleo con los liposomas.

40

45

Ejemplo 1: comparación de estabilidad - turbidez

Se midió la absorbancia de los complejos por triplicado en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de suero (0-50 % v/v) a 500 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Optima con una cantidad correspondiente de suero solo como referencia. Se formaron nanocomplejos con 1 µg de ADN o ARNip, se incubaron a 37 °C y se analizaron en puntos de tiempo regulares durante un periodo de 30 minutos. La turbidez relativa se determinó dividiendo la absorbancia de la muestra entre el valor del tiempo cero en agua.

50

55 Resultados

La Figura 1 muestra los resultados y demuestra que mientras que los liposomas DOTMA/DOPE simples y las partículas de liposomas catiónicos (LPR) de la técnica anterior son inestables durante 30 minutos, las partículas de PRL aniónicas según la invención conservan la estabilidad durante el transcurso del experimento de 30 minutos.

60

Ejemplo 2: comparación de estabilidad - tamaño de partícula

Se llevó a cabo un experimento de comparación de estabilidad durante 7 horas usando partículas LPR de la técnica anterior y complejos de PRL de la invención.

65

Resultados

Tal como puede observarse en la figura 2, las partículas de PRL aniónicas de la invención muestran una estabilidad durante 7 horas que está ausente en las partículas de la técnica anterior.

Ejemplo 3 - comparación de estabilidad - tamaño de partícula

Se llevó a cabo un experimento de comparación de estabilidad durante 4 horas usando diversas partículas de LPR de la invención que tenían composiciones tal como se describieron anteriormente.

Resultados

La figura 3 muestra los resultados y la figura 4 presenta un resumen de los mismos. Puede observarse que cualquier aumento de tamaño es muy pequeño, lo que sugiere una buena estabilidad. Se observa que los complejos que parecen ser menos estables (pero que todavía tienen una buena estabilidad con respecto a las partículas de LPR de la técnica anterior) son aquellos que tienen un nivel bajo (1 %) de lípido pegilado.

Ejemplo 4 - comparación de estabilidad - potencial zeta

El potencial zeta (potencial electrocinético) es una medida de la estabilidad de las dispersiones coloidales. Un valor más alto indica un mayor grado de repulsión electrostática entre las partículas adyacentes. Los valores que tienen una magnitud inferior a 5 (es decir, de desde 0 hasta ± 5) se consideran inestables y propensos a la coagulación y/o floculación. Se considera que los valores con una magnitud superior a 10 tienen un nivel razonable de estabilidad.

Método

El potencial zeta se midió tal como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 5. Puede observarse que para todas las muestras de partículas de la invención, las partículas tienen un potencial zeta que sugiere estabilidad en lugar de coagulación/floculación.

Ejemplo 5 - eficiencia de transfección

Se transfectaron células de neuroblastoma cultivadas con ARNip de MYCN usando partículas de la técnica anterior (DD, AT1, AT2, GK24, AT3) o de la invención (LPRL1 a LPRL7). Se ha medido el porcentaje de células que expresan ARNm de MYCN y los resultados se muestran en la figura 6 y (por duplicado) en la figura 7. Puede observarse que los complejos no virales de la invención efectúan con éxito la transfección.

Ejemplo 6 - ensayo de apoptosis

Este experimento ilustra cómo la rápida expansión de las células de neuroblastoma que son impulsadas a expandirse rápidamente por el oncogén MYCN puede llevarse a la apoptosis mediante el silenciamiento génico de MYCN mediante el uso del ARNip de MYCN del ejemplo 5. Después de la transfección con el constructo de ARNip de MYCN en diversos complejos de transfección, las células se suspendieron en disolución de yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. La figura 8 muestra los histogramas del citómetro de flujo contenidos. La proporción de células que mostraban niveles sub-G1 de ADN se midió aplicando la ventana indicada a los histogramas. La figura 8a muestra los resultados para complejos catiónicos no virales de una sola capa de la técnica anterior (complejos "LPR"). Puede observarse que el 24,5 % de las células tienen ADN sub-G1 indicativo de apoptosis. La figura 8b muestra los resultados de los complejos aniónicos de una sola capa de la técnica anterior (complejo "PRL"). Puede observarse que el 37,3 % de las células tienen ADN sub-G1 indicativo de apoptosis. La figura 8c muestra los resultados de los complejos aniónicos de doble capa de la invención (complejos "LPRL"). Puede observarse que el 57,6 % de las células tienen ADN sub-G1 indicativo de apoptosis. Esto es evidencia de una eficiencia de transfección superior de los complejos de la invención en comparación con la técnica anterior.

Ejemplo 7 - complejos en el moco de fibrosis quística

En los pacientes con fibrosis quística, existe un desafío para lograr que cualquier vector de terapia génica llegue intacto a las células diana debido a la acumulación de moco extracelular. Este experimento demuestra que los complejos de la invención pueden hacer frente a ese desafío. Se llevó a cabo un ensayo de penetración de RTN en moco Transwell en placas de 24 pocillos con Transwell (insertos de membrana de poliéster de 6,5 mm y 3,0 μ m de poro, Corning, RU) y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C. Se añadió tampón Tris a cada pocillo (disolución receptora) y el Transwell se colocó encima del tampón. Se añadió encima 1 μ l de moco de CF o no

de CF (normal) (Epithelix Sari, Ginebra, Suiza) y se esparció por cada Transwell. La placa se incubó durante 30 minutos para equilibrar el moco. Se prepararon RTN de ARNip de 140 ng/μl y se añadieron 3 ul a cada Transwell. Después de 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, se recogieron 100 μl del tampón Tris y se pipetearon en una placa de 96 pocillos. El ARNip se midió en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. La penetración acumulativa de RTN a través del moco se calculó y representó gráficamente en la figura 9. Puede observarse que los complejos de la invención muestran una buena penetración del moco de CF.

Ejemplo 8 - datos de estabilidad

Las figuras 10 y 11 muestran datos de estabilidad tal como se mide por cambios en la turbidez, medidos tal como se describe en el ejemplo 1 y llevados a cabo en suero al 50 %. Los complejos aniónicos y los complejos aniónicos de LPRL de la invención muestran una agregación asociada a la turbidez reducida que los complejos catiónicos de la técnica anterior en suero al 50 %. La figura 10 muestra datos de complejos de doble capa que contienen ADN de la invención, mientras que la figura 11 muestra datos de complejos de doble capa que contienen ARNip de la invención. Puede observarse que ambas clases de complejos son estables.

Ejemplo 9 - transfección con proteína indicadora GFP

Se transfectaron las líneas celulares ME27 con un constructo de ácido nucleico-proteína indicadora GFP (pEGFP de Clontech™ bajo un promotor de CMV) usando complejos de la técnica anterior o de la invención. Los constructos usados son "D-D" (DOTMA/DOPE), AT1 y LPDL1 a LPDL6 de cada par en la figura 12 que muestra una vista de contraste de fase de las células y la segunda fotografía muestra la fluorescencia de las células. El número de células fluorescentes y su intensidad de fluorescencia (la intensidad de fluorescencia media se cuantificó y se muestra en la figura 13). Esto muestra que el porcentaje de células positivas fue al menos tan alto usando el complejo de transfección de la invención en comparación con las de la técnica anterior y, con la excepción de la réplica de "LPDL5", la intensidad de fluorescencia fue mayor para los complejos de la invención. La figura 13 muestra datos de citometría de flujo de las mismas transfecciones que se muestran en la figura 12.

Ejemplo 10 – direccionamiento intravenoso a tumores

Se usaron ratones NSG que se sometieron a injerto con células Kelly como modelos de xenoinjerto. La lectura fue si los complejos se dirigieron selectivamente a las células tumorales. Se dirigieron a los tumores los complejos aniónicos (RTN) de la invención o, para comparación, los complejos catiónicos de la técnica anterior. Los complejos que contenían el péptido ME27 dirigido a integrina y la formulación catiónica contenían lípido DOTMA/DOPE y PEG2000 al 1 % (es decir, AT1): péptido ME27: ARNip marcado con dy677; la formulación aniónica contenía un núcleo de DOTMA/DOPE: péptido ME27: ARNip marcado con dy677 y luego tenía lípido aniónico en la capa exterior.

La figura 14 muestra (en verde en el original) la transfección dirigida de las células Kelly.

Ejemplo 11 - análisis de citometría de flujo de la eficiencia de transfección

La especificidad de cada nanocomplejo se midió comparando las eficiencias de transfección de nanocomplejos de direccionamiento y no direccionamiento en 3 líneas celulares. El panel A de la figura 15 muestra los datos de citometría de flujo para N2a. En general, D:D tuvo la eficiencia general más alta en comparación con los otros nanocomplejos, sin embargo, también fue el menos específico ya que su complejo no de direccionamiento transfectó más del 45 %. Las eficiencias de transfección para todos los demás nanocomplejos que contienen exosomas o aniónicos se mejoraron en gran medida por el resto de direccionamiento. El panel B muestra resultados similares para la línea celular H441. Sin embargo, para D:D la presencia del péptido de direccionamiento fue más significativa que en N2a. De hecho, el lipoplejo mostró un mejor rendimiento que el complejo de no direccionamiento. Los exosomas que tenían la eficiencia de transfección segunda más alta en N2a fueron ligeramente menos eficientes que el cmd-L:D catiónico, el péptido de direccionamiento fue ligeramente menos significativo en H441 con exosomas. El panel C muestra los datos de citometría de flujo para células 16-HBE. Los resultados reflejan los de N2a, nuevamente D:D tuvo la transfección más alta y fue el menos específico, mostrando los exosomas la eficiencia de transfección segunda más alta. En las tres líneas celulares, los nanocomplejos aniónicos tenían una mayor especificidad que los nanocomplejos catiónicos. De los liposomas aniónicos, los exosomas mostraron la menor especificidad en todas las líneas celulares.

Figura 15. Datos de citometría de flujo que comparan la especificidad de los diferentes nanocomplejos en A) células N2a, B) células H441 y C) células 16-HBE. Los resultados muestran la comparación entre complejos de liposoma: ADN, complejos no de direccionamiento y complejos de direccionamiento. D:D (DOTMA: DOPE), CMD-L (liposoma derivado de la membrana celular), CMD-L:D (liposoma derivado de la membrana celular: DOPE). (± desviación est., n = 3). Los valores de probabilidad $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ y $p \leq 0,001$ se asignaron como *, **, y ***, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Complejo de administración no viral, que comprende:

5 A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende:

(i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula, y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular,

10

(ii) un ácido nucleico, y

(iii) un lípido catiónico,

15

B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas.

20

2. Complejo de administración no viral según la reivindicación 1, en el que al menos el 80 % en peso del recubrimiento aniónico se ha extraído previamente de la membrana plasmática de las células o exosomas del sujeto.

25

3. Complejo de administración no viral según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el recubrimiento aniónico comprende lípidos pegilados.

25

4. Complejo de administración no viral según la reivindicación 3, en el que los lípidos pegilados son lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células o exosomas del sujeto que se derivatizaron posteriormente con PEG.

30

5. Complejo de administración no viral según cualquier reivindicación anterior, en el que el ácido nucleico es un ARN de interferencia pequeño que regula por disminución la expresión de un gen que se regula por incremento de manera diferencial en células tumorales.

