



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012000255-4 B1**



**(22) Data do Depósito: 02/07/2010**

**(45) Data de Concessão: 29/11/2022**

**(54) Título:** COMPOSTOS COMPREENDENDO IMINO LIPÍDIOS E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS DITOS COMPOSTOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 9/127; A61K 9/133; A61K 48/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/07/2009 EP 09165106.7; 23/09/2009 EP 09171102.8.

**(73) Titular(es):** MARINA BIOTECH, INC..

**(72) Inventor(es):** STEFFEN PANZNER; EVGENIOS SIEPI.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2010059487 de 02/07/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/003834 de 13/01/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 05/01/2012

**(57) Resumo:** LIPOSSOMAS ANFOTÉRICOS COMPREENDENDO IMINO LIPÍDIOS. A invenção se refere a conjuntos lipídicos, lipossomas tendo uma superfície externa compreendendo uma mistura de porções aniônicas e catiônicas; em que pelo menos uma porção das porções catiônicas são porções imino que são essencialmente carregadas sob condições fisiológicas, e seus usos para transfeção de células resistentes a soro.

## "COMPOSTOS COMPREENDENDO IMINO LIPÍDIOS E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS DITOS COMPOSTOS"

### Campo da invenção

[001]A presente invenção refere-se a conjuntos lipídicos ou lipossomas que são capazes de superar um bloqueio captação mediado por lipoproteína. Mais especificamente, esta invenção se refere a melhorias em lipossomas compreendendo lipídios carregados negativamente tendo um grupo cabeça carboxílico ou fosfato e lipídios carregados positivamente tendo porções imino ou guanido ou seus derivados nas respectivas regiões polares.

### Fundamentos para a Invenção

[002]Lipossomas têm uso generalizado como veículos de ingredientes ativos. Lipossomas neutros ou carregados negativamente são muitas vezes utilizados para a entrega de fármacos de pequenas moléculas, enquanto positivamente carregados (catiônicos) ou da classe introduzida recentemente de lipossomas anfotéricos são usados principalmente para a entrega de ácidos nucléicos tais como plasmídeos ou oligonucleotídeos. Exemplos importantes para lipossomas catiônicos utilizados para a entrega de cargas de ácido nucléico incluem, mas não estão limitados a Semple et al., Nat. Biotech. (2010) 28:172-176; Akinc et al, Nat. Biotech. (2008) 26:561 -569; Chien et al, Cancer Gene Ther. (2005) 12:321 - 328; de Fougerolles, Nat. Rev. Drug Discov. (2007) 6:443 - 453; Kim et al, Mol. Ther. (2006) 14:343 - 350; Morrissey, Nat. Biotech. (2005) 23: 1002-1007; Peer, Ciência (2008) 319: 627-630 e Gene Santel, Ther. (2006) 13: 1222-1234. Aplicação de lipossomas anfotéricos para a entrega de ácidos nucléicos tem sido demonstrada em Andreakos et al. Arthritis Rheum. (2009) 60:994 - 1005.

[003]Lipossomas anfotéricos pertencem à família maior de pH sensível, compreendendo adicionalmente lipossomas aniônicos e catiônicos de pH sensível, protótipos dos quais foram apresentados em Lai et al., Biochemistry (1985) e

24:1654-1661 Budker et al., Nat. Biotech. (1996) 14:760-764. Ao contrário dos lipossomas aniônicos e catiônicos de pH sensível, lipossomas anfotéricos são estruturas complexas e compreendem pelo menos um par de lipídios tendo carga complementar. WO 02/066012 descreve uma característica fundamental dos lipossomas anfotéricos em que estes têm uma fase estável, em ambos os pH baixo e neutro. WO 02/066012 e WO07/107304 descrevem um método de carregar tais partículas com ácidos nucléicos a partir de um pH baixo.

[004]Hafez, et al. (Biophys. J. 2000, 79 (3), 1438-1446) e WO 02/066012 proveem algumas orientações de como selecionar misturas de lipídios com propriedades verdadeiramente anfotéricas e mais especificamente como determinar o seu ponto isoelétrico e início da fusão. Lipídios neutros podem ser constituintes adicionais de lipossomas anfotéricos. A inclusão de um ou mais lipídios neutros contribui significativamente para a complexidade da mistura, especialmente uma vez que a quantidade individual de todos os componentes pode variar. O número muito elevado de combinações possíveis de lipídios representa um obstáculo prático para uma otimização mais rápida de lipossomas anfotéricos. A este respeito, WO08/043575 revela estratégias para a otimização da estabilidade, fusogenicidade e transfecção celular de lipossomas anfotéricos, particularmente um método de prever quais as misturas de lipídios formam fases lamelares estáveis satisfatórias em pH alto e baixo, enquanto formam uma fase hexagonal fusogênica em um pH intermediário.

[005]Os lipossomas anfotéricos de acordo com as referências acima mencionadas são transfectantes potentes de células. No entanto, foi observado que a função de alguns desses lipossomas pode ser bloqueada pela adição de certos soros, assim, potencialmente limitando a atividade desses lipossomas para o direcionamento de certas células *in vivo*. Isto é adicionalmente ilustrado nos exemplos aqui apresentados, por exemplo, Exemplo 3.

[006]A inibição da captação de lipossomas anfotéricos observada em dife-

rentes amostras é aparentemente oposta à ativação recentemente publicada de veículos catiônicos através da formação de complexos com lipoproteínas, neste caso ApoE, como demonstrado em Akinc et al. Mol. Ther. (2010 a publicação eletrônica em 11 de maio, ahead of print. DOI: 10.1038/mt.2010.85

[007]Uma investigação mais detalhada revelou lipoproteínas como mediadores deste efeito inibitório. Como mostrado no Exemplo 4 aqui, soro humano deficiente de lipoproteínas não é mais capaz de inibir a absorção dos lipossomas, como indicado pela entrega funcional de siRNA para as células desafiadas. Os inventores agora surpreendentemente e inesperadamente descobriram que certas espécies de lipídios de imino catiônicos em combinação com lipídios aniónicos tendo uma porção carboxila ou fosfato em seus grupos cabeça polares são particularmente vantajosas na manutenção da atividade de transfecção na presença de soro. Frequentemente, uma vantagem particular foi observada quando os conjuntos lipídicos ou lipossomas criados a partir de misturas de lipídios foram formuladas de acordo com o método descrito aqui e em WO08/043575.

#### Objeto da invenção

[008]Era, portanto, um objeto da invenção prover conjuntos lipídicos ou lipossomas que podem transfectar células na presença de soros diferentes.

[009]Outro objeto da invenção é prover composições farmacêuticas compreendendo lipossomas como um veículo para a entrega de agentes ativos ou ingredientes, incluindo medicamentos como fármacos de ácido nucléico, por exemplo, oligonucleotídeos e plasmídeos em células ou tecidos.

#### Sumário da Invenção

[0010]A presente invenção provê conjuntos lipídicos, lipossomas e seu uso para a transfecção de células em que os conjuntos lipídicos compreendem anfifílicos aniónicos e catiônicos e em que pelo menos uma parte dos anfifílicos catiônicos são lipídios de imino que são substancialmente carregados com pH 7,5, e em que os

anfifílicos aniónicos são lipídios de carboxila ou fosfato e em que adicionalmente a relação de carga entre os anfifílicos catiônicos e aniónicos é de 1,5 ou menos.

[0011]Em várias modalidades da invenção, conjuntos lipídicos anfifílicos compreendendo aniónicos e catiônicos são providas em que pelo menos uma porção dos anfifílicos catiônicos são lipídios de imino que são substancialmente carregados em condições fisiológicas, e em que adicionalmente pelo menos uma porção dos anfifílicos aniónicos são lipídios de carboxila, e em que a relação entre os anfifílicos catiônicos e aniónicos é inferior ou igual a 1,5.

[0012]Em aspectos mais específicos da invenção, conjuntos lipídicos compreendendo uma combinação de lipídios são providas em que os lipídios catiônicos da referida combinação compreendem uma porção guanido e os lipídios aniónicos da combinação formam um grupo carboxila, adicionalmente caracterizado pelo fato de que a relação entre as porções guanido e os grupos carboxila é menor ou igual a 1,5.

[0013]Em outras modalidades da invenção, conjuntos lipídicos anfifílicos compreendendo aniónicos e catiônicos são providas em que pelo menos uma parte dos anfifílicos catiônicos são lipídios de imino que são substancialmente carregados em condições fisiológicas, e em que adicionalmente pelo menos uma porção dos anfifílicos aniónicos são lipídios de fosfato, e em que a relação entre os anfifílicos catiônicos e aniónicos é inferior ou igual a 1,5. Em aspectos adicionais preferidos de tais modalidades, os lipídios são os lipídios de imino guanido.

[0014]Os grupos imino carregados dos anfifílicos catiônicos das invenções têm um pK superior a 7,5 e são selecionados a partir de iminas, amidinas, piridinas, 2-aminopiridinas, bases nitrogenadas heterocíclicas, porções guanido, isouréias ou tioisouréias. Em modalidades preferidas, os lipídios catiônicos são selecionados a partir do grupo de PONA, CHOLGUA, GUADACA, MPDACA ou SAINT-18.

[0015]Em modalidades preferidas, os lipídios aniónicos são selecionados a

partir do grupo de CHEMS, DMGS, DOGS, DOPA ou POPA.

[0016]Em muitas modalidades, os conjuntos lipídicos da invenção são lipossomas.

[0017]Em modalidades adicionais, os conjuntos lipídicos também incluem lipídios neutros, tais como o colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina ou esfingomielina ou suas misturas.

[0018]Em modalidades preferidas o lipídio neutro é o colesterol e a fração molar de colesterol na mistura lipídica é entre 10 e 50% em mol.

[0019]Em algumas modalidades, os conjuntos lipídicos também incluem lipídios peguilados e em aspectos preferidos de tais modalidades, os lipossomas são produzidos por um processo compreendendo as etapas de (i) formação e vedação dos lipossomas na presença de um ingrediente ativo e (ii) uma adição separada de PEG-lipídios após a referida etapa (i).

[0020]Foi encontrado inesperadamente que transfeção resistente a soro pode ser alcançada com conjuntos lipídicos ou lipossomas tendo uma superfície externa compreendendo uma mistura de aniónicos e porções catiônicas; em que pelo menos uma parte das porções catiônicas são porções imino que são essencialmente carregadas em condições fisiológicas. Em modalidades numerosas, os conjuntos lipídicos e lipossomas da presente invenção são formuladas utilizando um método descrito em WO08/043575 e também descrito em mais detalhes aqui.

#### Descrição Detalhada da Invenção

##### *Química de lipídios*

[0021]Por "carregável" significa que o anfifílico tem um pK na faixa entre 4 a pH 8. Um anfifílico carregável pode, portanto, ser um ácido fraco ou base. "Estável" em conexão com anfifílicos carregados significa um ácido forte ou base com um pK fora desta faixa, o que resulta em carga substancialmente estável na faixa de pH de 4 a pH 8.

[0022]Por "anfotérico" aqui significa uma substância, uma mistura de substâncias ou um complexo supramolecular (por exemplo, um lipossoma) compreendendo grupos carregados de ambos os caracteres aniónicos e catiônicos em que:

- 1) pelo menos um e, opcionalmente ambos, dos anfifílicos aniónicos e catiônicos é carregável, tendo pelo menos um grupo carregado com um pK entre 4 e 8,
- 2) a carga catiônica prevalece em pH 4, e
- 3) a carga aniónica prevalece em pH 8.

[0023]Como resultado, a substância ou mistura de substâncias tem um ponto isoelétrico de carga líquida neutra entre pH 4 e pH 8. Caráter anfotérico é por esta definição diferente do caráter zwitteriônico, como zwitterions não tem um pK na faixa citada acima. Em consequência, zwitterions são essencialmente de carga neutra ao longo de um intervalo de valores de pH; fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas são lipídios neutros com caráter zwitteriônico.

[0024]Por "relação de carga" ou "C/A" aqui se entende o valor absoluto ou módulo da relação entre as cargas nominais geralmente atribuídas aos anfifílicos catiônicos e aniónicos, respectivamente. A taxa nominal de um grupo carboxila é "-1", que de uma porção de fosfato é "-2" e a carga nominal de um composto imino é "+1". A "razão de carga" em uma dada mistura de anfifílicos ou em um conjunto de lipídios é então calculada a partir do produto dessas taxas nominais e as respectivas frações molares dos compostos considerados, compostos neutros, como colesterol ou zwitteriônicos anfifílicos como POPC ou DOPE não são levados em conta.

$$C/A = (x_{c1} * z_{c1} + x_{c2} * z_{c2} + \dots + x_{cn} * z_{cn}) / (x_{a1} * z_{a1} + x_{a2} * z_{a2} + \dots + x_{an} * z_{an})$$

[0025]em que  $x_{c1} \dots n$  representa a fração molar de um determinado composto catiônico,  $x_{a1} \dots n$  representa a fração molar de compostos aniónicos,  $z_{c1} \dots n$  representa a taxa nominal de um determinado composto catiônico e  $z_{a1} \dots n$  representa a carga nominal dos compostos aniónicos.

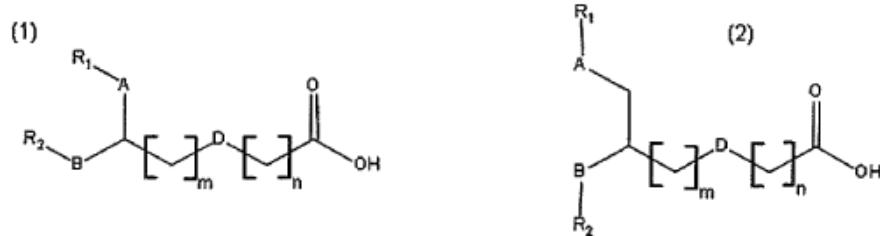
[0026]Como um exemplo, uma mistura compreendendo 42% em mol de um

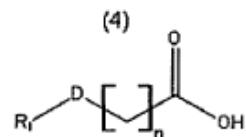
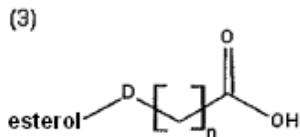
lipídio de carboxila, 38% de um lipídio de imino e 20% em mol de um lipídio neutro tem uma razão de carga ou C/A de  $38/42 = 0,91$ . Outra mistura que inclui 27% de um lipídio de fosfato, 43% em mol de um lipídio de imino e 30% em mol de um lipídio neutro tem uma razão de carga ou C/A de  $43/54 = 0,8$ , devido à dupla carga nominal do grupo fosfato.