35

6. Complejo de administración no viral según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico codifica para el regulador de conductancia transmembranario de fibrosis quística (CFTR).

40

7. Complejo de administración no viral según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el componente de unión a la superficie celular se une a células epiteliales de pulmón.

40

8. Complejo de administración no viral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la razón de núcleo catiónico A con respecto a recubrimiento aniónico B está entre 5 y 30, opcionalmente entre 10 y 25.

45

9. Composición farmacéutica que comprende el complejo de administración no viral según una de las reivindicaciones 1 a 8, mezclado o junto con un portador farmacéuticamente adecuado.

45

10. Método para elaborar un complejo de administración no viral, que comprende:

A, elaborar un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende:

50

(i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula, y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular,

55

(ii) un ácido nucleico, y

(iii) un lípido catiónico,

60

B, añadir un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células del sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas.

65

11. Complejo de administración no viral según una de las reivindicaciones 1 a 8, o composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección provocada en un sujeto por un defecto y/o una deficiencia en un gen, o para inmunización terapéutica o profiláctica, o para terapia antisentido o ARNi.

12. Complejo de administración no viral según una de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8, o composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer en un sujeto.

5 13. Complejo de administración no viral según una de las reivindicaciones 1 a 4, o 6 a 8 o composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de fibrosis quística en un sujeto.

10 14. Complejo de administración no viral para su uso según la reivindicación 13, en el que el recubrimiento aniónico comprende al menos el 80 % en peso que se ha extraído de las células o exosomas del sujeto y en el que al menos el 1 % en peso consiste en lípidos pegilados.

15. Complejo de administración no viral para su uso como medicamento, que comprende:

A, un núcleo catiónico que es una nanopartícula que comprende:

15 (i) un péptido de fórmula A-B-C en la que A es un componente de unión a ácido nucleico policationico, B es un elemento espaciador que es susceptible de escisión dentro de una célula, y C es un componente de unión al receptor de la superficie celular,

20 (ii) un ácido nucleico, y

(iii) un lípido catiónico,

25 B, un recubrimiento aniónico que es un liposoma que rodea el núcleo catiónico y que comprende lípidos extraídos previamente de una membrana plasmática de las células de un sujeto, opcionalmente glóbulos rojos o exosomas, opcionalmente en el que el complejo de administración no viral tiene una o más de las características adicionales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

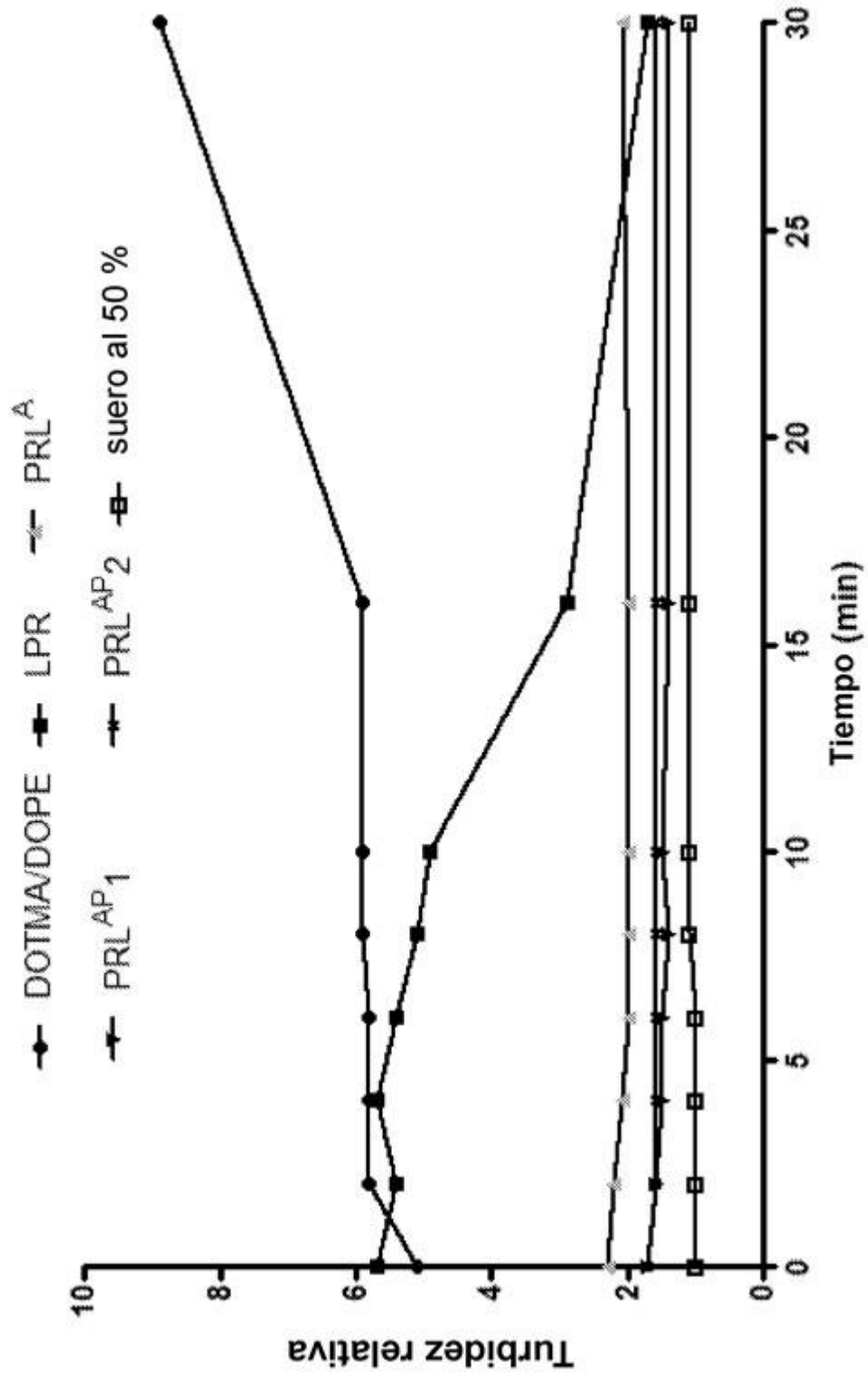


Fig. 1

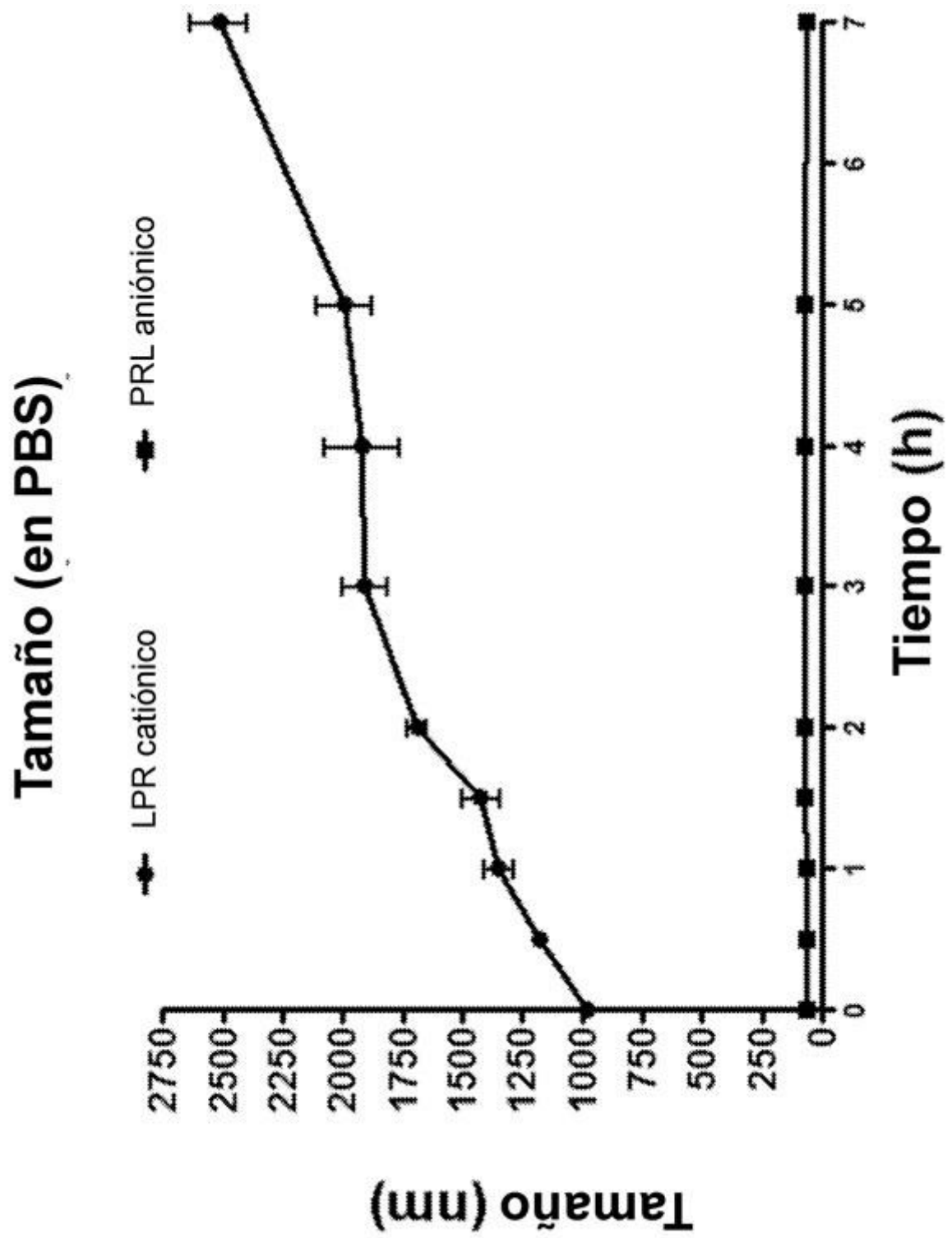


Fig 2.

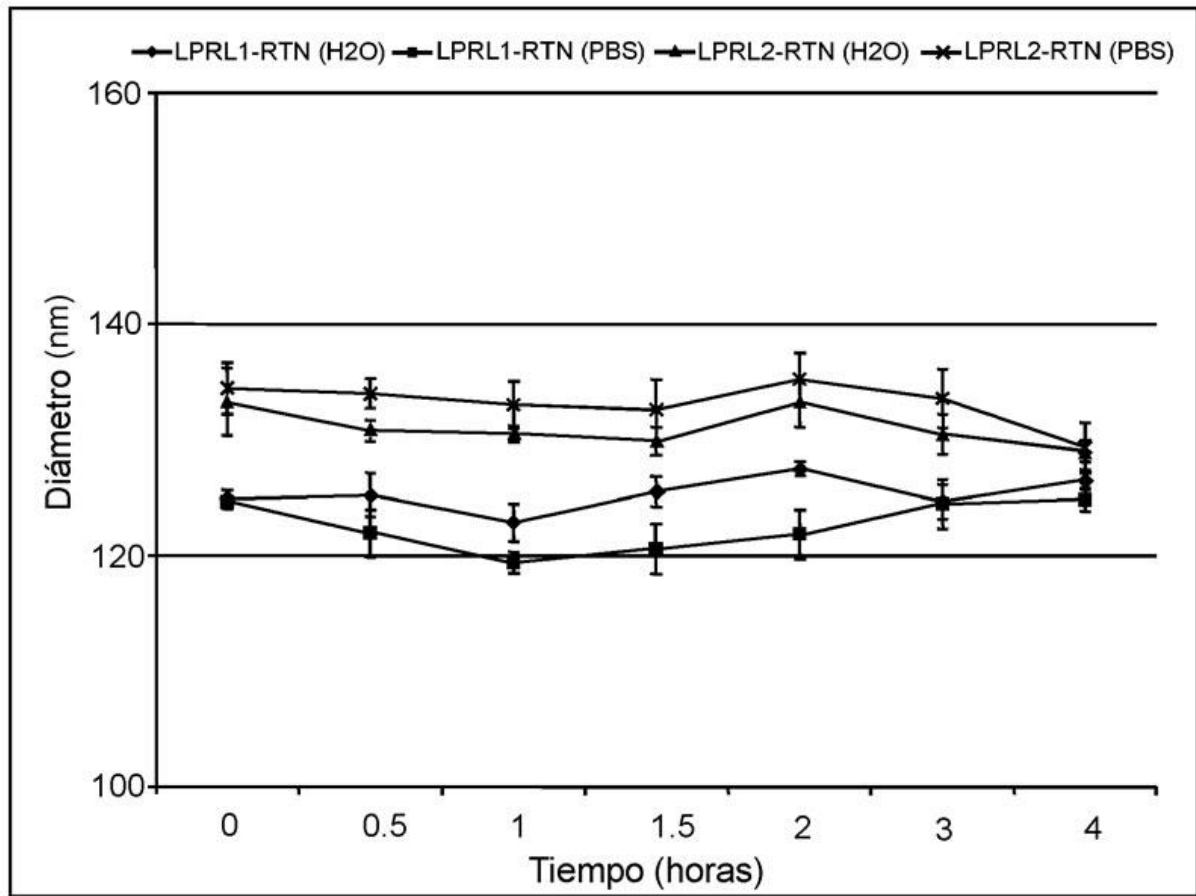


FIG. 3a

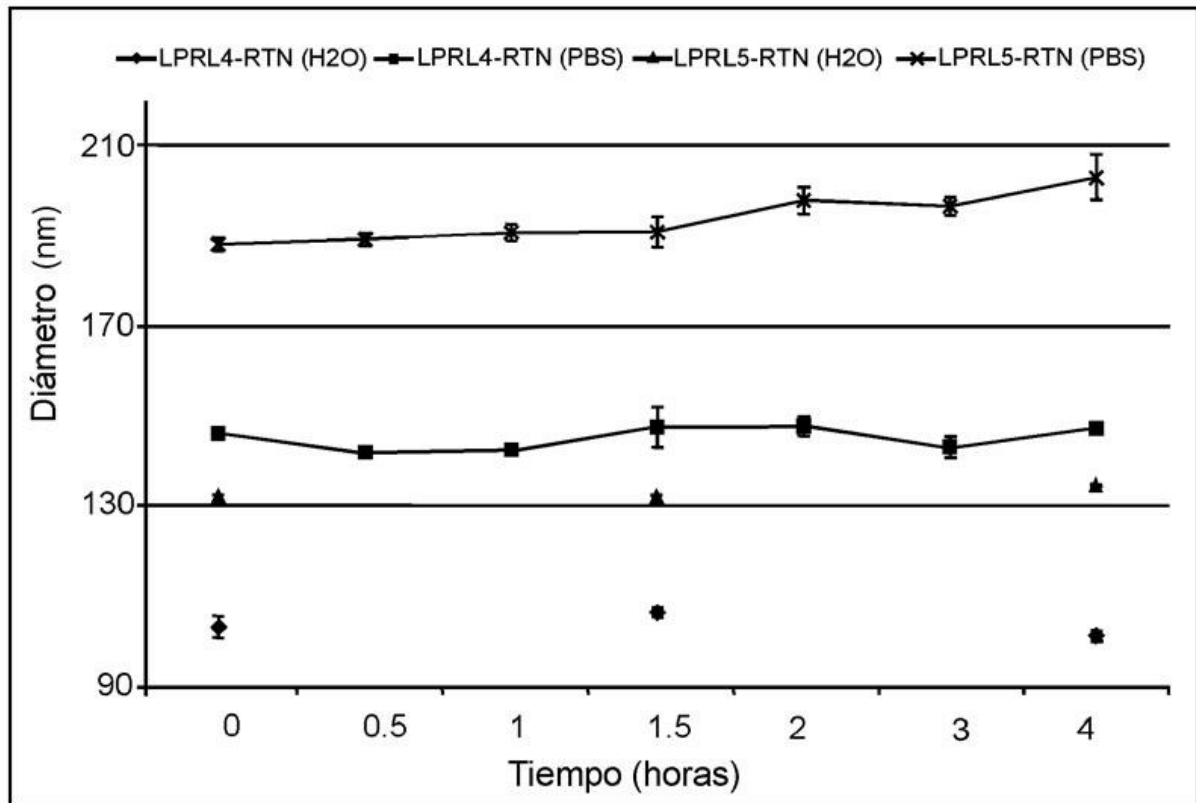


FIG. 3b

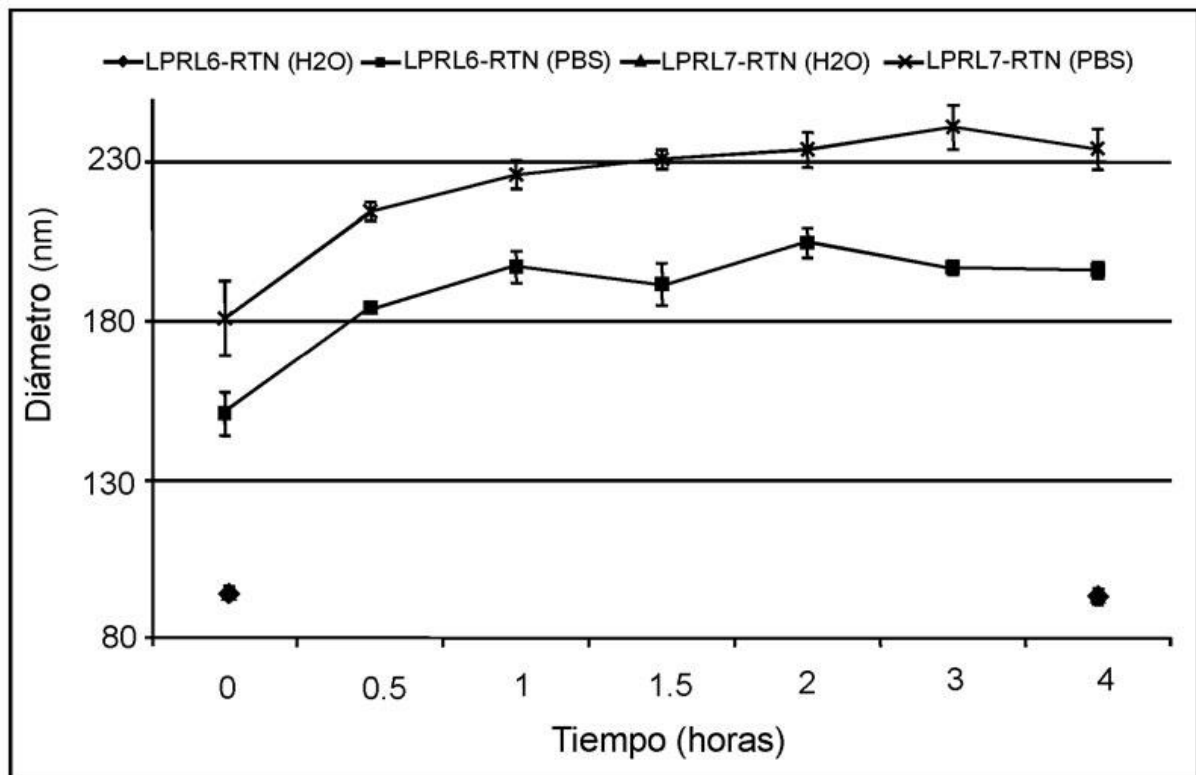


FIG. 3c