[0027] Torna-se evidente a partir da definição e exemplos, que as razões mоляres ou – para fins de brevidade – razões entre os lipídios e as razões de carga têm o mesmo significado para espécies de carga única e que esses termos podem ser mutuamente trocados dentro desse grupo. Isto é, por exemplo, o caso de combinações de lipídios de imino e carboxi. Em contraste com isso, a razão molar é diferente da razão de carga adicional para lipídios de fosfato, uma vez que estes compostos podem suportar uma carga dupla, por exemplo, nos casos em que o grupo fosfato está presente como um éster de fosfato primário como no DOPA. Como mostrado no exemplo de cálculo acima, a razão molar ou razão de lipídios é, então, o dobro da razão de carga. Por razões de clareza apenas, o termo "razão de carga" é utilizado com preferência ao longo desta divulgação.

[0028] Por "pH fisiológico" ou "condições fisiológicas" aqui significa um pH de cerca de 7,5.

[0029] Lipídios aniónicos compreendendo porções carboxila em seus grupos cabeça polares são bem conhecidos pelos versados na técnica. Exemplos de lipídios aniónicos compreendendo porções carboxila nos grupos cabeça polares podem ser selecionados a partir das estruturas (1)- (4) abaixo,





[0030] Em que n ou m é um inteiro entre 0 e 29, R1 e R2 são independentemente um do outro porções alquila, alquenila ou alquinila tendo entre 8 e 24 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 ligações insaturadas, A, B ou D são independentemente um do outro ausente, -CH2-, -CH=, =CH-, -O-, -NH-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH-, -NH-C(O)-O-, um diéster de ácido fosfórico ou fósforo, e "esterol" pode ser um colesterol ligado via seu átomo C3.

[0031] A lista abaixo provê mais exemplos específicos de lipídios portando um grupo carboxila.

CHEMS Colesterolhemisucinato

Chol-Chol-COOH ou ácido C1-colesterolala-3-carboxílico

Chol-C2 Colesterolhemioxalato

Chol-C3 Colesterolhemimalonato

Chol-C3N N-(Cholesteril-oxicarbonila) Glicina

Chol-C5 Choesterolhemiglutarato

Chol-C6 Colesterolhemiadipato

Chol-C7 Colesterolhemipimelato

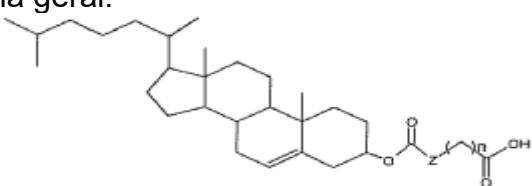
Chol-C8 Colesterolhemisuberato

Chol-C12 ácido dicarboxílico colesterolhemidodecano

Chol-C13N ácido 12-Cholesteriloxicarbonilaminododecanóico

Chol-C16 ácido dicarboxílico colesterolhemihexadecano

Ácidos colesterolhemidicarboxílico e ácidos colesteriloxicarbonilaminocarboxílico da seguinte fórmula geral:



Em que Z é C ou -NH- e n é qualquer número entre 0 e 29.

DGS ou DG-SuccDiacilglicerolhemisuccinato (âncora de membrana não especificada)

DOGS ou DOG-Succ Dioleoilglicerolhemisuccinato

DMGS ou DMG-Succ Dimiristoilglicerolhemisuccinato

DPGS ou DPG-Succ Dipalmitoilglicerolhemisuccinato

DSGS ou DSG-Succ Distearoilglicerolhemisuccinato

POGS ou POG-Succ 1-Paimitoil-2-oleoilglicerol-hemissuccinato

DOGM Dioieoilglicerolhemimalonato

DOGG Dioleoilglicerolhemiglutarato

DOGA Dioleoilglicerolhemiadipato

DMGM Dimiristoilglicerolhemimalonato

DMGG Dimiristoilglicerolhemigluiarato

DMGA Dimiristoilgliceroihemiadipato

DOAS ácido 4 - {(2,3-Dioleoil-propil) amino}-4-oxobutanóico

DOAM ácido 3 - {(2,3-Dioleoil-propil) amino}-3-oxopropanóico

DOAG ácido 5-{(2,3-Dioleoil-propil) amino}-5-oxopentanóico

DOAA ácido 6-{(2,3-Dioleoil-propil) amino}-6-oxohexanóico

DMAS ácido 4 - {(2,3-dimiristoil-propil) amino}-4-oxobutanóico

DMAM ácido 3 - {(2,3-dimiristoil-propil) amino}-3-oxopropanóico

DMAG ácido 5-{(2,3-Dimiristoil-propil) amino}-5-oxopentanóico

DMAA ácido 6-{(2,3-Dimiristoil-propil) amino}-6-oxohexanóico

DOP ácido 2,3 - Dioleoil-propanóico

DOB ácido 3,4-Dioieoil-butanóico

DOS ácido 5,6-Dioleoil-hexanóico

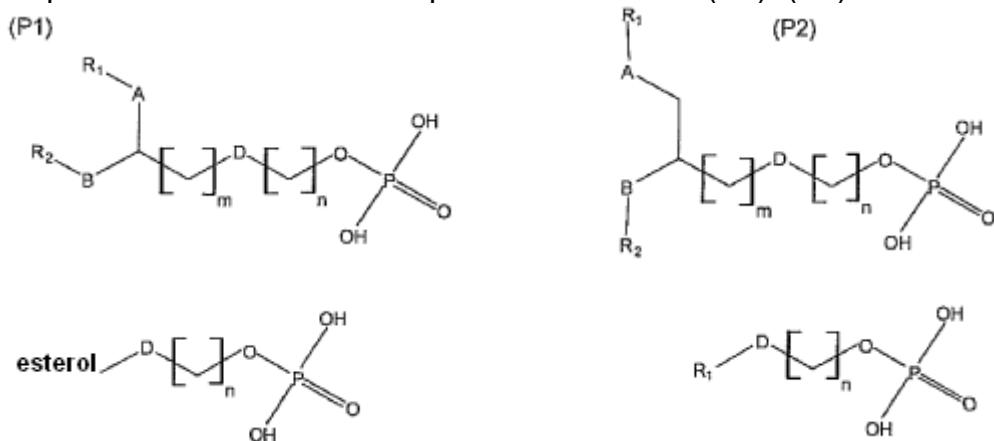
DOM ácido 4,5-Dioleoil-pentanóico

DOG ácido 6,7-Dioleoil-heptanóico

DOA ácido 7,8-Dioleoil- octanóico  
 DMP ácido 2,3-dimiristoil-propanóico  
 DMB ácido 3,4-dimiristoil-butanóico  
 DMS ácido 5,6-dimiristoil-hexanóico  
 DMM ácido 4,5-dimiristoil -pentanóico  
 DMG ácido 6,7-Dimiristoil-heptanóico  
 DMA ácido 7,8-dimiristoil-octanóico  
 DOG-GluA ácido Dioleoilglicerol -glucorônico (1 - ou 4-ligado)  
 DMG-GluA ácido Dimiristoilglicerol -glucurônico (1 - ou 4-ligado)  
 DO-cHA ácido Dioleoilglicerolhemiciclohexano-1,4 -dicarboxílico  
 DM-cHA ácido Dimiristoilglicerolhemiciclohexano-1,4 -dicarboxílico  
 PS Fosfatidilserina (âncora de membrana não especificada)  
 DOPS Dioleoilfosfatidilserina  
 DPPS Dipalmitoilfosfatidilserina  
 MA ácido mirístico  
 PA Ácido palmítico  
 OA ácido oléico  
 LA ácido linoléico  
 SA ácido esteárico  
 NA Ácido nervônico  
 BA Ácido beênico  
 POGA ácido Palmitoil-oleoil glutâmico-  
 DPAA ácido Dipalmitoilaspártico  
 [0032]Quaisquer derivados de dialquila dos lipídios aniônicos compreendendo grupos diacila listados acima estão também no escopo da presente invenção.  
 [0033]Lipídios aniônicos preferidos tendo um grupo carboxila podem ser selecionados a partir do grupo de Chol-C1 e Chol-C16 incluindo todos os seus homo-

lógos, em particular CHEMS. Também preferidos são os lipídios aniónicos DMGS, DPGS, DSGS, DOGS, POGS.

[0034]Lipídios aniónicos compreendendo porções de fosfato em seus grupos cabeça polares são bem conhecidos pelo versado na técnica. Exemplos de lipídios de fosfato podem ser selecionados a partir de estruturas (P1)- (P4) abaixo:



[0035]em que n ou m é um inteiro entre 0 e 29, R1 e R2 são independentemente um do outro uma porção alquila, alquenila, alquinila tendo entre 8 e 24 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 ligações insaturadas, A, B ou D são independentemente um do outro ausente, -CH<sub>2</sub>-, -CH=, =CH-, -O-, -NH-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- ou -NH-C(O)-O- e "esterol" pode ser um colesterol ligado via seu átomo C3.

[0036]A lista abaixo provê mais exemplos específicos de lipídios portando um grupo ácido fosfatídico.

Chol-P Colesterol-3-fosfato

DOPA ácido Dioleoil-fosfatídico

POPA ácido Palmitoil-oleoil-fosfatídico

DPPA ácido dipalmitoil fosfatídico

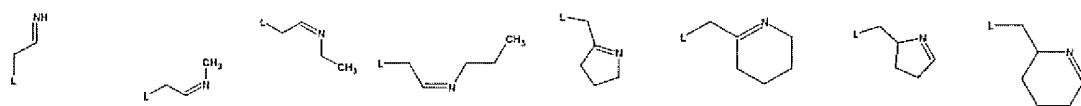
MPA ácido Dimiristoilfosfatídico.

[0037]Cetilfosfato ou homólogos de éster de ácido fosfórico com R1 tendo entre 16 e 24 átomos de carbono.

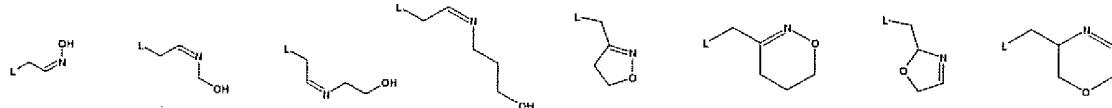
[0038] Os lipídios catiônicos que podem ser usados com esta invenção são moléculas anfipáticas compreendendo uma porção imino em seu grupo cabeça polar, em que a tal porção imino é substancialmente carregada em condições fisiológicas. Portanto, em modalidades preferidas o valor pK deste grupo funcional é de 7,5 ou maior, em outras formas preferidas o valor pK do grupo imino é 8,5 maior. Porções imino tendo tais características podem ser iminas se ou fazem parte de grandes grupos funcionais, tais como amidinas, piridinas, 2-aminopiridinas, bases nitrogenadas heterocíclicas, funções guanido, isouréias, isotiouréias e similares.

[0039] As seguintes estruturas (I1) ... (I113) representam alguns exemplos específicos de tais porções imino,

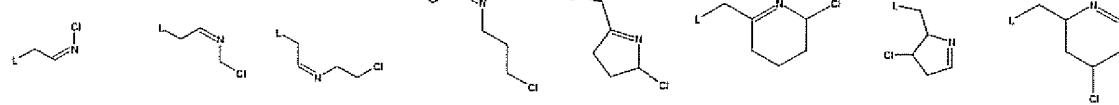
(I1) ... (I8)



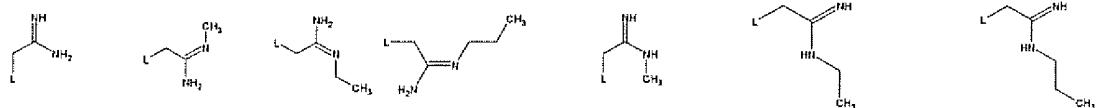
(I9) ... (I16)



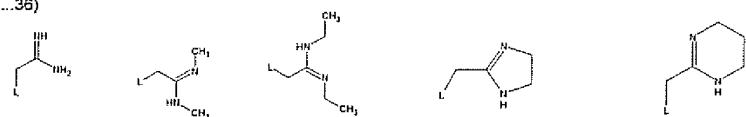
(I17) ... (I24)



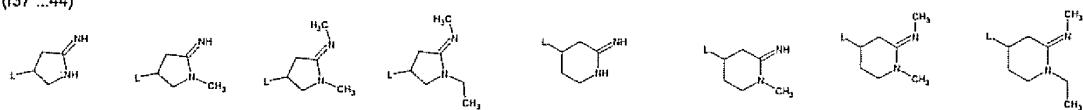
(I25) ... (I31)



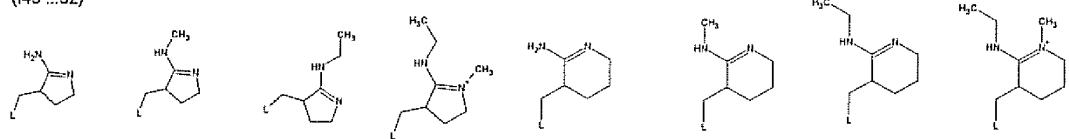
(I32 ... 36)



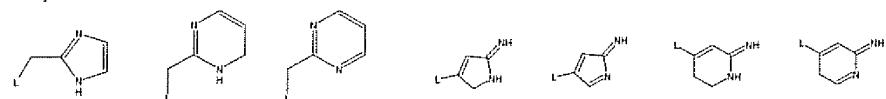
(I37 ... 44)



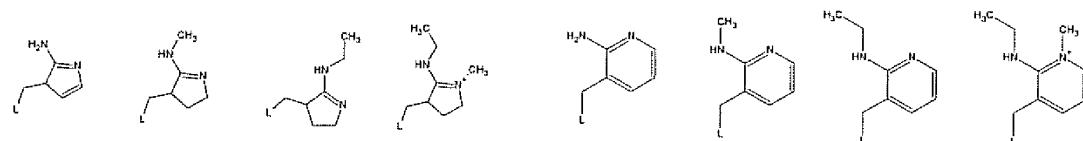
(I45 ... 52)



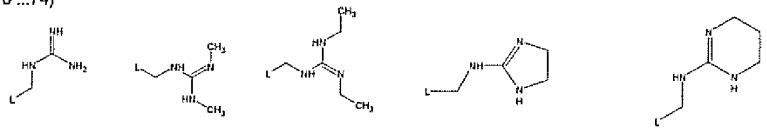
(I53 ... 59)