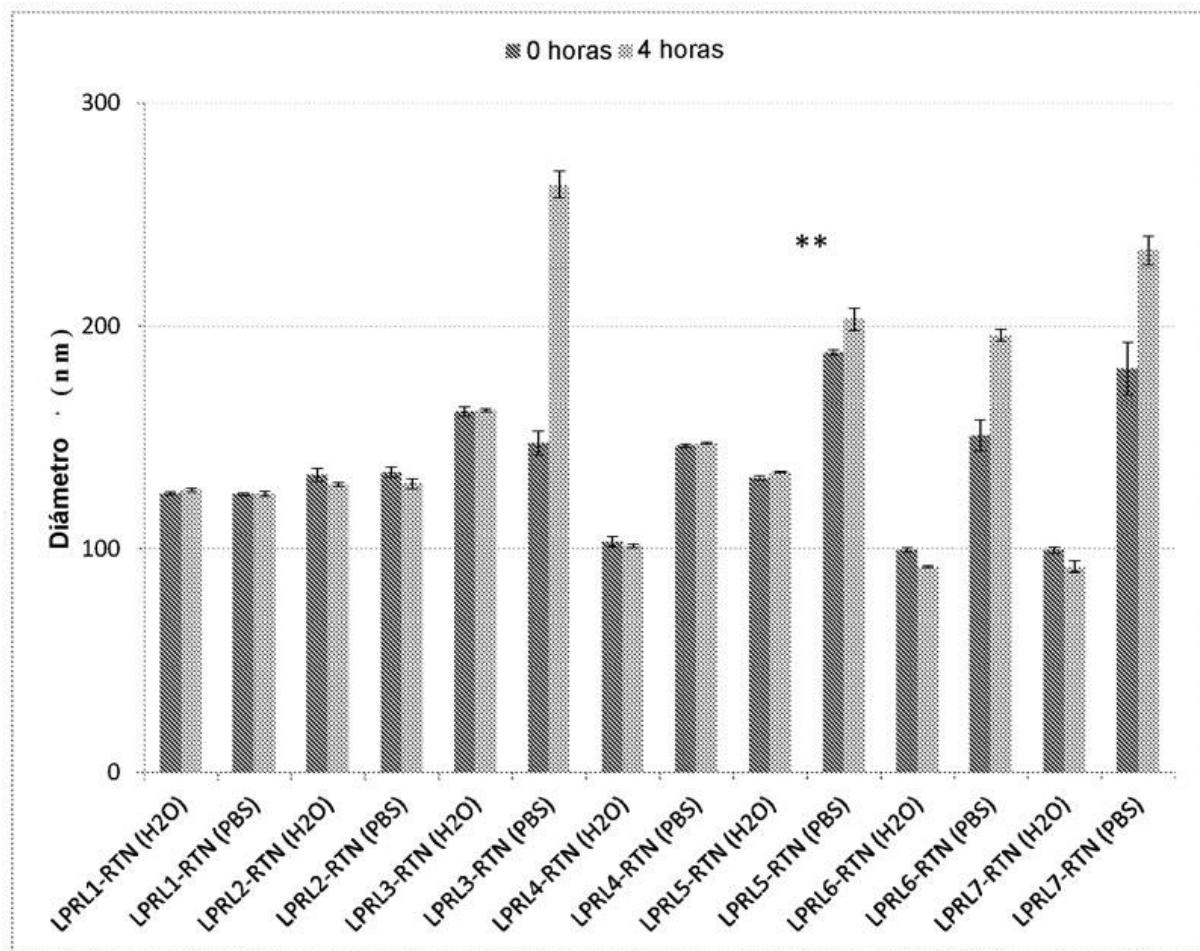


Fig. 4

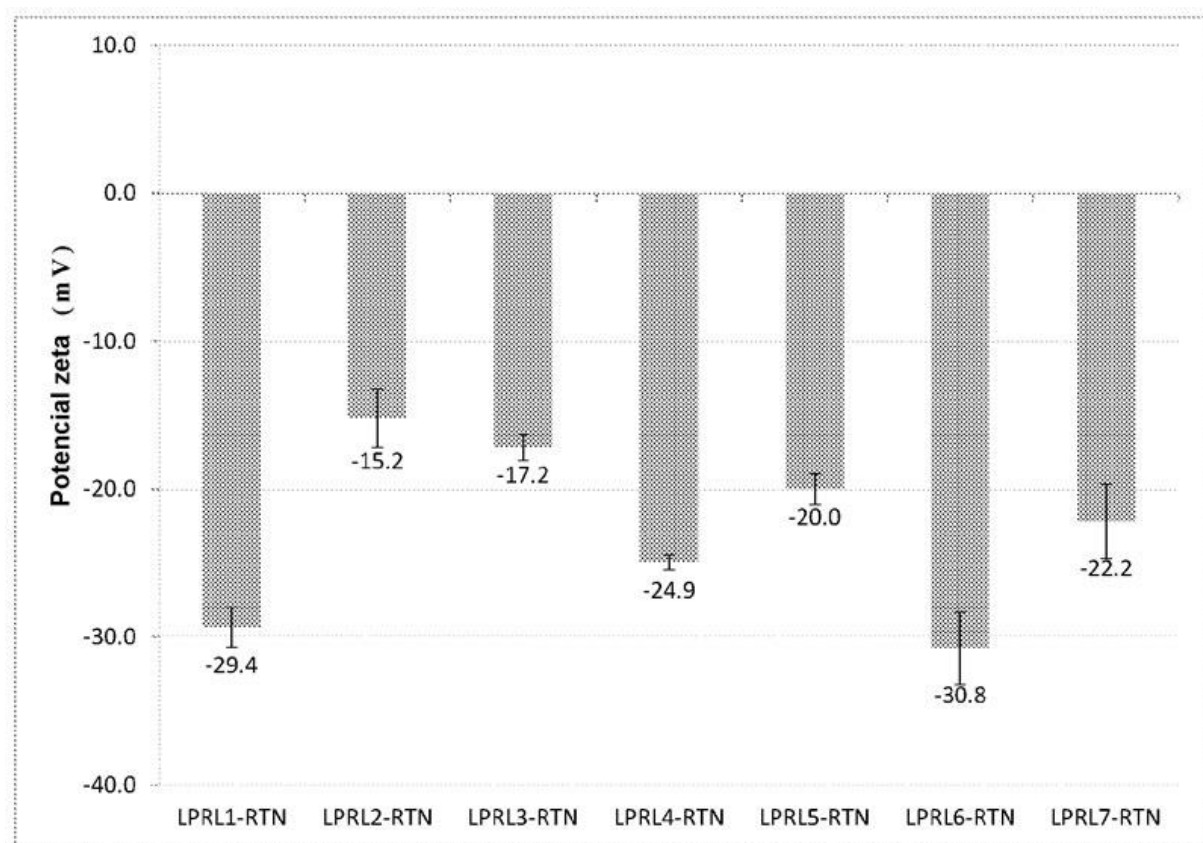


Fig. 5

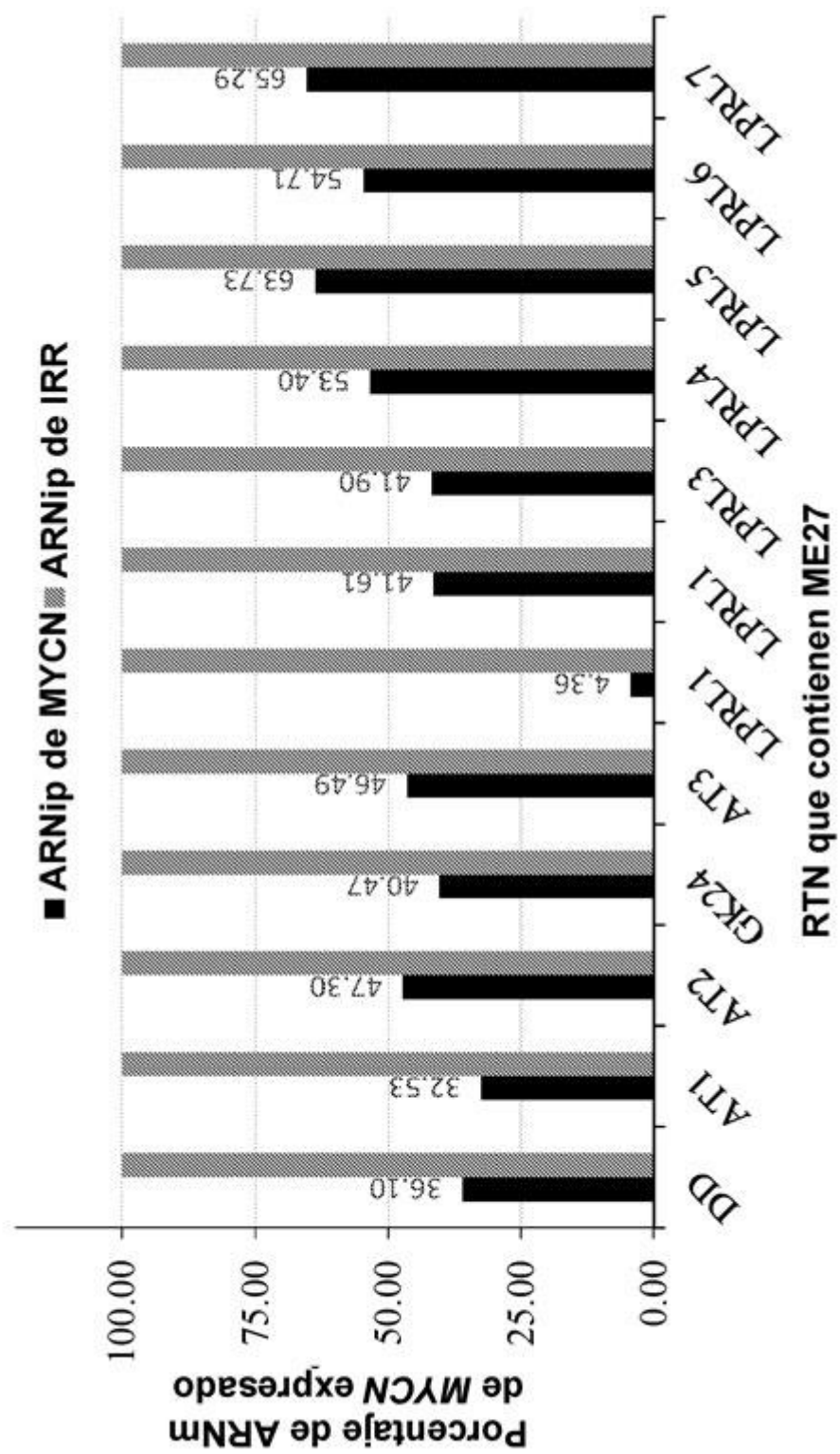


Fig. 6

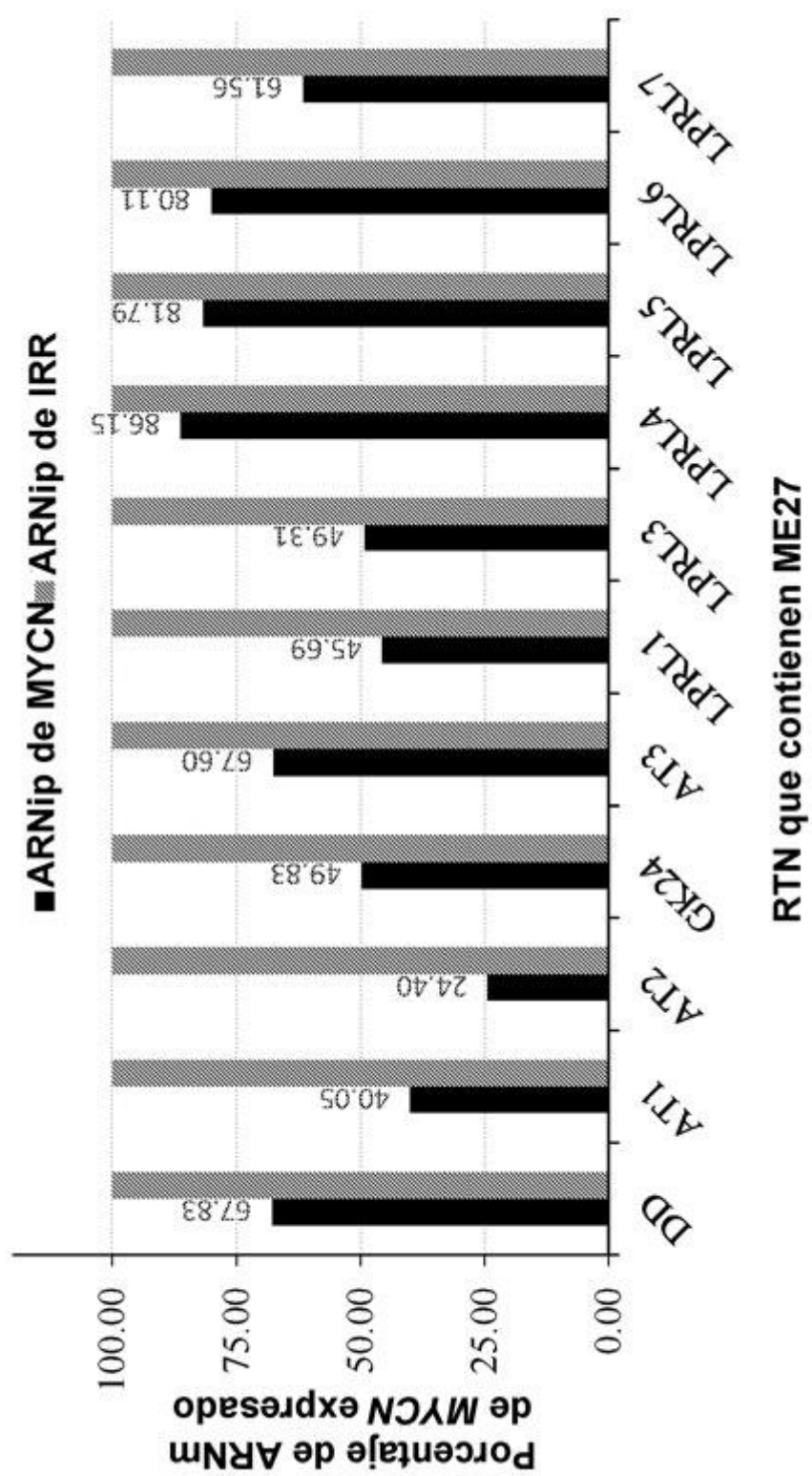