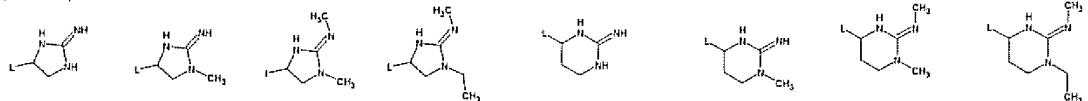
(I60 ... 67)



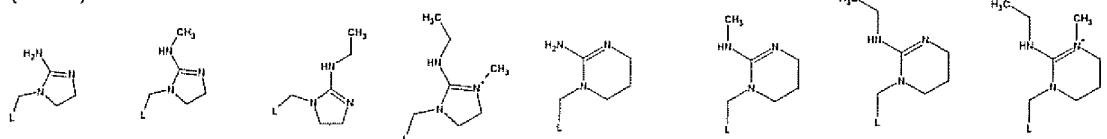
(I70 ... 74)



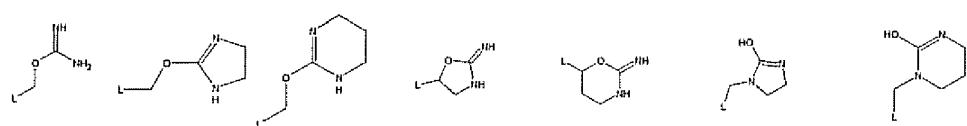
(I75 ... 82)

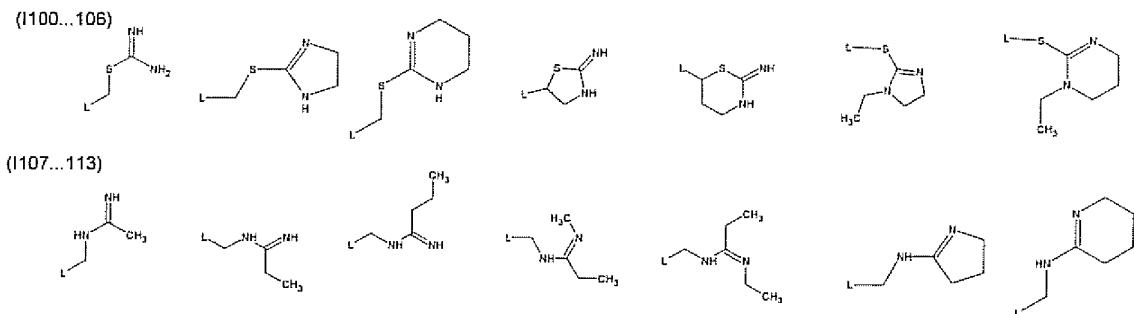


(I83 ... 90)

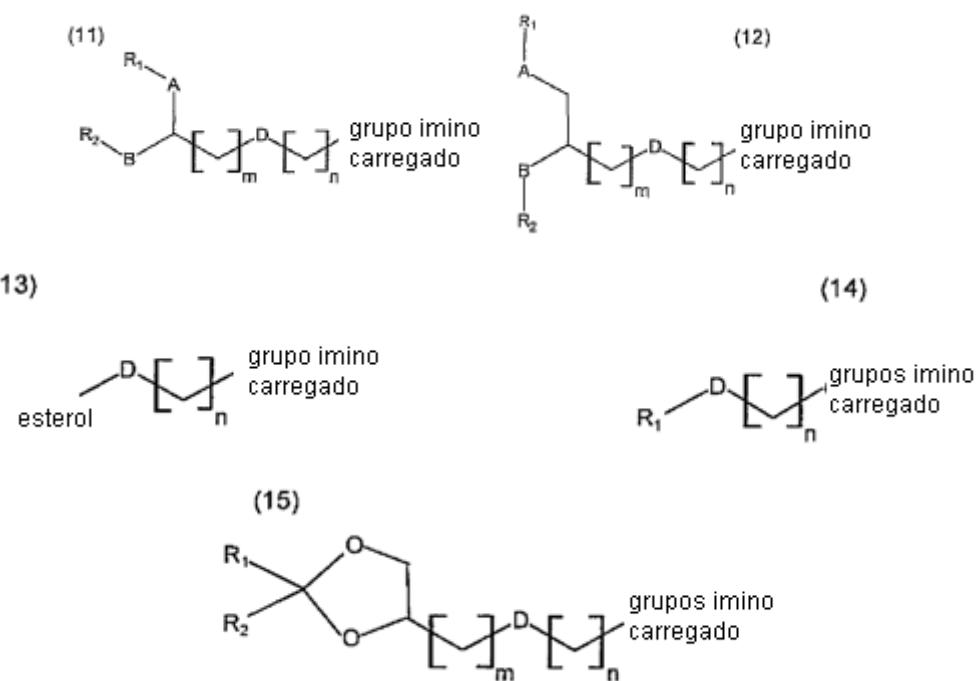


(I91 ... 97)





[0040] Em que L representa a região apolar e opcionalmente ligantes ou porções espaçadoras da molécula de lipídio anfipático. Exemplos de L podem ser adicionais selecionados a partir das seguintes estruturas gerais (11) a (15),



[0041] Em que n ou m representa um número inteiro entre 0 e 29, R1 e R2 são independentemente um do outro um porções alquila, alquenila ou alquinila tendo entre 8 e 24 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 ligações insaturadas, A, B ou D são independentemente um do outro ausente, -CH2-, -CH=, =CH-, -O-, -NH-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -C(O)- NH-, -NH-C(O)-, -O-C(O)-NH- ou -NH-C(O)-O- e "esterol" pode ser um colesterol ligado via seu átomo C3.

[0042] A seguinte tabela 1 provê valores calculados ou banco de dados para

o pK das porções contendo imino (I1) até (I113). Para porções imino quaternizadas, um valor hipotético de 99 foi introduzido para apenas destacar este fato.

Tabela 1: Valores pK para as porções I1 – I113

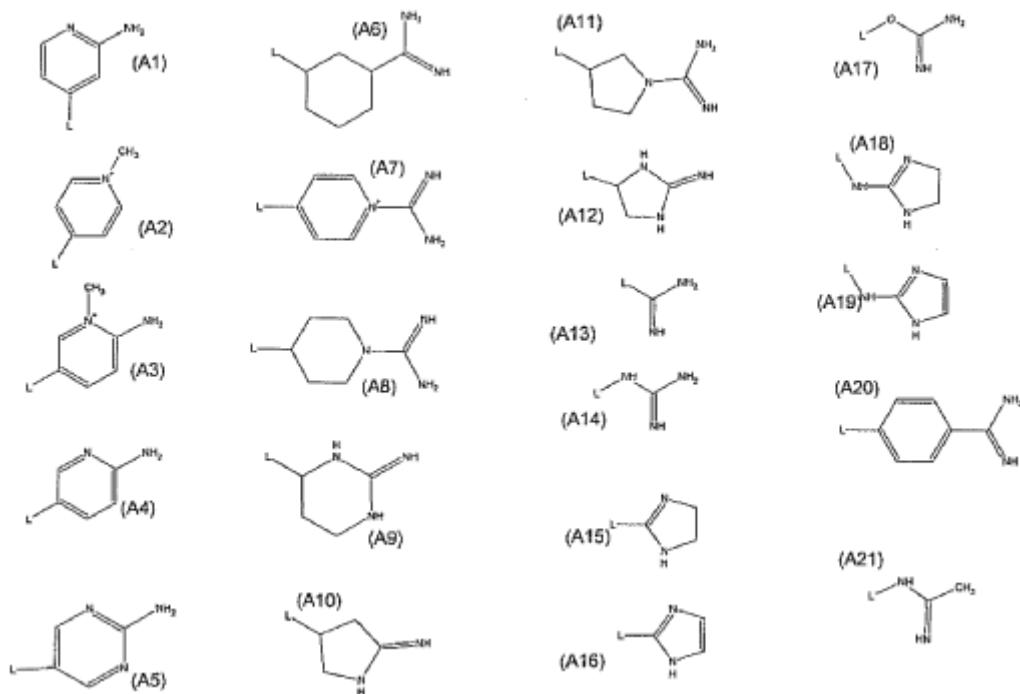
Porção	pK				Porção	pK			
	imino	amino	anel N	guanido N		imino	amino	anel N	guanido N
I1	10,49				I51	10,31	-3,56		
I2	7,23				I52	99	-3,47		
I3	7,23				I53	7,73			
I4	7,08				I54	10,62	-6,91		
I5	8,41				I55	1,92		-5,58	
I6	8,06				I56	10,63	-6,87		
I7	7,87				I57	8,62		-7,89	
I8	7,52				I58	11,03	-5,39		
I9	11,58				I59	9,31		-4,75	
I10	6,18				I60	8,67	-6,83		
I11	6,61				I61	9,37	-3,47		
I12	7,01				I62	10,66	-3,56		
I13	n.d.				I63	99	-3,47		
I14	n.d.				I64	7,19	-7,59		
I15	5,62				I65	7,41	-2,85		
I16	5,89				I66	8,37	-2,58		
I17	0,63				I67	99	-2,7		
I18	4,53				I68	13,72			-1,04
I19	6,22				I69	14,03			2,05
I20	6,99				I70	14,14			1,71
I21	5,36				I71	11,11			0,94
I22	5,11				I72	14,33			1,68
I23	5,85				I73	14,25			-0,71
I24	6,03				I74	14,73			-0,4
I25	12,06	-5			I75	13,9			-0,09
I26	12,37	-4,91			I76	14,04			-0,1
I27	12,37	-4,91			I77	14,18			-0,72
I28	12,37	-4,91			I78	14,67			-0,41
I29	12,37	-3,58			I79	14,18			-0,2
I30	12,37	-3,68			I80	14,33			-0,2
I31	12,37	-3,58			I81	9,85			-1,92
I32	12,06	-5			I82	10,17			-0,57
I33	12,68	-3,49			I83	11,41			-0,65
I34	12,66	-3,58			I84	99	-0,57		-13,15
I35	10,98	-5,43			I85	14,33			-0,98
I36	12,98	-4,25			I86	14,33			-0,57
I37	12,52	-3,12			I87	14,47			-0,68
I38	12,82	-4,01			I88	99	-0,57		-11,28
I39	13,13	-3,93			I89	10	-8,4		
I40	13,12	-3,68			I90	8,69	-9,2		

Porção	pK				Porção	pK			
	imino	amino	anel N	guanido N		imino	amino	anel N	guanido N
I41	12,37	-3,25			I91	10,93	-7,8		
I42	12,68	-4,04			I92	10,08	-6,76		
I43	12,99	-3,96			I93	10,32	-6,88		
I44	12,98	-3,71			I94	3,51			
I45	9,1	-4,89			I95	3,51			
I46	9,37	-3,47							
I47	10,66	-3,56							
I48	99	-3,47							
I49	8,47	-4,89							
I50	9,02	-3,47							
I100	8,98	-8,16			I107	12,49	-3,67		
I101	8,85	-8,94			I108	12,49	-3,67		
I102	9,9	-7,55			I109	12,36	-3,67		
I103	9,69	-6,76			I110	12,8	-3,58		
I104	9,29	-6,88			I111	12,78	-3,58		
I105	8,82	-9,73			I112	10,62	-3,58		
I106	10,58	-8,09			I113	10,27	-3,58		

[0043]Torna-se evidente a partir dos dados aqui apresentados, que a maioria das estruturas I1-I113 compreendem porções imino preferidas tendo um pK maior que 7,5 ou até mesmo maior que 8,5.

[0044]Os valores de pK podem ser tomados a partir de bancos de dados públicos. Como alternativa, existe software especialista de domínio público que pode calcular, prever ou extrapolar esses valores, por exemplo, ACD/Labs v7 (pelo Advanced Chemistry Development, Ontario, Canadá) ou similar.

[0045]As porções imino analisadas acima estão ilustrando os ensinamentos da presente invenção, sem limitá-los aos exemplos específicos. É claro que é possível mudar a posição do substituinte, em particular quando os sistemas de anel tais como pirroles ou piridinas são usados para a prática desta invenção. Também é possível substituir os radicais alifáticos utilizados ao longo de I1-I113 por resíduos aromáticos ou porções de arila. A lista a seguir de compostos (A1) até (A21) provê alguns exemplos que devem ilustrar ainda mais essas modificações, em que L é definido como acima.



[0046]A seguinte tabela 2 provê valores calculados ou de banco de dados para o pK das porções contendo imino (A1) até (A21). Para porções imino quartenizadas, um valor hipotético de 99 foi introduzido para apenas destacar este fato.

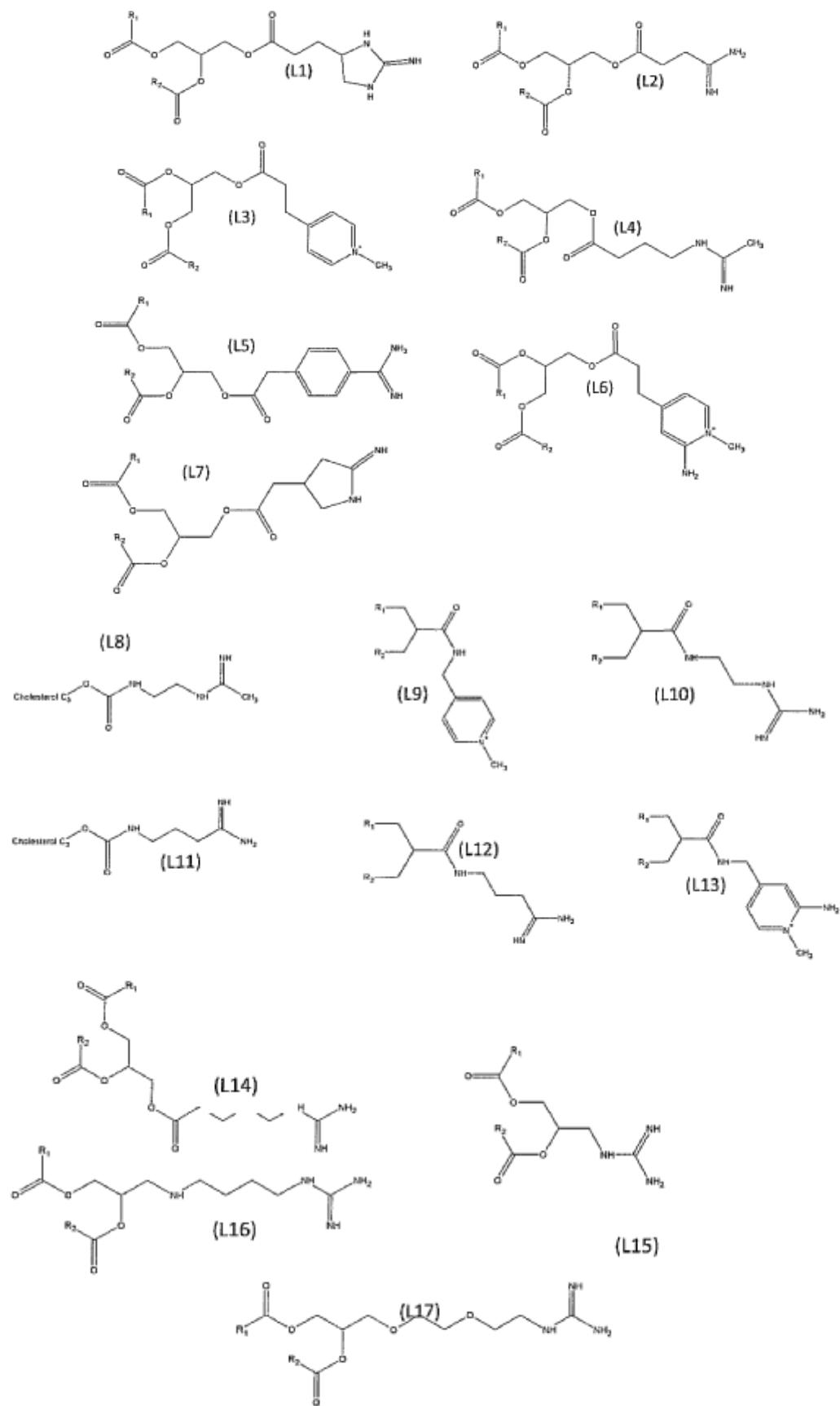
Tabela 2: Valores de pK para estruturas (A1) a (A21).