Fig. 7

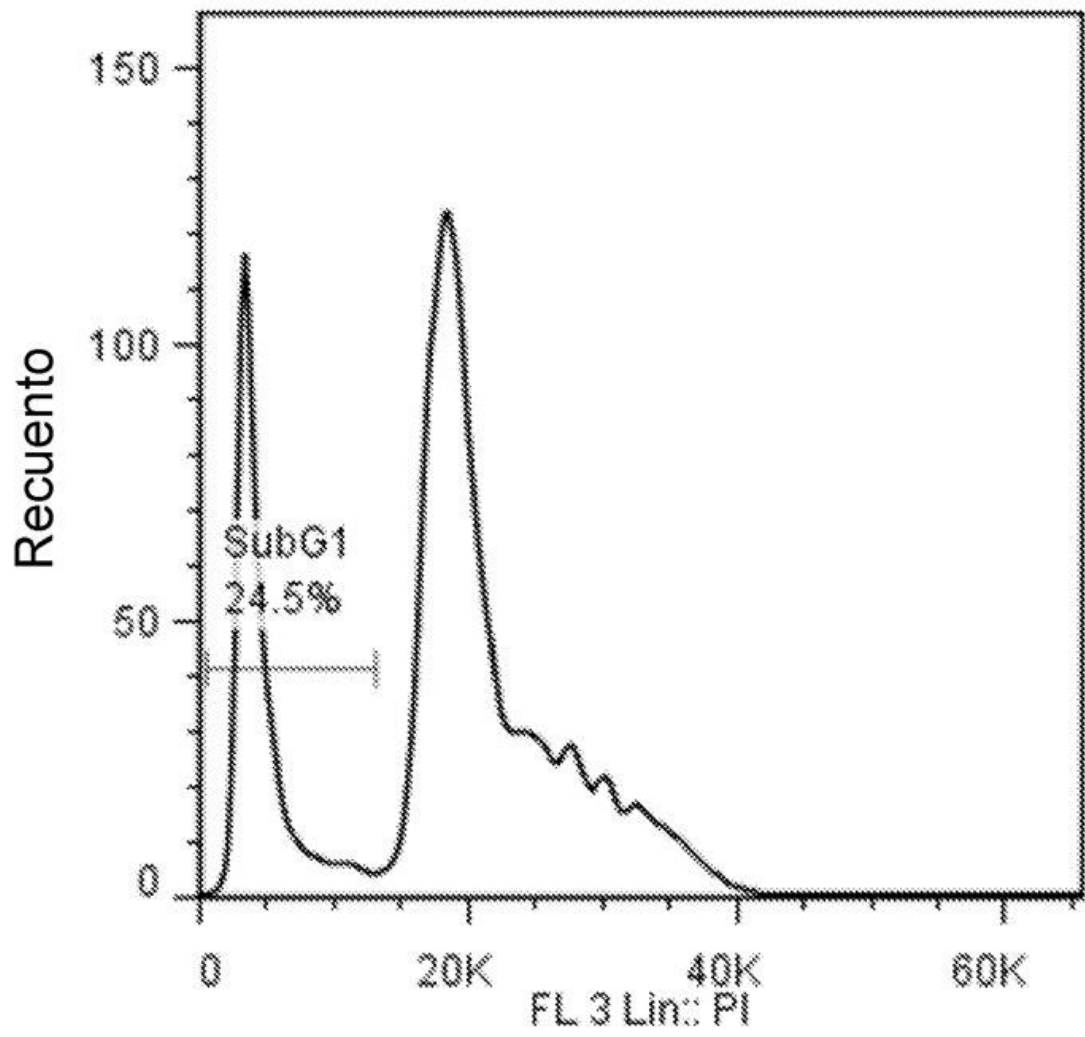


Fig. 8a.

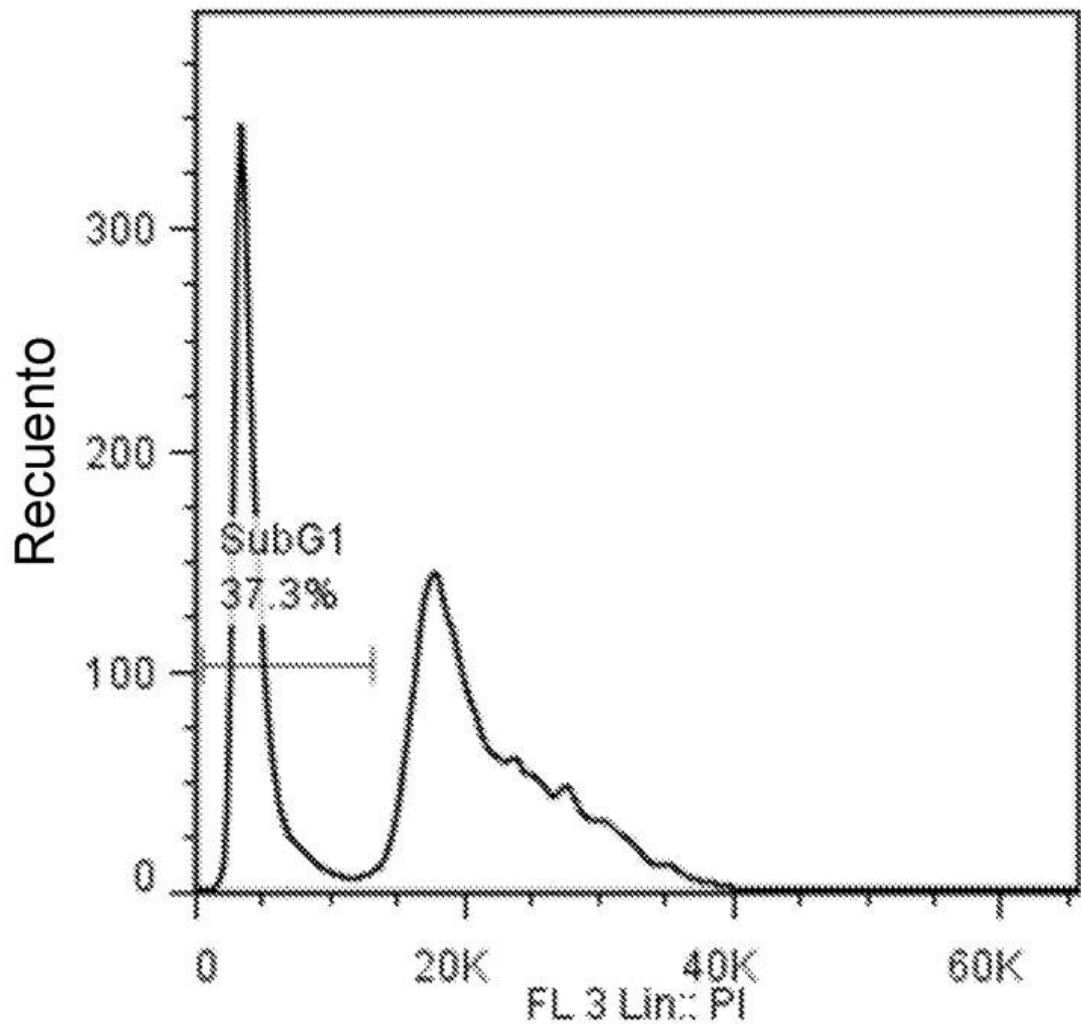


Fig. 8b.

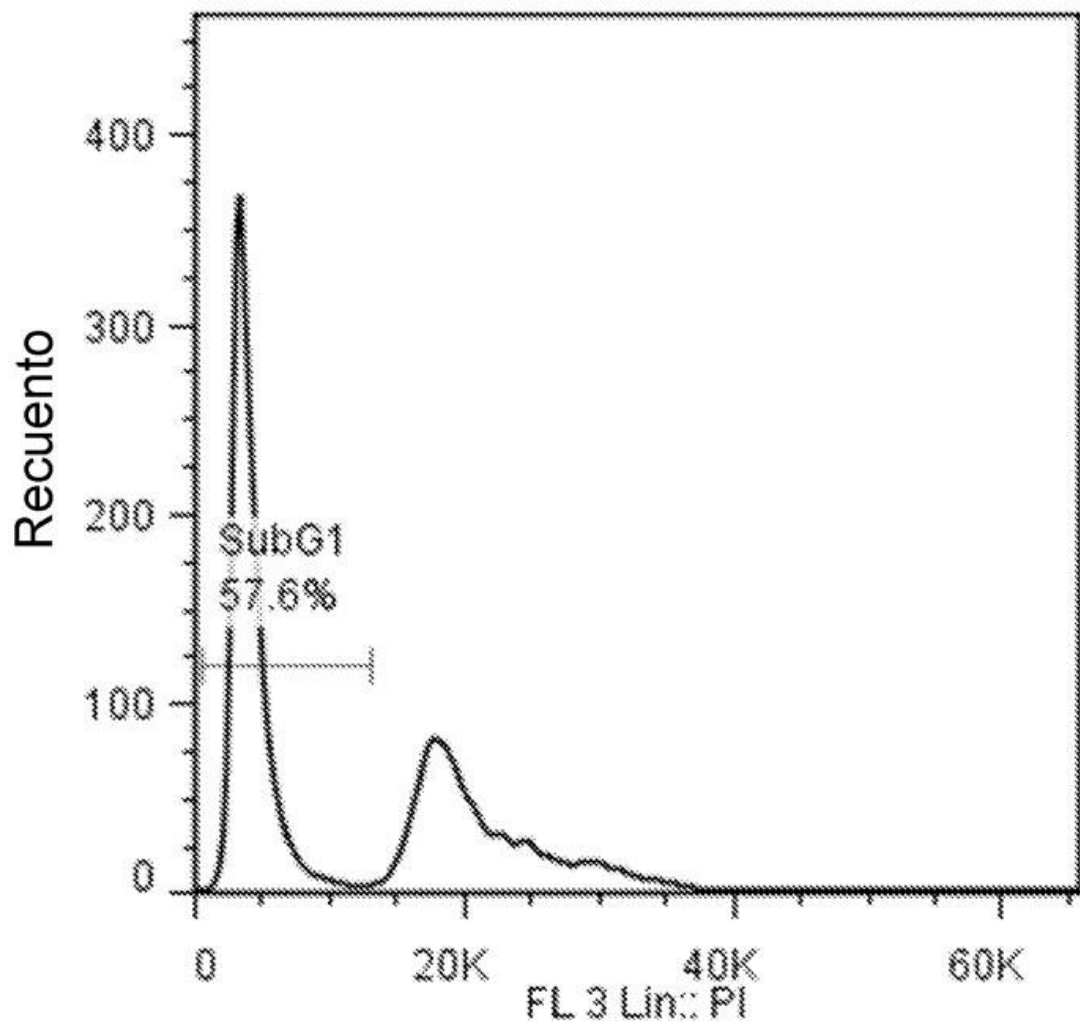


Fig. 8c.