Estrutura	Átomo	pK	Átomo	pK	Átomo	pK
A1	anel	7,29	fora	-7,16		
A2	anel	99				
A3	anel	99	fora	-6,76		
A4	anel	7,06	fora	0,91		
A5	anel	4,74				
A6	imino	12,15	amidina	-4,95		
A7	imino	3,07	amidina	-12,14	anel	99
A8	imino	14,24			anel	-1,31
A9	imino	14,18	amidina	-0,72		
A10	imino	12,52	amidina	-3,12		
A11	imino	14,15			anel	-1,27

A12	imino	14,25	amidina	-0,71		
A13	imino	12,31	amidina	-5		
A14	imino	13,75	amidina	-0,76		
A15	imino	10,98	amidina	-5,43		
A16	imino	7,96				
A17	imino	9,44	amidina	-8,39		
A18	imino	9,78	amidina	0,95		
A19	imino	8,52	fora	1,86		
A20	imino	11,97	amidina	-6,3		
A21	imino	12,5	amidina	-3,6		

[0047]Mais uma vez, muitas das estruturas apresentadas na Tabela 2 acima compreendem porções imino preferidas tendo um pK maior que 7,5 ou ainda maior do que 8.5.

[0048]Como mencionado acima, as porções imino carregadas podem ser combinadas com âncoras de lipídios ou porções hidrofóbicas para produzir lipídios ou anfifílicos que são capazes de formar bicamadas lipídicas por si só ou podem ser integrados em membranas lipídicas formadas a partir de lipídios ou outros anfifílicos. Em algumas modalidades, lipídios específicos ou anfifílicos são selecionados a partir dos exemplos L1 a L17 apresentados a seguir,



[0049]em que  $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  são independentemente um do outro um porções al-

quila, alquenila ou alquinila tendo entre 8 e 24 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 ligações insaturadas.

[0050] Alguns destes lipídios foram apresentados anteriormente na literatura, por exemplo, os lipídios de guanido em WO91/16024, WO97/43363, WO98/05678, WO01/55098, WO2008/137758 (lipídios de aminoácidos), em EP 0685234 (baseado em diacilgliceróis), US 5.965.434 (também baseado em diacilgliceróis) ou os compostos de piridínio em US 6.726.894. Além disso, como demonstrado em WO29086558 ou ilustrado na estrutura (15), também é possível usar estruturas principais de lipídios alternativos, por exemplo, aqueles que constituem um segmento de ligante de dioxolano, mantendo a funcionalidade dos respectivos grupos cabeça.

#### Misturas de Lipídios e Outros Lipídios Opcionais

[0051] A presente invenção divulga misturas de lipídios compreendendo anfifílicos aniônicos e catiônicos; em que pelo menos uma parte dos anfifílicos catiônicos são lipídios de imino que são substancialmente carregados em condições fisiológicas, e em que adicionalmente pelo menos uma porção dos anfifílicos aniônicos são lipídios de carboxila ou lipídios de fosfato.

[0052] A co-presença de ambos os lipídios catiônicos que incluem uma porção imino carregada em seu grupo cabeça polar e lipídios aniônicos compreendendo uma função carboxila ou fosfato em seu grupo cabeça polar é uma característica central desta invenção. Isto é, lipossomas ou conjuntos lipídicos que substancialmente faltam de um destes elementos não são contemplados na prática da presente invenção. Os lipídios de imino catiônicos e os lipídios aniônicos podem estar presentes em diferentes proporções; as proporções são caracterizadas aqui como "razões de carga" (relação cátion: ânion, C/A, ver definições) em toda esta divulgação. Em muitas modalidades a razão C/A está acima de 0,33, em modalidades preferidas essa proporção é acima de 0,5 e em algumas modalidades, a proporção é igual ou superior a 0,66. Em aspectos preferidos das modalidades o C/A é igual ou inferior a

três, em aspectos preferidos adicionais, a proporção é igual ou inferior a 2 e em aspectos particularmente preferidos, a proporção é igual ou inferior a 1,5.

[0053]Em muitos aspectos das modalidades, a mistura de lipídio resultante tem caráter anfotérico. Lipídios de imino tendo um pK de mais de 7,5, e adicionamente os lipídios de imino preferidos tendo um pK de 8,5 ou superior são essencialmente carregados em condições fisiológicas, sua carga real torna-se próxima e, eventualmente, idêntica à sua carga nominal. O pK típico de lipídios de carboxila é entre 4,5 e 6 e esses lipídios são, portanto, também carregados em pH fisiológico. Misturas de ambos os lipídios de imino e carboxila, portanto, têm carga negativa líquida em pH fisiológico mesmo que C/A seja menor do que 1, a carga líquida se torna 0 em C/A = 1 e positiva para C/A > 1.

[0054]Em pH baixo, a carga aniónica desaparece em torno do pK do lipídio de carboxila, o que torna misturas de lipídios tendo um C/A < 1 primeiramente neutras e, em seguida, carregadas positivamente. A reversão de carga é característica para C/A < 1 e define o caráter anfotérico. Misturas de lipídios tendo C/A = 1 ou C/A > 1 também sofrem uma redução de cargas negativas em pH baixo, mas não há reversão de carga. No entanto, deve ser notado que a relação entre C/A e o caráter anfotérico dos conjuntos lipídicos resultantes implica em uma distribuição essencialmente igual, estatística, de porções carregadas através de uma dada bicamada. Isso significa que a parte interna e externa de uma membrana deve ter a mesma composição de lipídios carregados para manter a plena validade desses cálculos. Isto pode não ser sempre o caso, como demonstrado no exemplo 9 e lipossomas de caráter anfotérico podem ser formados mesmo com misturas de lipídios tendo C/A > 1. Ainda assim, as correlações entre a composição da membrana e o caráter anfotérico divulgados aqui dão uma boa orientação para a seleção de misturas de lipídios.

[0055]As misturas de lipídios podem ainda compreender lipídios catiônicos adicionais, aniónicos, neutro / zwitteriônico ou funcionalizados. Lipídios catiônicos

adicionais podem ser componentes conhecidos como DOTAP, DODAP, DC-Chol e similares. Lipídios aniónicos adicionais podem ser selecionados a partir de fosfolipídios de carga negativa, tais como fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ácido dicetilfosfórico, cardiolipina e similares. Lipídios neutros ou zwitteriônicos são colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina e similares.

[0056]Em modalidades preferidas o lipídio neutro é o colesterol. Mais preferidas são variantes em que as misturas de lipídios compreendem entre 10% em mol e 50% em mol de colesterol, ainda mais preferidas são variantes com cerca de 20% em mol e 40 %. em mol de colesterol

[0057]Um grupo importante de lipídios funcionalizados são aqueles que incluem extensões de polímero tal como polietilenoglicol (PEG-lipídios). Numerosos lipídios PEGilados são conhecidos no estado da técnica e as diferenças essenciais podem ser encontradas em (i) o tamanho e grau de ramificação da cadeia de PEG, (ii) o tipo do grupo ligante entre PEG e a porção inserida na membrana da molécula e (iii) o tamanho da membrana, domínio hidrofóbico inserido na membrana de um lipídio PEGilado. Outros aspectos são PEGilação (iv) a densidade da modificação nas assemblies de lipídio e (v) sua orientação dentro de tais conjuntos lipídicos.

[0058]Em muitas modalidades do aspecto (i), o fragmento PEG tem um peso molecular entre 500Da e 5.000 Da, em modalidades mais preferidas, este fragmento tem um peso molecular de cerca de 700Da a 2.500 Da e ainda mais preferidas são fragmentos PEG de cerca de 2.000 Da. Em muitas modalidades, a porção PEG é um PEG de cadeia única, não-ramificado.

[0059]Modalidades típicas de aspecto (ii) são porções fosfoetanolamina, porções diacilgliceróis ou os grupos cabeça polares de ceramidas.

[0060]O tamanho do domínio inserido na membrana hidrofóbica, caracterizado no aspecto (iii) é uma outra característica importante de tais moléculas, assim como determina o tempo de permanência da membrana do lipídio PEG dentro de

uma bicamada. Como um exemplo, lipídios PEGilados têm um domínio hidrofóbico curto, tal como DMPE-PEG2000 (um conjugado de dimiristoilfosfatidiletanolamina-PEG, em que a cadeia de PEG tem um peso molecular de 2000Da) difunde uma dada membrana em poucos segundos, enquanto o homólogo de DSPE-PEG2000 reside em uma bicamada por muitas horas ou dias (ver Silvius, J.R. e Zuckermann, M.J. (1993) Biochemistry 32, 3153-3161 ou Webb, M.S. et al. (1998) em Biochim Biophys Acta 1372: 272-282 ou Wheeler et AL. ( 1999), Gene Ther 6: 271-281.

[0061]PEGilação ao mesmo tempo, provê estabilidade coloidal a lipossomas, em particular a combinações de lipossomas catiônicos com cargas de ácido nucléico aniónicos, tal como ilustradoem US 6.287.591, mas também prejudica a captação celular e/ou endossomal de lipossomas (ver Shi.F. et al. (2002) em Biochem. J. 366:333-341). Um PEGilação transitória é agora estado da técnica e satisfaz a necessidade de tanto estabilidade coloidal quanto atividade das partículas.

[0062]Um outro aspecto (iv) de PEGilação é a densidade de tal modificação, o que deve estar entre 0,5 e 10% em mol da mistura de lipídio, em modalidades preferidas o grau de PEGilação é cerca de 1 a 4% em mol.

[0063]Uma vez que PEGilação de uma dada bicamada estabiliza a fase lamelar da assemblie de lipídios e prejudica fusão lipídica associada à formação de uma fase hexagonal, a quantidade de porções de PEG residual em uma bicamada deve ser mínima. Isto pode ser alcançado por titulação da quantidade necessária de PEGlipídios. Em algumas modalidades de aspecto (v) os lipossomas são, portanto, PEGilados tanto em partes da membrana quanto a quantidade de PEG é minimizada. Em outra variante, a remoção de PEG é tão completa quanto possível. Enquanto isso é facilmente alcançado pelos lipídios PEG associados à bicamada externa, a difusão não é essencialmente possível para lipídios PEG anexados ao interior da estrutura lipídica. É, portanto, uma modalidade preferida do aspecto (v) da presente invenção prover lipossomas compreendendo imino carregados e lipídios de fosfato

ou carboxila adicionalmente compreendendo lipídios PEGilados, em que os lipídios PEGilados são, essencialmente, situados na superfície externa.

[0064]Tais lipossomas podem ser caracterizados pelo processo de sua produção, em que lipossomas são formados em uma primeira etapa e essa etapa compreende também o encapsulamento de moléculas de carga. Os PEG-lipídios são, então, inseridos na bicamada externa dos lipossomas pré-fabricados em uma segunda etapa, por exemplo, pela adição de uma solução micelar de lipídios PEGilados na suspensão de lipossomas. Em uma modalidade específica de tal processo, os lipossomas sequestram os ácidos nucléicos que são formados misturando uma solução aquosa de ácidos nucléicos com uma solução alcoólica de lipídios. Lipossomas que sequestram ácidos nucléicos são formados espontaneamente e os lipídios PEGilados são adicionados em uma etapa subsequente.

[0065]Com a vantagem particular, tal processo pode ser praticado com lipossomas anfotéricos, uma vez que estes lipossomas já fornecem estabilidade coloidal e um elemento de tempo entre a formação de lipossomas e PEGilação é menos crítico. A preparação de lipossomas anfotéricos que encapsulam ácidos nucléicos é divulgada em WO 02/066012, a sua continuação US2007/0252295 ou ainda em WO 07/107304.

[0066]Em uma modalidade preferida, lipossomas anfotéricos compreendendo lipídios de imino e carbóxi ou fosfato são PEGilados em sua superfície externa, provendo as quantidades necessárias de lipídios PEG juntamente com o tampão de neutralização. Para isso, os lipídios PEG podem ser dissolvidos no tampão de neutralização, em outra modalidade, os lipossomas são formados e neutralizados e os lipídios PEG são adicionados separadamente após um intervalo de tempo entre 0,1s e vários dias. Em ainda outra modalidade, os lipossomas são formados e neutralizado e a suspensão de lipossomas é ainda mais concentrada e os lipídios PEG são adicionados após a concentração dos materiais. Em ainda outra modalidade, os li-

possomas são formados e neutralizados e concentrados e o ácido nucléico não-encapsulado é removido e, opcionalmente, o tampão para a suspensão de lipossomas é trocado e os lipídios PEG são adicionados depois. Em resumo, os lipídios PEG podem ser adicionados a qualquer momento após a formação e o encerramento dos lipossomas.