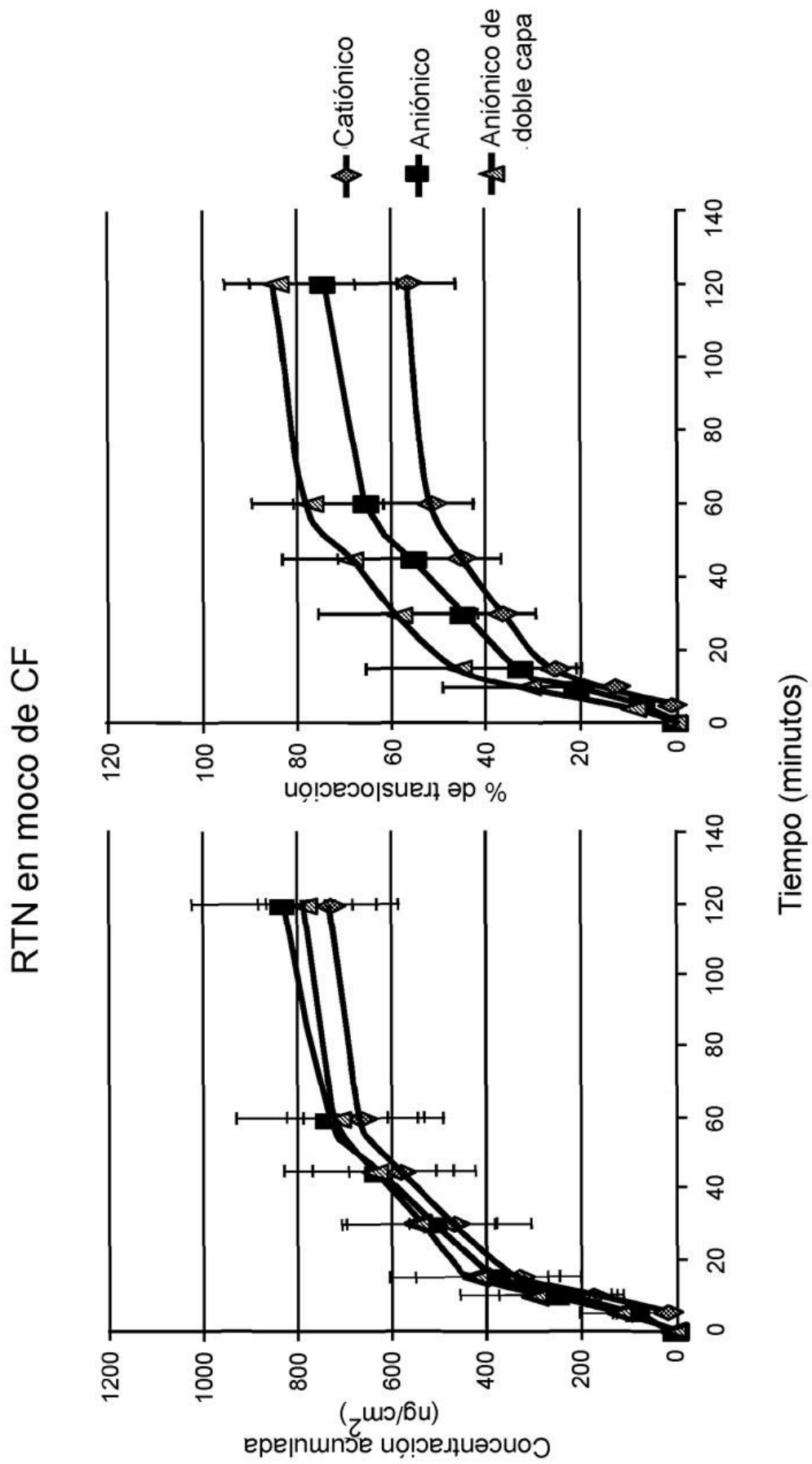


FIG. 9

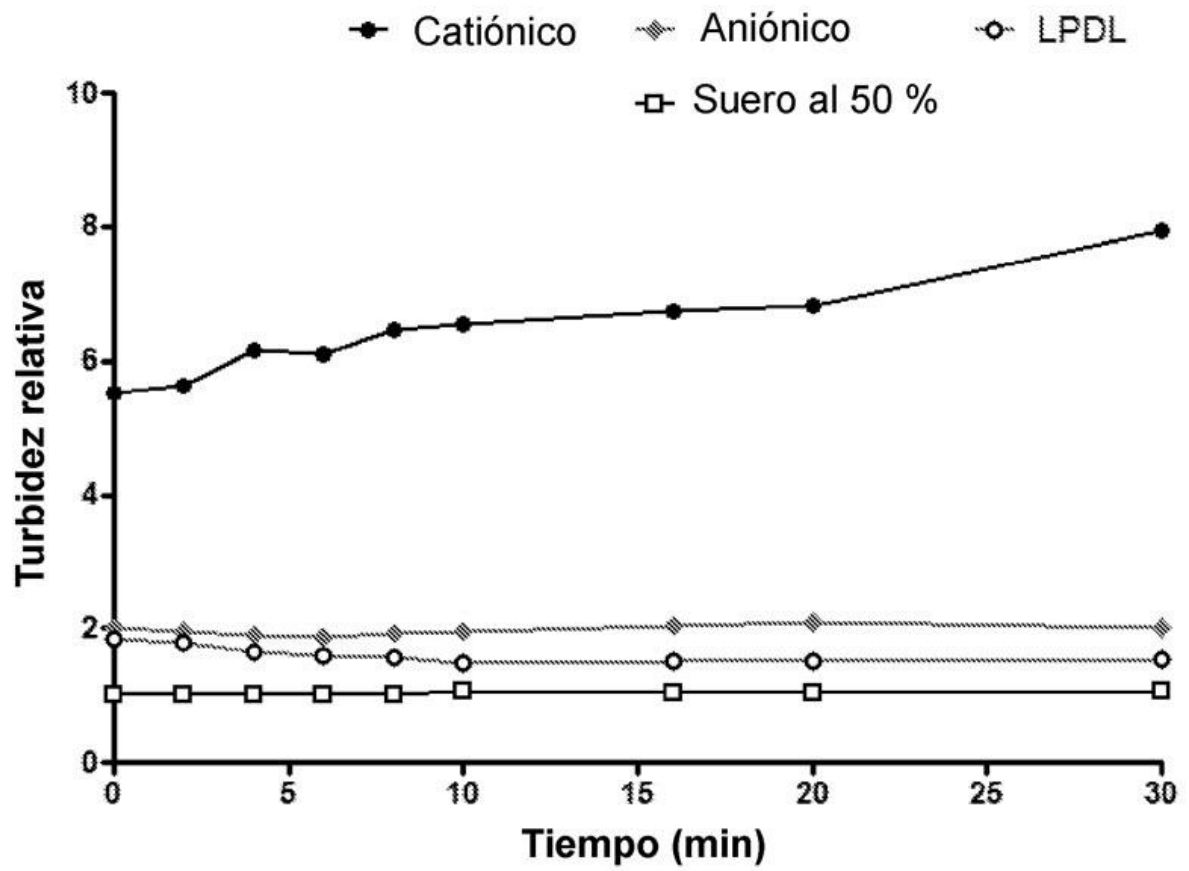


Fig. 10.