[0067]Em outras modalidades os lipossomas compreendendo lipídios e imino e carboxila ou fosfato têm pH-sensível de caráter catiônico e são PEGilados em sua superfície externa, fornecendo as quantidades necessárias de lipídios PEG sobre a formação e o encerramento dos referidos lipossomas, seguindo as etapas delineadas acima. Uma vez que lipossomas de pH-sensível são mais propensos a formar agregados na presença de ácidos nucléicos, a PEGilação rápida é preferencial e os lipídios PEG são adicionados imediatamente após o encerramento do lipossomas, por exemplo, entre 0,1 s e 1 min após a sua produção.

[0068]Em contraste com os métodos acima rendendo lipossomas de produto que são essencialmente PEGilados em sua superfície externa, a presença de lipídios PEGilados durante a formação real de lipossomas, isto é, antes das estruturas nascentes próximas, resulta em um produto diferente. Embora os dados estruturais ainda não foram obtidos, o versado na técnica seria de esperar em situação tal que uma quantidade substancial de porções PEG também reside na parte interna da membrana. Isto é similar à situação da carga de ácido nucléico, que também tem acesso a ambas as partes do lipossoma nascente e do qual uma parcela substancial pode ser detectada dentro dos lipossomas, uma vez que estes foram fechados.

### Conjuntos lipídicos

[0069]Os componentes aqui mencionados podem ser montados em várias estruturas conhecidas pelo versado na técnica. Estes podem ser lipossomas compreendendo um ou uma série de bicamadas individuais, outras conjuntos lipídicos supramoleculares ou vesículas tendo um considerável volume interior que provê

uma fase aquosa. Também podem ser gotas de emulsão ou estruturas em forma de assemblies de lipoplex, está último em muitas modalidades compreendendo complexos eletrostáticos entre os lipídios e ácidos nucléicos. Em modalidades preferidas, estas estruturas são lipossomas ou vesículas. Em muitas modalidades, os lipossomas ou vesículas têm um interior aquoso considerável. Em muitos aspectos desta invenção, um ingrediente farmacêutico ativo é complexado, encapsulado, sequestrado ou não associado com os conjuntos lipídicos.

[0070] Dado o grande número de lipídios de fosfato ou imino e carboxila úteis e adicionais, um número muito elevado de combinações potencialmente úteis existe, criando assim uma maior necessidade para a seleção e otimização entre as muitas variantes. WO08/043575 dá orientações específicas e provê um método para a otimização de conjuntos complexos de lipídios, especificamente para bicamadas lipídicas, como discutido em mais detalhes aqui. Em resumo, os ensinamentos WO08/043575 demonstram que misturas de lipídios anfotéricos formam bicamadas estáveis em condições de pH ácido e neutro, no entanto, as bicamadas formadas a partir dessas misturas de lipídios podem sofrer transição de fase e fusão no seu ponto isoelétrico, que normalmente está em condições levemente ácidas. WO08/043575 divulga o uso de grupos cabeça de lipídios de tamanho moderado ou pequeno para os componentes lipídicos carregados. WO 08/043575 também ensina o uso de íons de tampão de grande dimensão ou volumosos para estabilizar as fases lamelares em pH baixo, durante o procedimento de carregamento, bem como o uso de íons de tampão de grande dimensão ou volumosos para estabilizar as fases lamelares em pH neutro durante o armazenamento. Em particular, é feita referência às páginas 44 - 57 de WO 08/043575, que apresentam os elementos essenciais citados acima. A referência adicionalmente divulga o uso de lipídios neutros tendo um tal grupo cabeça pequeno para maximizar a atividade de fusão. Lipídios neutros típico para a fusão melhorada são colesterol ou DOPE. Considerações específicas e regras de otimiza-

ção para os lipídios neutros são ainda apresentadas em WO 09/047006, em particular nas páginas 63 até 70.

[0071]Ao todo, WO 08/043575 ou WO 09/047006, referidos em conjunto como "Referências" aqui proveem orientação racional para a otimização dos conjuntos lipídicos. As referências não são restritas a lipossomas anfotéricos, mas proveem um modelo abrangente para a relação estrutura - atividade de conjuntos lipídicos.

[0072]A presente invenção representa um avanço na técnica, uma vez que provê métodos otimizados de formulação de lipossomas, que são capazes de contornar ligação celular, interação ou competição com lipoproteínas ou outros componentes do soro. Embora os métodos ensinados por referências provejam as informações necessárias para a fusogenicidade dos conjuntos lipídicos, eles ficam em silêncio com relação a uma previsão da ligação celular dos lipossomas.

[0073]Assim, é um objeto da presente invenção para prover conjuntos lipídicos, misturas de lipídios, e lipossomas formulados pelo método divulgado nas referências em combinação com as propriedades inesperadas observadas quando se utiliza um lipídio de imino que é substancialmente carregado em condições fisiológicas é usado em combinação com um lipídio aniónico tendo uma carboxila ou fosfato, ou seja, porção negativamente carregada. Sem querer se comprometer com a teoria, as novas composições formuladas neste documento podem facilitar uma melhor ligação celular tipo proteína e absorção - uma característica que não é conhecida na técnica.

[0074]As misturas de lipídios descritas aqui podem ter propriedades catiônicas de pH sensível ou anfotéricas, ambas as quais são geralmente transportadas para os conjuntos lipídicos ou lipossomas pelos lipídios que as formam. Propriedades de carga podem facilmente ser previsíveis, conforme descrito no WO 02/066012 para uma distribuição simétrica dos lipídios para ambos os folhetos de uma membrana lipídica ou bicamadas. No entanto, em alguns casos, a distribuição de lipídios

do folheto ultraperiférico pode ser diferente de outras partes do conjunto. Macroscopicamente, as misturas de lipídios compreendendo lipídios de imino carregados em combinação com lipídios de carboxila ou fosfato tendo C/A de alguma maneira maior do que 1 pode, portanto, ainda formar lipossomas tendo caráter anfotérico, como demonstrado no exemplo 9 e figura 1.

[0075]Para fins de otimização em em silício e previsão, misturas de lipídios da presente invenção tendo uma C/A < 1 são consideradas anfotéricas e podem formar conjuntos lipídicos classificadas como misturas "amphoteric I" de acordo com a classificação das referências. Em outras modalidades, as misturas de lipídios são usadas que têm C/A = 1 ou C/A > 1, que são misturas de lipídios catiônicos de pH sensível, que a sua carga é neutra ou catiônica em pH fisiológico e se torna mais catiônica com pH decrescente. As misturas sensíveis ao pH catiônico das modalidades que não tem mais um ponto isoelétrico, como é o caso com os seus homólogos anfotéricos. Ainda assim, as relações estrutura-atividade providas nas referências são aplicáveis àquelas desde que uma compreensão universal do comportamento de fase de conjuntos lipídicos em combinação com íons de soluto e independentemente da sua carga.

[0076]Por razões de clareza, as misturas de lipídios da presente invenção compreendem um ou mais lipídios catiônicos tendo um grupo imino que é substancialmente carregado em pH fisiológico, adicionalmente compreendendo um ou mais lipídios aniónicos tendo um grupo carboxila ou fosfato, opcionalmente compreendendo lipídios neutros.

[0077]O caráter anfotérico dos lipossomas tem outras vantagens. A carga de superfície negativa de tais lipossomas ou conjuntos de lipídios melhora muito a estabilidade coloidal dos lipossomas em suspensão. Isto é de particular importância em combinações com cargas polianiónicas tais como ácidos nucléicos, que facilmente produzem agregados com lipossomas catiônicos.

[0078]A carga de superfície negativa neutra para as conjuntos lipídicos ou lipossomas anfotéricos também é vantajosa quando administradas a lipossomas in vivo, em que ela impede a adsorção inespecífica no endotélio ou a formação de agregados com componentes do soro, como observado com lipossomas catiônicos (ver Santel et al. (2006) em Gene Therapy 13: 1222-1234 para adsorção endotelial dos lipossomas catiônicos ou Andreakos et AL., (2009) em Arthritis and Rheumatism, 60:994-1005 para a prevenção da formação de agregados com lipossomas anfotéricos).

[0079]Assim, em modalidades preferidas, os lipossomas desta invenção têm caráter anfotérico. Dentro desse grupo, é vantajoso evitar percentagens muito baixas do componente catiônico para manter o carregamento eficaz de partículas com cargas polianiônicas, por exemplo, ácidos nucléicos. Em outras modalidades preferidas, o C/A é maior de 0,5.

[0080]Quando aplicados sistemicamente, isto é, na corrente sanguínea, os lipossomas passam por uma certa distribuição dentro do corpo. Locais de destino típicos são fígado e baço, mas também incluem as células circulantes fagocitárias. Os lipossomas também entram em contato com o endotélio em torno dos vasos sanguíneos e podem transfectar essas células. A acumulação de lipossomas em locais inflamados e tumores é de relevância terapêutica particular.

[0081]O versado na técnica iria apreciar métodos para direcionar a distribuição de partículas em direção a um ou a outro sítio. É bem conhecido que os lipossomas tendo um pequeno diâmetro de cerca de 150 nm ou menos podem penetrar no endotélio do fígado, ganhando assim acesso à hepatócitos e outras células do fígado parênquimo. Em aspectos em que a focalização dos hepatócitos do fígado é de interesse terapêutico, os lipossomas desta invenção podem ser de 150 nm ou menos de diâmetro, em modalidades preferidas, os lipossomas podem ser inferior a 120 nm de diâmetro.

[0082]Também é sabido que as partículas com um diâmetro de 100 nm ou mais são bem reconhecidas por células fagocíticas. Portanto, em modalidades em que macrófagos ou células dendríticas constituem o alvo de interesse, os lipossomas desta invenção são 120 nm ou maior. Em algumas modalidades, estes lipossomas são 150 nm ou maior. Em outras modalidades esses lipossomas podem ser tão grandes como 250 nm, ou até 400 nm de tamanho.

[0083]Também tem sido descrito que a carga de superfície pode influenciar o tempo de circulação, portanto a biodistribuição de lipossomas é bem estabelecido que PEGilação reduz a carga de superfície e os resultados em circulação prolongada dos lipossomas. Circulação prolongada é geralmente pensada para maximizar a distribuição para tumores. Portanto, nos aspectos em que os tumores constituem o alvo de interesse, os lipossomas desta invenção têm uma carga de superfície líquida pequena e são caracterizados por um C / A entre 0,67 e 1,5. Em modalidades preferidas para aplicações como as misturas de lipídios formando os lipossomas têm um C/A entre 0,8 e 1,25. Além disso, os lipossomas visando tumores são de tamanho pequeno. Em modalidades preferidas, tais lipossomas são menores do que 150 nm, em outras modalidades preferidas, os lipossomas são menores do que 120 nm. Em algumas modalidades, os lipossomas ainda compreendem lipídios PEG.

#### *Cargas para os Lipossomas desta Invenção*

[0084]Os lipossomas ou conjuntos de lipídios desta invenção podem sequstrar ou encapsular pelo menos um agente ativo. O agente ativo pode incluir um fármaco. Em algumas modalidades, o agente ativo pode incluir um ou mais ácidos nucléicos. Em modalidades preferidas, o ingrediente ativo é composto de ácidos nucléicos.

[0085]Sem ser limitada a utilização, os lipossomas ou conjuntos lipídicos descritos na presente invenção são bem adequados para uso como veículos para fármacos baseados em ácido nucléico, tais como por exemplo, oligonucleotídeos,

polinucleotídeos e plasmídeos de DNA. Estes fármacos são classificados em ácidos nucléicos que codificam uma ou mais sequências específicas de proteínas, polipeptídeos ou RNAs e em oligonucleotídeos que especificamente podem regular os níveis de expressão da proteína ou afetar a estrutura da proteína por meio, inter alia, interferência com emendas e truncamento artificial.

[0086]Em algumas modalidades da presente invenção, portanto, a terapêutica à base de ácido nucléico pode incluir um ácido nucléico que é capaz de ser transcrito em uma célula de vertebrados em um ou mais RNAs, cujos RNAs podem ser mRNAs, shRNAs, miRNAs ou piRNA, em que tais mRNAs codificam para uma ou mais proteínas ou polipeptídeos. Tal terapêutica de ácido nucléico pode ser plasmídeos de DNA circulante, construtos de DNA linear, como vetores MIDGE (Expressão Gênica imunogenicamente definida minimálistica) conforme divulgado em WO 98/21322 ou DE 19.753.182, ou mRNAs pronto para a tradução (por exemplo, EP 1392341).

[0087]Em outras modalidades da invenção, oligonucleotídeos podem ser usados que podem ser existentes em ácidos nucléicos ou proteínas intracelulares. Os ácidos nucléicos podem codificar um gene específico, de tal forma que o oligonucleotídeo é adaptado para atenuar ou modular a transcrição, modificar o processamento da transcrição ou interferir com a expressão da proteína. O termo "ácido nucléico alvo" engloba DNA de codificação de um gene específico, bem como todos os RNAs derivados de DNA tal, sendo pré-mRNA ou mRNA. A hibridização específica entre o ácido nucléico alvo e um ou mais oligonucleotídeos dirigidos contra sequências podem resultar em uma inibição ou modulação da expressão da proteína. Para alcançar alvos específicos, o oligonucleotídeo deve adequadamente compreender um trecho contínuo de nucleotídeos que é substancialmente complementar à sequência do ácido nucléico alvo.

[0088]Oligonucleotídeos que preencham os critérios acima referidos podem

ser construídos com vários diferentes testes e topologias. Os oligonucleotídeos podem compreender nucleosídeos que ocorrem naturalmente ou modificados compreendendo, mas não limitados a, DNA, RNA, ácidos nucléicos bloqueados (LNA), ácidos nucléicos desbloqueados (UNA's), RNA 2'O-metil (2'OMe), RNA 2' O-metoxietil (2'MOE) em suas formas de fosfato ou fosfotioato ou Morfolinos ou ácidos nucléicos de peptídeo (PNA). Oligonucleotídeos podem ser de único filamento ou duplo filamento.

[0089]Oligonucleotídeos são estruturas polianiônicas tendo 8-60 cargas. Na maioria dos casos, estas estruturas são polímeros compreendendo nucleotídeos. A presente invenção não se limita a um mecanismo específico de ação dos oligonucleotídeos e uma compreensão do mecanismo não é necessária para praticar a presente invenção. Os mecanismos de ação de oligonucleotídeos podem variar e podem compreender efeitos, designadamente, na junção, transcrição, transporte cito-plasmático nuclear e tradução.

[0090]Em uma modalidade preferida da invenção, oligonucleotídeos de único filamento podem ser usados, incluindo, mas não limitados a oligonucleotídeos com base em DNA, ácidos nucléicos bloqueados, 2'-oligonucleotídeos modificados e outros, comumente conhecidos como oligonucleotídeos antisentido. Estrutura principal ou modificações de bases ou açúcar podem incluir, mas não estão limitadas a, DNA de Fosfotioate (PTO), RNA de 2'O-metil (2'OMe), RNA 2'Fluoro (2'F), 2'O-metoxietil-RNA (2'MOE), ácidos nucléicos de peptídeo (PNA), N3'-P5' fosfoamidatos (NP), ácidos nucléicos 2'fluoroarabino (FAN), ácidos nucléicos bloqueados (LNA), ácidos nucléicos desbloqueados (UNA), fosfoamidato de morfolina (Morfolino), ácido nucléico de ciclohexeno (CENA), triciclo-DNA (tcDNA) e outros. Além disso, químicas misturadas são conhecidas na técnica, sendo construídas a partir de mais de uma espécie de único nucleotídeo como copolímeros em bloco copolímeros ou gapmers ou em outras disposições.

[0091] Além dos oligonucleotídeos acima mencionados, a expressão da proteína também pode ser inibida usando o dobro de moléculas RNA de filamento duplo contendo os motivos de sequência complementar. Tais moléculas de RNA são conhecidas como moléculas de siRNA na área (por exemplo, WO 99/32619 ou WO 02/055693). Outros SiRNAs compreendem siRNAs de único filamento ou siRNAs de duplo filamento tendo um filamento não-contínua. Mais uma vez, vários químicos foram adaptados a esta classe de oligonucleotídeos. Além disso, sistemas híbridos DNA / RNA são conhecidos na técnica. Outras variedades de siRNA compreendem construtos de três filamentos em que dois filamentos menores hibridizam para um filamento comum mais longo, o assim chamado merodúplex ou sisiRNA tendo intervalos ou lacunas em sua arquitetura.

[0092] Em uma outra modalidade da presente invenção, oligonucleotídeos decoy podem ser usados. Estas moléculas de DNA duplo filamento e modificações químicas das mesmas não têm como alvo os ácidos nucléicos, mas fatores de transcrição. Isto significa que se proteínas de ligação de DNA específicas de sequência de ligação de oligonucleotídeos decoy e interferem com a transcrição (por exemplo, Cho-Chung, et al., em Curr. Opin. Mol. Ther., 1999).

[0093] Em uma modalidade adicional da invenção, oligonucleotídeos que podem influenciar a transcrição de hibridação em condições fisiológicas para a região promotora de um gene pode ser usado. Mais uma vez, químicos diversos podem se adaptar a essa classe de oligonucleotídeos.

[0094] Em uma alternativa adicional da invenção, DNAzimas podem ser usados. DNAzymes são oligonucleotídeos de único filamento e modificações químicas dos mesmos com atividade enzimática. DNAzimas típicos, conhecidos como o modelo "10-23", são capazes de clivar RNA de único filamento em locais específicos sob condições fisiológicas. O modelo de 10-23 de DNAzimas tem um domínio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos altamente conservados, flanqueados por domínios

de dois substratos de reconhecimento complementares a uma sequência alvo no RNA. Clivagem da mRNAs alvo pode resultar em sua destruição e a DNAzymes recicla e cliva múltiplos substratos.

[0095]Em ainda outra modalidade da invenção, ribozimas podem ser usadas. Ribozimas são oligorribonucleotídeos de único filamento e modificações químicas das mesmas com atividade enzimática. Elas podem ser operacionalmente divididas em duas componentes, uma estrutura de loop-tronco conservadas formando o núcleo catalítico e de sequências de flanqueamento que são complementares às sequências inversas em torno do sítio de destino em uma dada transcrição RNA. Sequências de flanqueamento podem conferir especificidade e podem geralmente constituir 14-16 nt no total, estendendo-se em ambos os lados do sítio de destino selecionado.

[0096]Em outras modalidades da invenção, aptâmeros podem ser usados para direcionar proteínas. Aptâmeros são macromoléculas compostas por ácidos nucléicos, tais como RNA ou DNA, modificações químicas dos mesmos que se ligam firmemente a um alvo molecular específico e são tipicamente 15-60 nt de comprimento. A cadeia de nucleotídeos pode formar interações intramoleculares que dobram a molécula em uma forma tridimensional complexa. A forma do aptâmero permite que ela se une firmemente contra a superfície da sua molécula alvo, incluindo, mas não limitada a proteínas ácidas, proteínas básicas, proteínas de membrana, fatores de transcrição e enzimas. Ligação de moléculas de aptâmero pode influenciar a função de uma molécula alvo.

[0097]Todos os oligonucleotídeos acima mencionados podem variar de comprimento entre o mínimo de 5 ou 10, de preferência 15 e ainda mais de preferência 18, e tantos quanto 50 ou 60, de preferência 30 e mais preferivelmente 25 de nucleotídeos por filamento. Mais especificamente, os oligonucleotídeos podem ser oligonucleotídeos antissentido de 8- a 50 nucleotídeos de comprimento que catali-

sam a degradação mediada por RNaseH de sua sequência alvo ou tradução bloqueiam ou redirecionam junção ou agem como antagonistas, que podem ser siRNAs de 15 a 30 pares de bases de comprimento, ou eles podem ainda representar oligonucleotídeos decoy de 15 a 30 pares de bases de comprimento. Alternativamente, eles podem ser oligonucleotídeos complementares que influenciam a transcrição do DNA genômico de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, eles podem ainda representar DNAzimas de 25 a 50 nucleotídeos de comprimento ou ribozimas de 25 a 50 nucleotídeos de comprimento ou aptâmeros de 15 a 60 nucleotídeos de comprimento. Tais subclasse de oligonucleotídeos são muitas vezes funcionalmente definidas e podem ser idênticas ou diferentes ou compartilham algumas, mas não todas, as características de sua natureza química ou arquitetura sem afetar substancialmente os ensinamentos da presente invenção. O ajuste entre o oligonucleotídeo e a sequência alvo é preferencialmente perfeita com cada base do oligonucleotídeo formando um par de base com a sua base complementar sobre o ácido nucléico alvo ao longo de um trecho contínuo do número acima referido de oligonucleotídeos. O par de sequências pode conter uma ou mais diferenças dentro do referido trecho contínuo de pares de base, embora isso seja menos preferido. Em geral, a composição química do tipo e como ácidos nucléicos é de pouco impacto para o desempenho dos lipossomas da invenção como veículos seja *in vivo* ou *in vitro*, - e o versado na técnica pode descobrir outros tipos de oligonucleotídeos ou ácidos nucléicos adequados para combinação com os lipossomas anfotéricos da invenção.

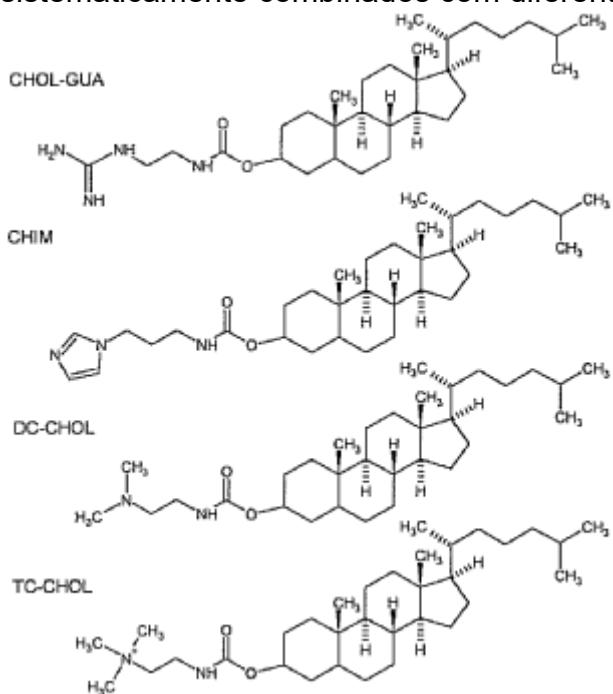
[0098]Em certos aspectos e, como demonstrado aqui, os lipossomas de acordo com a presente invenção são úteis para transfecção de células *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

#### *Modalidades Específicas*

##### **Lipídios baseados em Colesterol**

[0099]Para ilustrar os ensinamentos da presente invenção, derivados catiô-

nicos de porções de colesterol compreendendo porções guanido (grupo imino carregado, CHOL-GUA) porções imidazol (grupo imino não carregado, CHIM) ou dimetilamino ou porções de trimetil amônio (grupos não-imino, mas carregados, DC-CHOL ou TC-CHOL) foram sistematicamente combinados com diferentes lipídios aniónicos.



[00100] Os lipídios aniónicos utilizados foram CHEMS (colesterol como parte hidrofóbica, grupo responsável carboxílico), DMGS ou DOGS (porção hidrofóbica de diacilgliceróis, grupo de carga de ácido carboxílico) ou DOPA (glicerol diacil como grupos hidrofóbicos, grupo de carga de éster de fosfato). Para a maioria das combinações de cátion / ânion, uma série de 8 misturas binárias tendo relações C/A entre 0,33 e 2 foi preparada, as combinações dos lipídios catiônicos com DOPA foram testadas em C/A 0,75 e 1. Colesterol foi adicionado em todas as misturas de lipídios para constituir entre 20 e 40% em mol, como indicado.

[00101] Todos os lipossomas foram carregados com siRNA PLK-1, um oligonucleotídeo capaz de inibir a produção da quinase do ciclo celular PLK-1 e transfecção de sucesso foi medida pela inibição da viabilidade celular das células de teste (ver também Haupenthal et al., Int. J. Cancer (2007), 121:206-210. Inibição inespecíficas da viabilidade celular, isto é, efeitos citotóxicos, foram monitorados por prepa-

rações de controlo compreendendo um siRNA não-alvo da mesma composição geral e nas mesmas quantidades.

[00102]A transfecção de células foi seguida em meio de cultura de células normais ou com a presença adicional de 10% do soro do camundongo, um potente inibidor da captação celular de muitos lipossomas anfotéricos. A eficácia de transfecção é expressa como IC<sub>50</sub>, a concentração necessária para alcançar uma inibição de 50% da viabilidade celular.

[00103]A relação entre o IC<sub>50</sub> em meio regular e o IC<sub>50</sub> com a adição de soro de camundongo é usada como uma métrica para a inibição da captação celular pelo soro do camundongo. Esta relação é de 5 ou superior para lipossomas sem propriedades específicas visando, é 5 ou menor para os lipossomas desta invenção, isto é, lipossomas compreendendo grupos imino carregados em combinação com lipídios carregados negativamente.

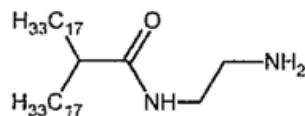
[00104]Como demonstrado adicionalmente nos exemplos 14, a melhor transfecção resistente a soro de células HeLa pode ser alcançada por combinações de CHOLGUA com os DOGS de lipídios de carboxila. Especialmente bons resultados foram obtidos na presença de menos de 40% de colesterol e misturas tendo um C/A de entre 0,5 e 1,5. Se todos os outros componentes, tais como DOGS ou colesterol foram mantidos constantes e o grupo cabeça GUA foi trocado contra uma dimetilamina como no DC-CHOL, os lipossomas ainda estão ativos na ausência, mas não na presença de soro de camundongo. O mesmo pode ser observado para combinações de CHIM e DMGS.

[00105]Combinações de lipídios catiônicos baseados em colesterol com o DOPA lipídico de fosfato lembram as descobertas em que as melhores atividades foram observadas para a CHOLGUA lipídica de imino. Além disso, o soro resistente a transfecção de CHOLGUA: DOPA lipossomas pode ser observado, embora com uma inibição substancial em comparação com a ausência de soro. Combinações

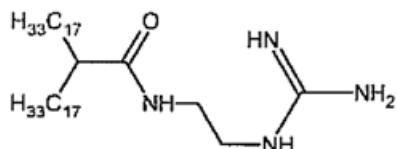
para DOPA com CHIM ou DC-CHOL não resultou em qualquer transfecção na presença de soro.

#### Lipídios baseados em DACA

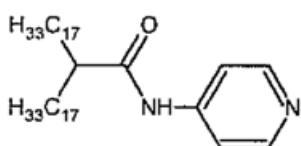
[00106] Para adicionalmente investigar a dependência da transfecção resistentes a soro da química de grupo cabeça, os lipídios foram sintetizados usando um âncora ácido carboxílico dialquila comum (DACA) como seu domínio hidrofóbico:



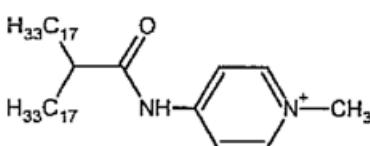
ADACA (Amino-DACA)



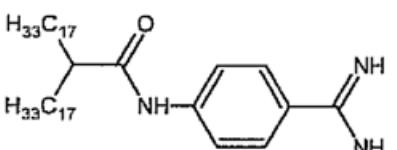
GUADACA (Guanidino-DACA)



PDACA (Pirimidil-DACA)

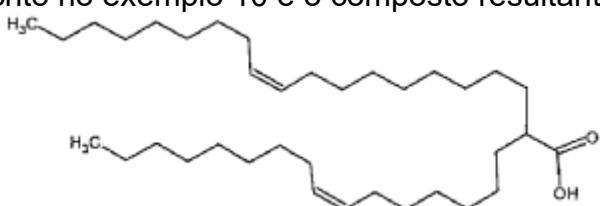


MPDACA (Metilpirimidil-DACA)



BADACA (Benzamindin-DACA)

[00107] Em que a porção DACA foi obtida pela adição de ácido oléico para oleiliodeto como descrito no exemplo 10 e o composto resultante é:



DACA – ácido dialquil-carboxílico

[00108] Fora dos lipídios catiônicos, GUADACA, MPDACA ou BADACA têm

uma porção imino carregada em seus grupos cabeça polares. O grupo cabeça de PDACA é essencialmente sem carga, devido ao baixo pK da porção piridina (pK calculado é 5,9), enquanto a variante metilada resulta na formação do composto piridínio constantemente carregada MPDACA. ADACA tem um pK suficientemente alto de cerca de 9, mas falta o componente imino. No entanto, pequenas quantidades de enamina respectiva podem se formar a partir desse componente como o grupo amino está situado na posição D a partir do amido, permitindo a estabilização mesomérica da forma imina.