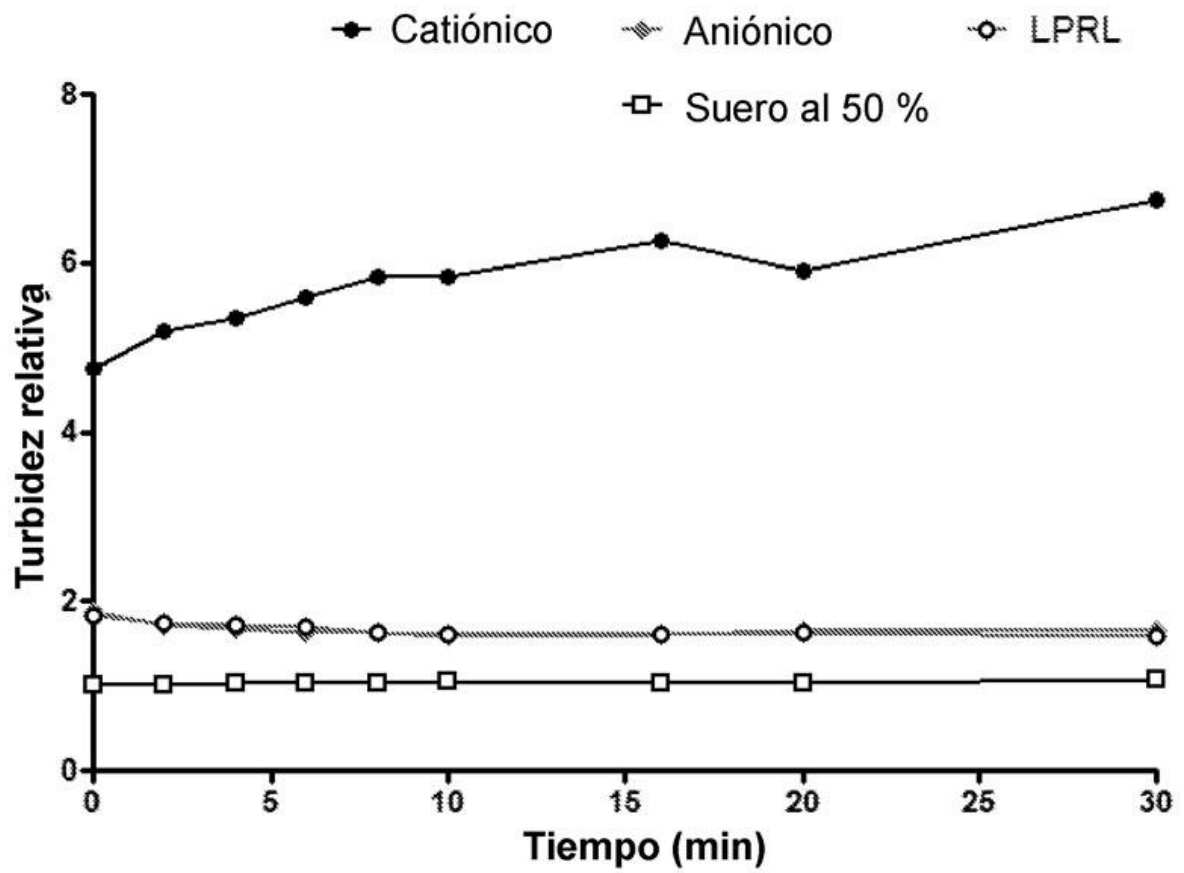


Fig. 11

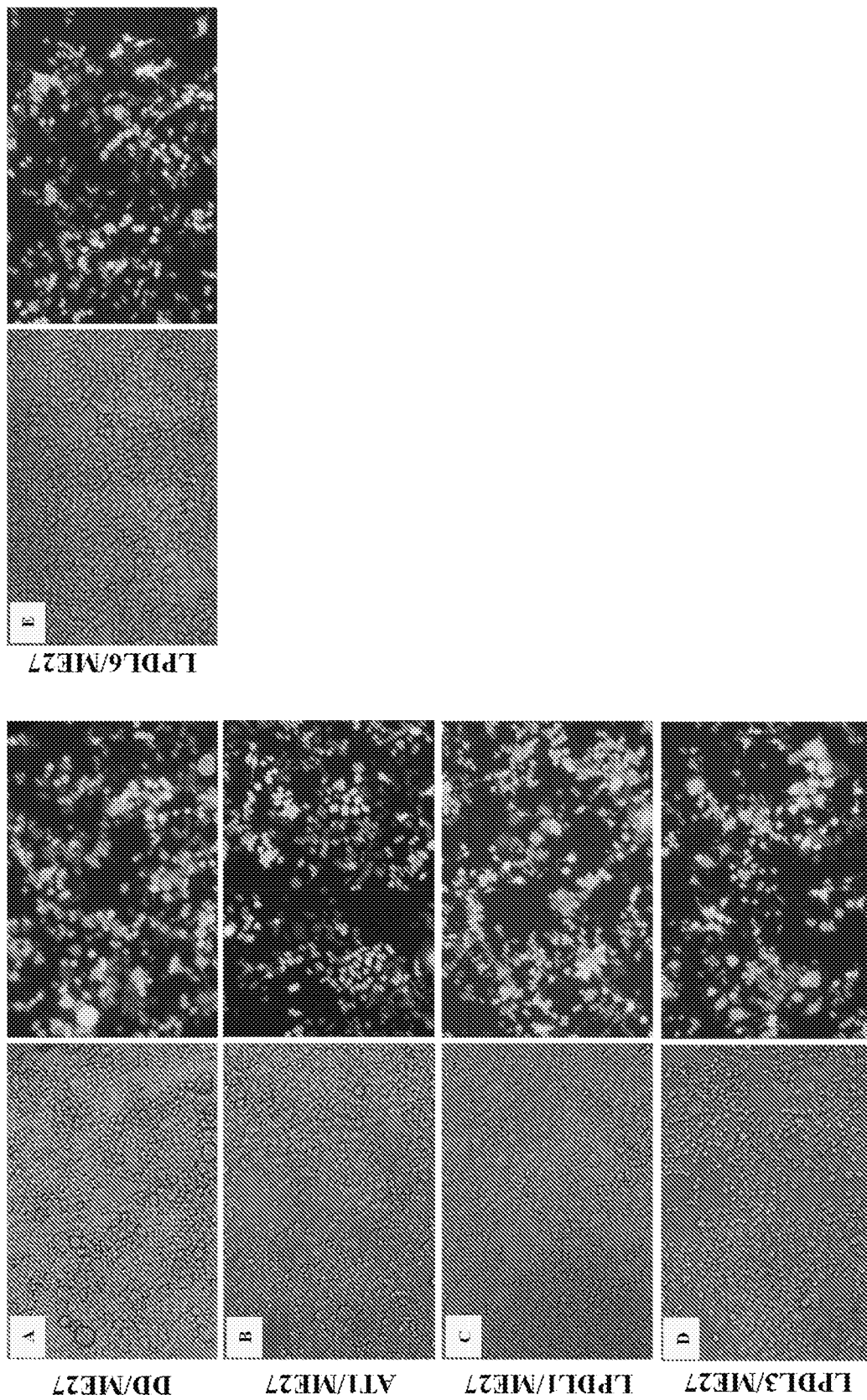


Fig. 12.

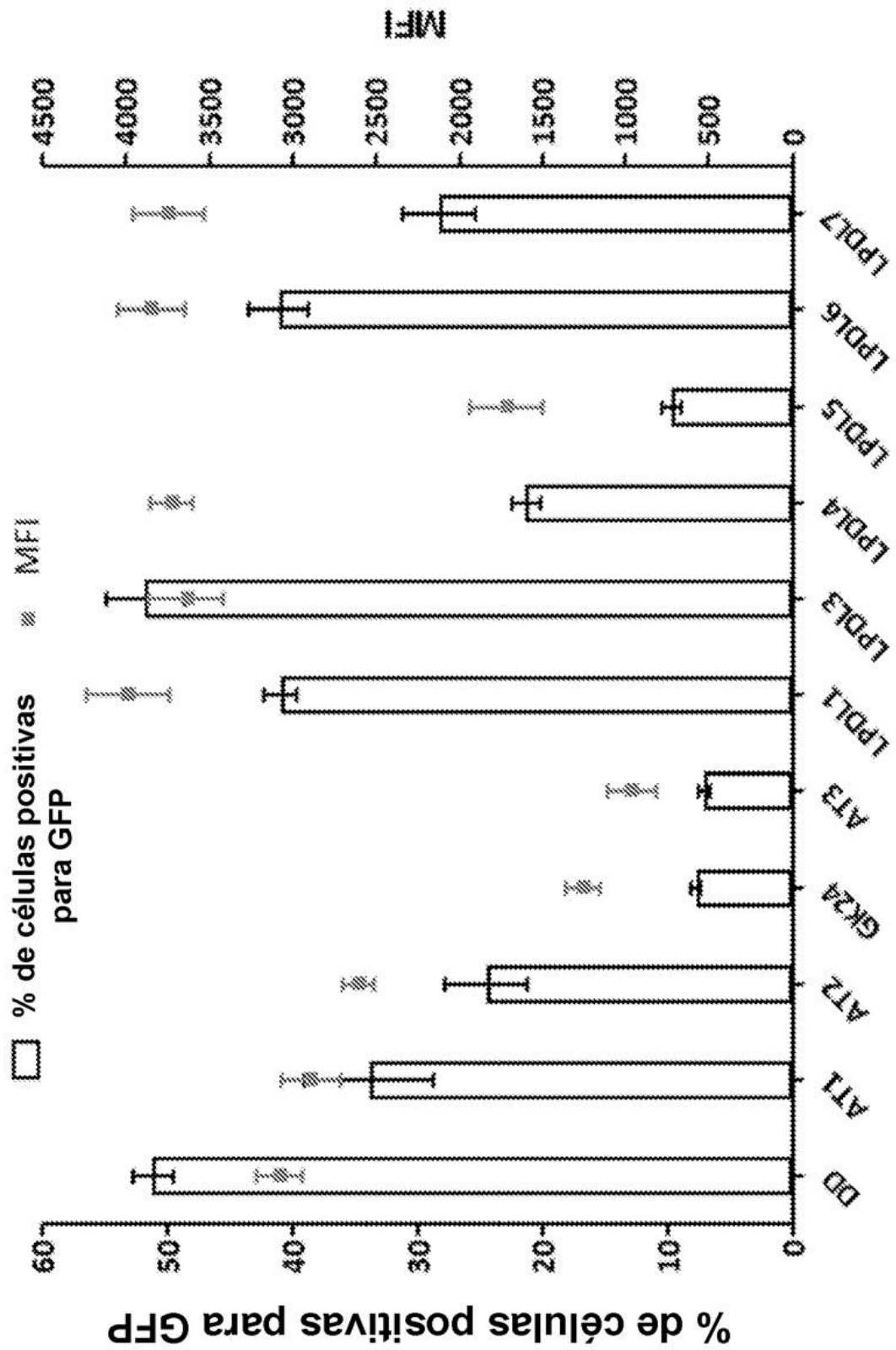


Fig. 13.

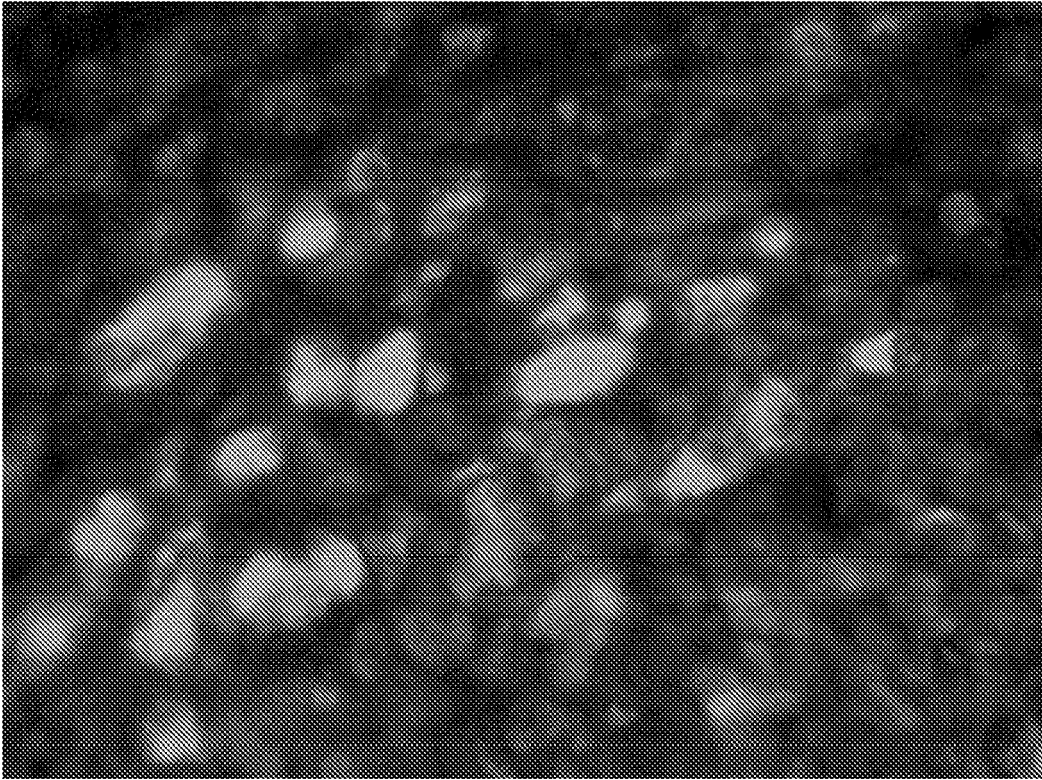


Fig. 14a.

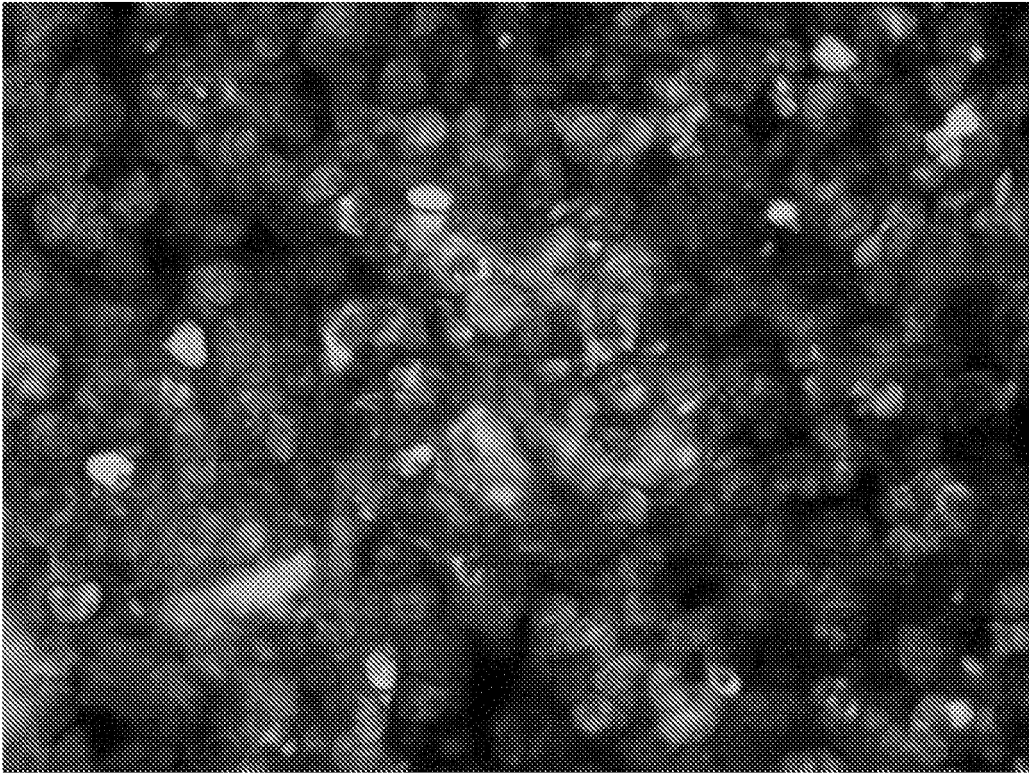


Fig. 14b.