[00109]Combinações com os lipídios aniónicos, CHEMS, DMGS, DOGS e DOPA foram preparadas como descrito acima para os lipídios baseados em colesterol série semelhante de diferentes lipossomas tendo várias relações C/A entre 0,33 e 2 (ou 0,75 e 1 para o fosfato de lipídios) foram produzidos.

[00110]Além disso, os lipossomas foram carregados com siRNA alvo PLK-1 ou uma sequência não relacionada e as propriedades de transfecção foram testadas em células HeLa, na presença ou ausência de soro de camundongo.

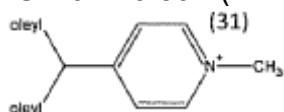
[00111]Como demonstrado em outros exemplos 14 e 15, o soro resistente a transfecção de células HeLa pode ser alcançado por combinações de GUADACA ou MPDACA com lipídios ou lipídios de carboxila ou fosfato. Além disso, estes lipídios rendem transfecção muito eficiente de PLK-1 siRNA também na ausência de soro. Isto implica que não há ativação dos lipossomas com componentes do soro como descrito recentemente para lipossomas tendo um grupo cabeça dimetilamino (Akinc et al, Mol. Ther (2010) publicação eletrônica em 11 de maio, ahead of print DOI: 10.1038/mt.2010.85). Níveis muito elevados de atividade do veículo são também observados para relações C/A entre 0,5 e 1,5 para as combinações com os lipídios carboxílicos e para C/A. 0,75 ou 1 para os lipídios de fosfato. Em muitos destes casos, as formulações têm propriedades de carga anfotérica.

[00112]A falta de metilação do composto de piridínio MPDACA dá a PDACA

relacionada. Embora ainda portando uma função imina, esta função não é mais carregada como em MPDACA; PDACA também não é ativo como lipídios catiônicos para fins de transfecção. Em uma outra variante o anel aromático do grupo cabeça foi mantido, mas a imina carregada foi então apresentada como parte de um grupo aminida extra-anular. Este composto foi encontrado ativo como um lipídio de transfecção, por exemplo, em combinações com CHEMS ou DMGS em que também resultou em transfecção resistente a soro.

Lipídios Adicionais com Base em Ácidos Dialquilcarboxílico.

[00113]Achados semelhantes foram feitos usando o lipídio de piridínio SAINT-18, conforme descrito em US 6.726.894 (estrutura 31).



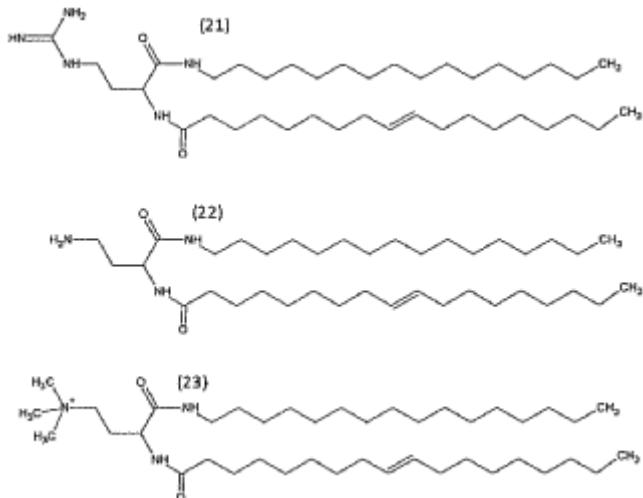
[00114] SAINT-18 foi combinado com vários ânions de lipídios, tal como CHEMS, DMGS ou DOGS. As razões dos lipídios catiônicos e aniónicos foram variadas de forma sistemática e as misturas binárias resultantes opcionalmente foram ainda providas com 20 ou 40% em mol do colesterol. As misturas de lipídios individuais foram transformadas em lipossomas e usadas para o encapsulamento de um siRNA ativo e controle. Quando testado em células HeLa, na presença de meio normal de cultura celular, inibição eficiente e específica da viabilidade celular foi observada para inúmeras as formulações testadas, conforme demonstrado no Exemplo 8. No entanto, nenhum dos lipossomas tendo um C/A  $\geq 1$  rendeu a transfecção de células na presença de soro de camundongo. Em contraste, um grande número de formulações anfotéricas resistiu ao desafio de soro e fez transfecção das células de forma eficaz. Além disso, o efeito foi específico para o siRNA PLK-1 e concentrações muito mais elevadas de lipossomas carregados com um siRNA não relacionado (SCR) foram necessárias para inibir a proliferação celular não específica. Os melhores resultados foram obtidos usando SAINT18 em combinação com DMGS. Lipossomas compreendendo SAINT-18 e DMGS, adicionalmente caracterizados por C/A

<1, portanto, dentro da competência desta invenção.

*Lipídios de amino à base de ácido*

[00115]Para ilustrar adicionalmente os ensinamentos da presente invenção, os lipídios de guanido catiônicos PONA (palmitoil-oleoil-nor-arginina, estrutura 21) foram combinados com vários ânions de lipídios, tais como CHEMS ou DMGS. As razões dos lipídios catiônicos e aniônicos foram variadas de forma sistemática e as misturas binárias resultantes foram adicionalmente providas opcionalmente com 20% em mol de colesterol. As misturas de lipídios individuais foram transformadas em lipossomas e usadas para o encapsulamento de um siRNA ativo e controle. Quando testado em células HeLa, a inibição eficiente e específica da viabilidade celular foi observada para a maioria das formulações testadas, conforme demonstrado no Exemplo 5. A atividade não foi ou foi apenas marginalmente afetada pela presença de soro humano ou camundongo.

[00116]No Exemplo 6, o CHEMS lipídico aniônico foi combinado com derivados de PONA, em que a porção guanido foi substituída por um grupo amino (PO-Namina) ou um grupo amônio quarternizado (PONamônio), como mostrado nas estruturas (21) e (23).



[00117]Mais uma vez, as relações entre os componentes lipídicos aniônicos e catiônicos foram sistematicamente variadas e 20% de colesterol estava presente em todas as misturas de lipídios. O material foi formulado em lipossomas e usado

para o encapsulamento de siRNA ativo e controle. Quando testado em células HeLa, a inibição eficiente e específica da viabilidade celular foi observada para todas as formulações contendo um excesso molar dos lipídios catiônicos. Para misturas compreendendo quantidades molares mais elevadas do CHEMS lipídico aniónico, a melhor atividade foi observada em combinações com PONA, enquanto PONamina: combinações CHEMS só foram eficazes em alguns casos. As combinações PONamônioCHEMS não foram eficazes quando um excesso de lipídios aniónicos foi usado.

[00118]Além disso, fora das misturas compreendendo um excesso de lipídios CHEMS aniónico, a atividade de transfecção do PONA: combinações CHEMS foi apenas marginalmente afetada pela presença de soro humanos ou de camundongo, enquanto a atividade de PONamina: combinações CHEMS foi concluída suprimida na presença de soro de camundongo. As formulações PONamônio permaneceram inativas na presença de soros.

[00119]Combinações de PONA, PONamina ou PONamônio com os lipídios de fosfato DOPA também foram testados como descrito no exemplo 15. Ambos PONA e PONamina, mas não resultou em soro PONamônio resistente a transfecção de células HeLa.

[00120]Os dados combinados suportam uma captação preferencial de combinações lipídicas compreendendo lipídios de guanido em combinação com carga negativa, por exemplo, lipídios de carboxila ou fosfato. Isto pode estar relacionado às considerações mecanicista feitas mais adiante. A atividade constante e elevada das formulações tendo um excesso do componente de lipídios catiônicos pode ser devido à interação eletrostática entre essas partículas e a superfície da célula, que, no entanto, é inespecífica. Em linha com esta visão é o fato de que a atividade das formulações catiônicas não depende tanto da natureza dos lipídios aniónicos ou catiônicos.

[00121] Em outros experimentos, os lipídios de guanido PONA foram combinados com CHEMS, DMGS ou DOGS. Mais uma vez, uma variação sistemática das razões de ambos os compostos lipídicos aniónicos e catiônicos nas respectivas misturas binárias foi realizada e as formulações foram ainda providas com 0, 20 ou 40% em mol de colesterol. Quando testadas como acima, a grande maioria das formulações foram ativas na proliferação de células na inibição de células HeLa com um IC<sub>50</sub> sendo inferior a 6 nM (ver Exemplo 7). Uma comparação entre as concentrações necessárias para a eficácia do siRNA ativo e inativo, no entanto, revelou diferenças significativas entre as formulações. A medida de comparação, é a relação entre os valores IC<sub>50</sub> para ambos de siRNA, aqui expresso como relação SCR / PLK. Apenas formulações selecionadas alcançam valores significativamente maiores do que 5. Formulações ainda mais preferidas têm SCR / PLK > = 10. Todas estas formulações preferidas podem ser caracterizadas por sua relação entre o componente lipídico catiônico e aniónico, que é inferior a 1.

[00122] Esta invenção identifica química específica de grupos cabeça de lipídios como crítica para a captação em certas células na presença de soros de outra forma inibitória. Com preferência, combinações anfotéricas de lipídios aniónicos compreendendo grupos carboxílicos e lipídios catiônicos compreendendo porções imino carregadas resultam nas propriedades desejadas. Em contraste, as formulações compreendendo os mesmos lipídios catiônicos não dependem de uma química específica de grupo cabeça e são menos toleradas pelas células.

#### Ligação de Lipoproteína

[00123] As lipoproteínas competindo com a transfecção de lipossomas incluem uma variedade de estruturas, de acordo com sua densidade. Estas são conhecidas como os quilomícrons, partículas VLDL, LDL, IDL ou HDL. Na via endógena, os quilomícrons são sintetizados no revestimento epitelial do intestino delgado e são montados usando ApoB-48, uma variante mais curta do produto do gene ApoB. Mai-

or intercâmbio de lipoproteínas com partículas de HDL conduz a transferência de ApoC-II e ApoE à partícula de quilomícrone, o primeiro mediador da ativação da lipoproteína lipase, uma enzima necessária para a liberação de lipídios da partícula. Os quilomícrone hidrolizados assim chamados remanescentes que são absorvidos principalmente no fígado via reconhecimento da sua parte ApoE. A síntese, maturação, uso e reciclagem de partículas de VLDL seguem o mesmo caminho, mas começa no fígado e está usando a proteína ApoB-100 como unidade de formação de estrutura. Mais uma vez, ApoE medeia a captação eventual e reciclagem dos VLDL remanescentes, as partículas chamadas IDL, (ver também <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein>).

[00124] ApoE divide homologia estrutural nas apolipoproteínas A e C, em que todos eles compreendem repetições anfipáticas em tandem de 11 aminoácidos. Dados cristalográficos confirmam a existência de estruturas helicoidais anfipáticas estendida para fragmento de ApoE e ApoA-I e também revelam uma organização de carga misturada na face polar destas hélices. Estes dados estão disponíveis ao público a partir do Protein Data Bank RCSB (disponível em [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) e entrada 1AV1.pdb dá a estrutura da proteína de ApoA-I. Os aminoácidos 129-166 de Hpe.pdb representam o fragmento de ligação LDL receptor de ApoE. Em contraste com a sua semelhança geral, as três apolipoproteínas mostram desvios específicos quando a sua composição de aminoácidos é analisada. Em ApoE, arginina é o aminoácido catiônico prevalecente nas repetições tandem. Em contraste, ApoA tem quantidades iguais de lisina e arginina, enquanto ApoC tem um excesso de resíduos de lisina.

Tabela 3: Análise da composição de aminoácidos em repetições em tandem de apolipoproteínas relacionadas. Sequência de dados foram obtidas a partir da Swiss-Protavailable em [www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html](http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html)).

Sequência	ApoA-I	ApoE	ApoC-II
-----------	--------	------	---------

Entrada SwissProt	P02647	P02649	P02655
Ponto final	68 - 267	80 – 255	23 - 101
Extensão	199	175	78
IP	5,55	9,16	4,66
Nº de lisina	18	8	6
Nº de arginina	14	25	1
Nº de Histidina	5	1	0
Nº de ácido aspártico	10	8	4
Nº de ácido glutâmico	28	22	7
	ApoAI	ApoE	ApoC-II
Lisina (%)	9%	5%	8%
Arginina (%)	7%	14%	1%
Histidina (%)	3%	1%	0%
Ácido aspártico (%)	5%	5%	5%
Ácido glutâmico (%)	14%	13%	9%

[00125]Em resumo, a superfície polar de lipoproteínas naturais é coberta com apolipoproteínas, das quais ApoE é um motivo de ligação comum para a captação celular dessas partículas. As porções de água exposta do ApoE representam um mosaico de cargas aniónicas e catiônicas, em que as cargas aniónicas são criadas a partir dos terminais carboxila livres de resíduos de ácido aspártico e glutâmico. As cargas catiônicas compreendem uma mistura de grupos amino e guanido com muitos poucos imidazois. Estando presentes

[00126]A fim de imitar o padrão de reconhecimento do cassete de ligação ApoE na superfície de lipossomas, diferentes alternativas podem ser seguidas. É

possível sintetizar fragmento de peptídeo ApoE e enxertar tais peptídeos na superfície de lipossomas. Isto tem sido demonstrado por Mims et al., J Biol. Chem. 269, 20539 (1994); Rensen et al, Mol Pharmacol. 52, 445 (1997); Rensen et al, J. Lipid Res. 38, 1070 (1997);. Sauer et al t Biochemistry 44, 2021 (2005) ou Versluis et al, J Pharmacol. Exp. Há 289, 1 (1999). No entanto, o alto custo associado com a síntese de peptídeos e derivatização chamada para abordagens alternativas.

[00127]Uma apresentação direta das porções carregadas requeridas utilizando misturas de diferentes lipídios carregadas, potencialmente compreendendo adicionalmente lipídios neutros produziria uma estrutura muito mais simples e eliminaria as necessidades para a produção de peptídeo oneroso e derivatização. Um desafio considerável desse tipo de abordagem é a difusão planar dos grupos carregados dentro da bicamada lipídica, que até então não está clara se a afinidade de uma assemblie menos organizada efetivamente compete com as afinidades providas pelas lipoproteínas autênticas. Além disso, os grupos cabeça de lipídios carregados de forma oposta podem formar pontes de sal uns com os outros, enquanto as ligações de hidrogênio entre os poucos grupos funcionais são detectadas no cassete de ligação das lipoproteínas, por exemplo, ApoE. Isto pode explicar a atividade de imino: combinações de lipídios de fosfato, como GUADACA: DOPA ou MPDACA: DOPA. Enquanto DOPA provê duas cargas negativas em condições fisiológicas, impedimento estérico desativa a formação de um sal de um DOPA e dois lipídios GUADACA. Como tal, nestas membranas o sal carregado negativamente entre DOPA e GUADACA deve co-existir com moléculas GUADACA livres, assim, facilitando a presença simultânea de elementos separados aniónicos e catiônicos em um conjunto de lipídios comum.