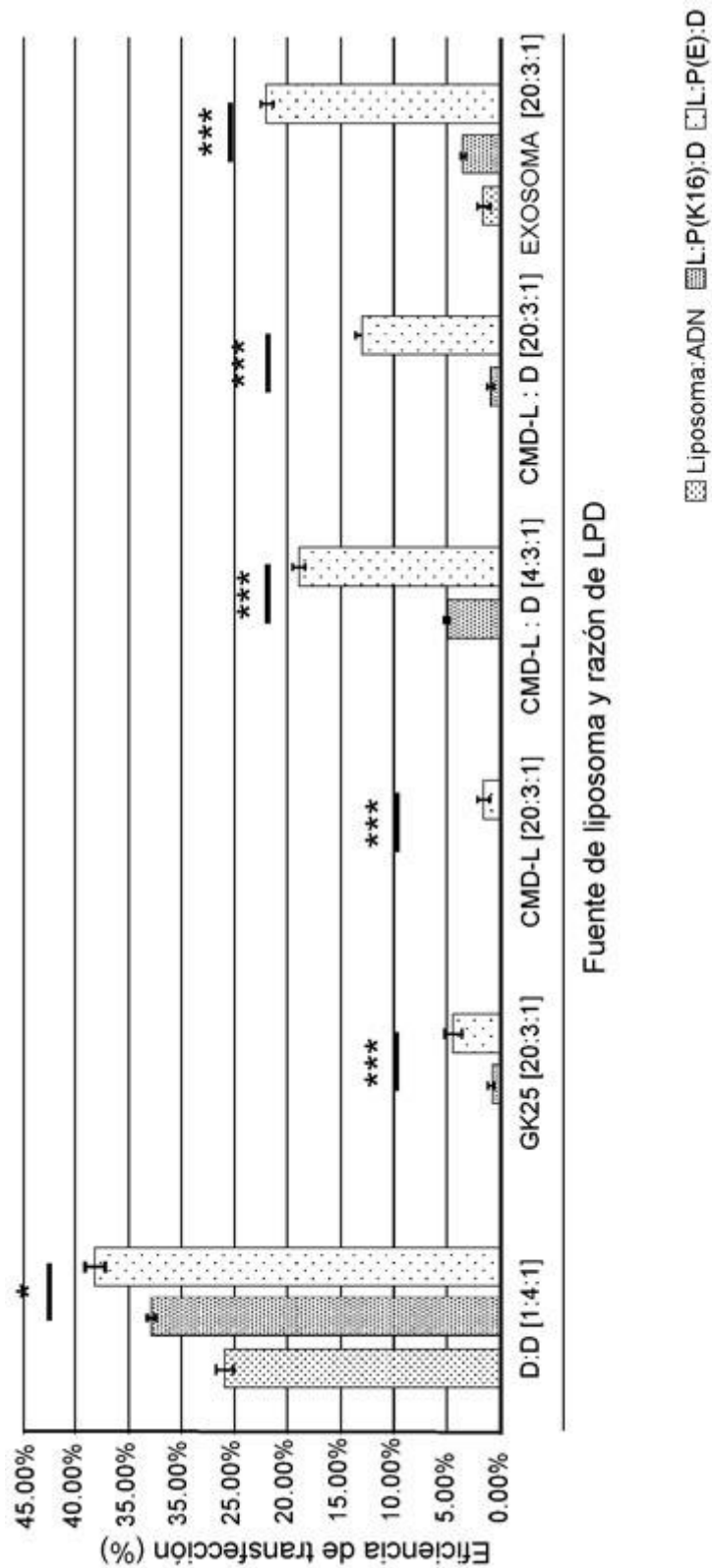


FIG. 15a

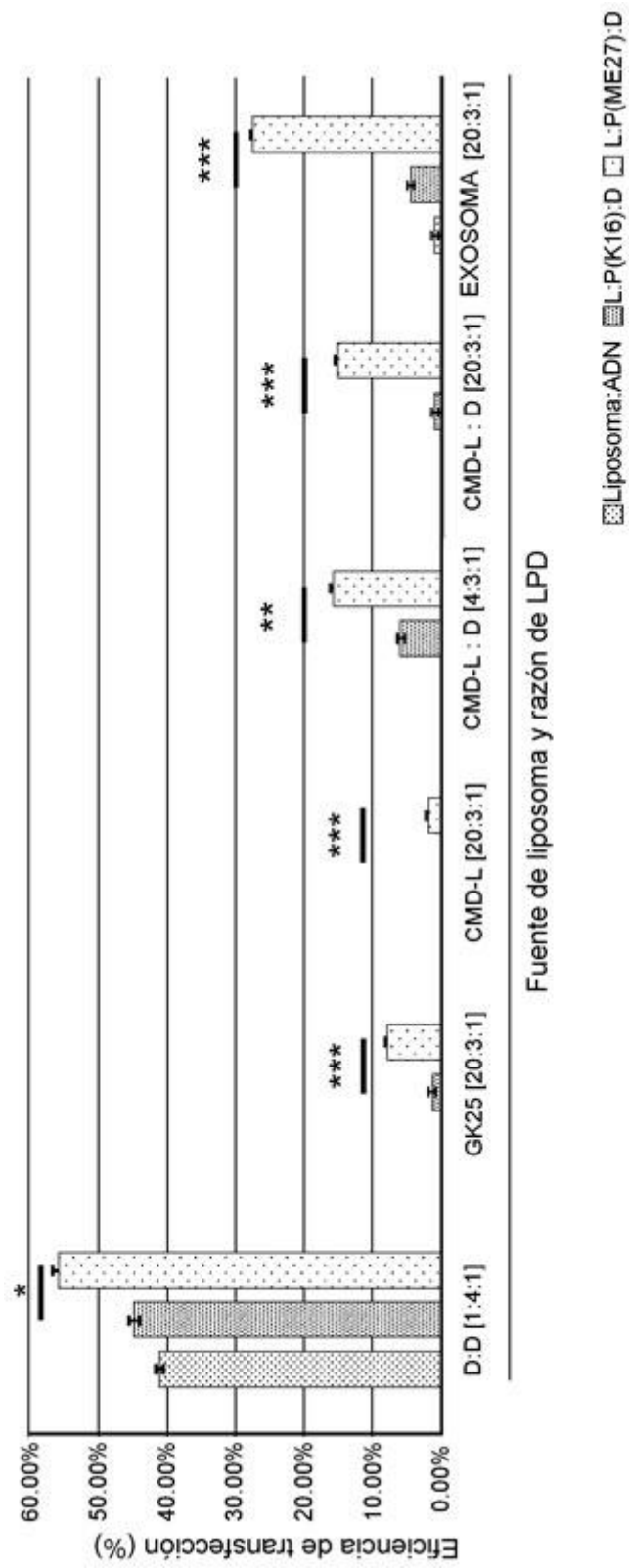


FIG. 15b

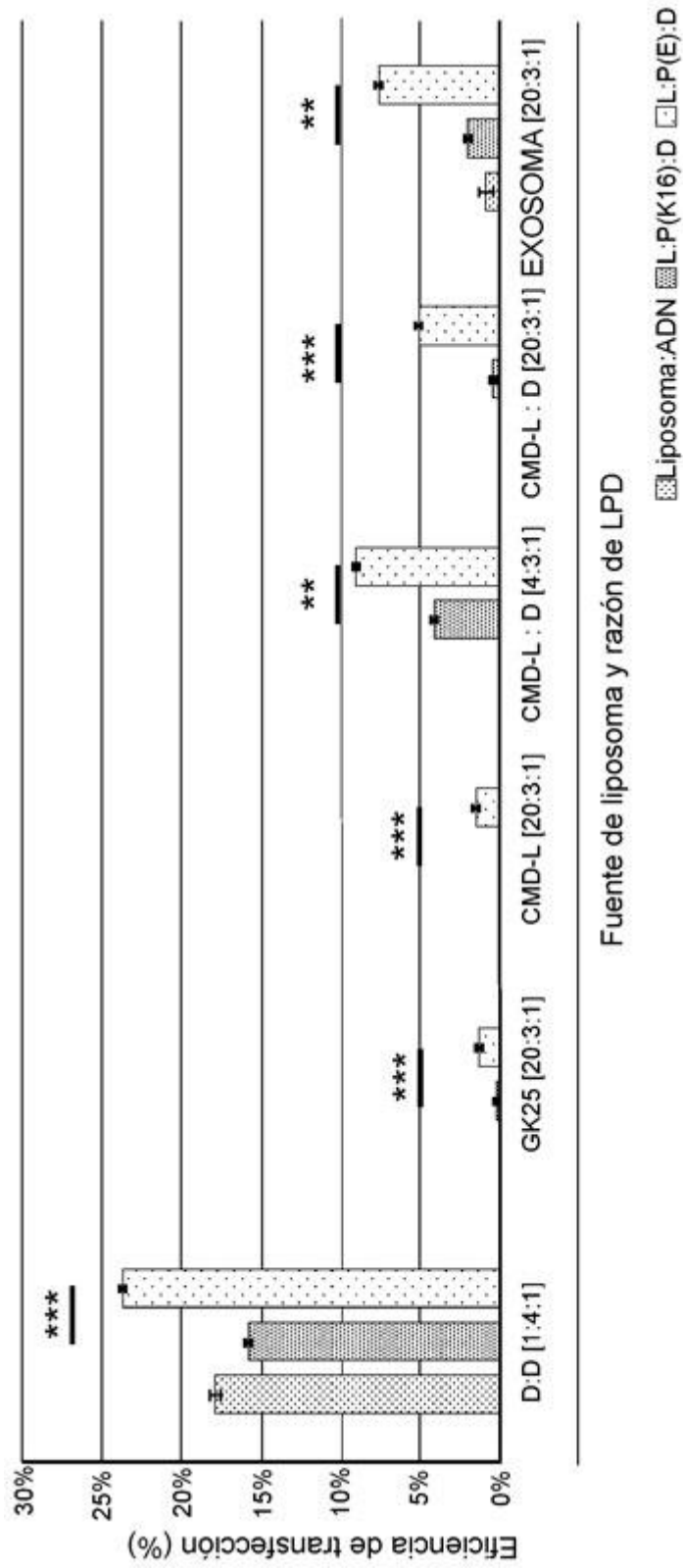


FIG. 15c