[00128]A teoria acima é mencionada sem limitar os resultados desta invenção. Sem querer estar ligado a esta teoria em particular, pode-se supor que as combinações de lipídios de imino carregado com lipídios de carboxila carregados negati-

vamente ou fosfato de imitar as propriedades da superfície das lipoproteínas cobertas com ApoE. As partículas podem naturalmente ser utilizadas, desenvolvidas e otimizadas, sem esse conhecimento. O pano de fundo teórico pode, no entanto ser útil para entender os princípios orientadores ou aplicabilidade dos vetores descritos nas modalidades diferentes desta invenção.

[00129]Por exemplo, é sabido, que os receptores de lipoproteínas têm perfis de expressão em vários tipos células e esse conhecimento pode ser usado para avaliar populações de célula alvo para os lipossomas desta invenção.

[00130]O LDL-receptor é altamente expresso em tumores e nas células broncoepiteliais do pulmão (ver Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al (2004) Proc Natl Acad Sci EUA 101 (16):6062 - 7, também publicado em [http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBBj3E\\_LDLR\\_202068\\_s\\_at\\_tn.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBBj3E_LDLR_202068_s_at_tn.png))

[00131]Os lipossomas desta invenção são, portanto, especificamente adaptados para aplicações no campo da oncologia, mas também para a transfecção de células específicas de pulmão. Enquanto os tumores são acessíveis a partir circulação sistêmica através do efeito EPR (permeabilidade aumentada e retenção), que é através de vascularização tumoral com vazamento, as células broncoepiteliais podem ser alvo também das vias aéreas.

[00132]Em uma modalidade específica desta invenção, aerossóis de lipossomas compreendendo lipídios de carboxila e imino carregados ou fosfato são, portanto, utilizados para as formas de dosagem inaladas para o direcionamento das células pulmonares, em particular as células broncoepiteliais.

### *Legendas da Figuras*

[00133]As Figuras 1 - 6 exibem os resultados do experimento descrito no exemplo de triagem 14. A natureza dos lipídios catiônicos é indicada nas figuras menores e outras lendas e eixo são semelhantes para todos os itens de exibição e são dadas na figura separada e menor abaixo. As barras duplas denotam liposso-

mas com 20% de colesterol (barra à esquerda) e 40% de colesterol (barra à direita), respectivamente.

[00134] Barras representam os valores de IC<sub>50</sub> para as respectivas combinações de liposomas / siRNA nas condições experimentais para cada figura, isto é, seja na presença ou ausência de soro de camundongo. Estes valores IC<sub>50</sub> denotam as concentrações necessárias para uma inibição meio-máxima do crescimento celular e são dadas em nM. As concentrações máximas dos itens de teste foram de 40 e 36 nM para a ausência ou presença de soro de camundongo, respectivamente.

A ordem dos itens de teste é a seguinte:

Figura 1 o lipídio aniônico é CHEMS - sem adição de soro de camundongo

Figura 2 o lipídio aniônico é CHEMS + adição de soro de camundongo

Figura 3 o lipídio aniônico é DMGS - sem adição de soro de camundongo

Figura 4 o lipídio aniônico é DMGS + adição de soro decamundongo

Figura 5 o lipídio aniônico é DOGS - sem adição de soro de camundongo

Figura 6 o lipídio aniônico é DOGS + adição de soro de camundongo

Exemplos

[00135] Os ensinamentos desta invenção podem ser mais bem compreendidos com a consideração dos exemplos a seguir. No entanto, estes exemplos não devem de modo algum limitar os ensinamentos da presente invenção.

*Exemplo 1 - Produção de lipossomas, caracterização e encapsulamento de siRNA*

[00136] Lipossomas foram preparados utilizando métodos conforme divulgado em WO07/107304. Mais especificamente, os lipídios foram dissolvidos em isopropanol e lipossomas foram produzidos pela adição de solução de siRNA em 20 mM de NAAC, 300 mM de Sacarose, pH 4,0 (pH ajustado com HAc) à mistura de lipídios alcoólicas, resultando em uma concentração de álcool final de 30%. As suspensões lipossomais foram formadas deslocadas para pH 7,5 com o dobro do volu-

me de 136 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM de NaCl (pH 9), resultando em uma concentração de lipídio final de 3 mM e uma concentração de isopropanol final de 10%.

[00137]Lipossomas foram caracterizados em relação ao seu tamanho de partícula usando espalhamento de luz dinâmico (MALVERN 3000HSA).

[00138]SiRNA ativo: 21 mer blunt terminada segmentação do camundongo e mRNA PLK-1 humano como em Haupenthal et al., Int. J. Cancer (2007), 121 :206-210.

SiRNA de controle (SCR): 21 mer da mesma fonte.

*Exemplo 2 - Cultura Celular Geral e Ensaio de Proliferação*

[00139]Células HeLa foram obtidas a partir de DSMZ (Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células) e mantidas em DMEM (Gibco-Invitrogen) e suplementadas com 10% de SFB. As células foram pipetadas a uma densidade de 2.5x10<sup>4</sup> células / ml e cultivadas em 100 µL de meio a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após 16 h, os lipossomas contendo siRNA foram diluídos e 10 µl foram adicionados às células para produzir concentrações finais entre 0,4 a 100 nM PIki ou siRNA misturado; 10µl de tampão de diluição também foram adicionados às células não tratadas e em poços sem células. Placas de cultura de células foram incubadas por 72 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Proliferação / viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de viabilidade celular CellTiter-Blue (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor.

*Exemplo 3 - Inibição da Transfecção por Soros*

[00140]Lipossomas com DODAP: DMGS: Colesterol (24:36:40% em mol) foram carregados com siRNA ativo e controle como acima e 25 µL dos lipossomas foram incubados com 75 µL de soros de diferentes espécies (SIGMA-Aldrich) por 30 min. Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima.

[00141]Quando incubados sem soro, administração dos siRNA ativos resulta

em uma forte inibição da proliferação celular. Conforme demonstrado na Tabela 7 abaixo, este processo é inibido pela adição de soro.

**Tabela 7: Inibição de Transfecção Celular por Soros de Origem Diferente.**

Tipo de siRNA	conc. de siRNA	Soro	Viabilidade celular(%)
PLK1	50 nM	Nenhum	7
PLK1	50 nM	Humano	98
PLK1	50 nM	Hamster	80
PLK1	50 nM	Rato	108
PLK1	50 nM	Camundongo	102
Nenhum	Nenhum	Nenhum	100

*Exemplo 4 - Inibição é dependente da Lipoproteína*

[00142] Lipossomas como no Exemplo 3 foram incubados com soro humano desprovido de certos fatores de complemento ou lipoproteínas (SIGMA-Aldrich) como acima e analisados por sua capacidade de mediar o efeito RNAi em células He-La.

[00143] Conforme demonstrado na Tabela 8, a eficácia de transfecção pode ser restaurada por um esgotamento das lipoproteínas. Remoção de fatores de complemento foi ineficaz.

**Tabela 8: Restauração de Transfecção Celular em Soros sendo Deficiente de Vários Fatores.**

Tipo de siRNA	conc. de siRNA	Soro	Viabilidade celular(%)
PLK1	50 nM	Nenhum	7
PLK1	50 nM	Humano, completo	98
PLK1	50 nM	Humano, sem fator de complemento C3	91
PLK1	50 nM	Humano, sem fator de complemento C9	98
PLK1	50 nM	Humano, lipoproteína deficiente	18
Nenhum	Nenhum	Nenhum	100

*Exemplo 5 - Transfecção resistente a Soro usando um lipídio de guanido*

[00144] Uma série de lipossomas foi construída a partir de PONA: Lipídios aniónicos: Colesterol (x: y: 20% em mol) e carregada com siRNA ativo e controle

como no Exemplo 1. Dentro dessa série, a relação entre o componente catiônico PONA e os lipídios aniônicos CHEMS ou DMGS foi sistematicamente variada entre 0,33 e 2, conforme indicado na tabela. Lipossomas tendo uma relação entre o: lipídio catiônico : aniônico de 1 ou maior foram ainda providos com 2 % em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar a agregação das partículas. Essa modificação é indicada por um "+" na tabela. Reações de controle com partículas tendo C/A < 1 não revelaram uma mudança de propriedades de transfecção na presença ou ausência de lipídios PEG.

[00145]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e soros de origem humana ou camundongos (Sigma-Aldrich) foram adicionados diretamente nas células por 120 min. Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, em concentrações entre 50 pM e 50 nM, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia de transfecção é expressa aqui como IC<sub>50</sub>, a concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%. Baixos valores IC<sub>50</sub> representam, portanto, transfecção altamente eficaz.

[00146]Torna-se evidente a partir dos resultados na Tabela 9, que a adição de soro apenas marginalmente afeta a transfecção de siRNA mediada pelos lipossomas do exemplo. Alguma inibição ainda é observada para os lipossomas de PONA: CHEMS compreendendo baixas quantidades dos lipídios aniônicos (razões de 0,33 e 0,5, inibição particularmente forte com o soro de camundongo).

Tabela 9: Eficácia de transfecção de lipossomas compreendendo porções guanido na presença de soros.

		CHEMS						
razão lipídio catiônico/aniônico	0,33	0,50	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
sem soro	38,54	1,21	0,40	0,56	1,83	1,61	0,70	1,42
Soro Humano	199,00	2,10	0,62	1,13	2,16	1,92	1,70	1,83
Soro de camundongo	199,00	50,00	1,56	1,94	2,47	1,90	0,76	1,44
		DMGS						
Sem soro			0,23	0,54	0,01	0,01		
Soro Humano			1,50	2,39	2,88	2,21		
Soro de camundongo			0,67	0,69	1,41	1,81		

*Exemplo 6: Criticalidade do grupo cabeça de guanido*

[00147]Séries de lipossomas tendo razões sistematicamente variadas entre os componentes lipídicos catiônicos e aniónicos foram produzidas e carregadas com siRNA como no Exemplo 5. Os componentes lipídicos catiônicos foram PONA PONamina e PONamônio, o lipídio aniónico foi CHEMS e o teor de colesterol foi fixado em 20% em mol. Lipossomas tendo uma relação do lipídio aniónico : catiônico de 1 ou mais foram ainda providos com 2 % em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar a agregação das partículas. Essa modificação é indicada por um "+" na tabela.

[00148]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e soros de origem humana ou camundongos (SIGMA-Aldrich) foram adicionados diretamente nas células por 120 min. Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, em concentrações entre 50 pM e 50 nM, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia de transfecção é expressa aqui como IC<sub>50</sub> como no Exemplo 5.

[00149]Torna-se evidente a partir dos dados da Tabela 10, que só PONA, e nem PONamina e muito menos PONamônio, medeia a transfecção de células HeLa, na presença de soro. Isto é mais notório no caso do soro de camundongo, que inibe a transfecção de forma mais agressiva. Um excesso de componentes lipídicos catiô-

nicos em certa medida, compensa a perda de atividade mediada pelo soro, mas pode ser devido à adsorção eletrostática inespecífica desses lipossomas para as células.

Tabela 10: Criticalidade do grupo cabeça guanido para a transfecção de células resistentes a soro.

razão C/A	PONA							
	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
sem soro	42,9	1,8	0,6	1,0	4,1	5,4	2,4	6,8
soro humano	80,0	2,5	2,2	2,0	1,8	2,8	6,2	5,2
soro camund.	80,0	31,1	55,0	5,7	2,1	5,3	8,1	7,5
PONamina								
razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
sem soro	3,1	65,0	7,5	100,0	3,0	5,2	3,0	2,5
soro humano	100,0	55,0	11,9	100,0	2,2	2,8	6,1	5,1
soro camund	70,0	100,0	100,0	100,0	75,0	70,0	39,3	8,7
PONamônio								
razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
sem soro	80,0	100,0	90,0	90,0	65,0	9,5	9,5	5,2
soro humano	95,0	90,0	90,0	80,0	90,0	11,8	12,4	15,7
soro camund	85,0	100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	75,0	55,0

### Exemplo 7 - Otimização da composição e lipossoma

[00150]Séries de lipossomas tendo razões sistematicamente variadas entre os componentes lipídicos catiônicos e aniónicos foram produzidas e carregadas com siRNA como no Exemplo 5. O componente lipídico catiônico foi PONA, os lipídios aniónicos foram CHEMS DMGS ou DOGS e o teor de colesterol variou entre 0 e 40% em mol. Lipossomas tendo uma razão de lipídio catiônico : aniónico de 1 ou mais, mas também alguns dos outros lipossomas foram adicionalmente providos com 2 % em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar a agregação das partículas. Essa modificação é indicada por um "+" na tabela.

[00151]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e lipossomas foram adicionados às células, em concentrações entre 6 nM e 200 nM, a

incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia de transfecção é expressa aqui como IC<sub>50</sub> como nos exemplos acima. Além disso, o IC<sub>50</sub> foi determinado para os lipossomas carregando o siRNA inativo (SCR) e a relação entre IC<sub>50</sub> (SCR) e IC<sub>50</sub> (PLK1) foi determinada. Um valor elevado para este parâmetro indica uma inibição muito específica da viabilidade celular pelo siRNA PLK1, baixos efeitos inespecíficos contribuído pelo veículo e baixos níveis de citotoxicidade em geral.

Tabela 11: Resultados de Otimização para CHEMS. Valores IC<sub>50</sub> detectáveis maiores e menores são 6 e 200 nM, respectivamente.

	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK	0% Chol	44	77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	20% Chol	54	79	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	40% Chol	67	94	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR	0% Chol	90	86	113	152	23	200	16	21	15	16	14	11
	20% Chol	73	90	109	128	200	200	26	23	21	11	16	10
	40% Chol	94	117	198	200	200	200	6	6	30	14	27	12
	C/A	0,33	0,33+	0,5	0,5+	0,67	0,67+	0,82	0,82+	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR/PLK	0% Chol	2,05	1,12	18,86	25,33	3,81	83,33	2,60	3,52	2,50	2,68	2,30	1,84
	20% Chol	1,37	1,14	18,10	21,39	83,33	83,33	4,26	3,77	3,45	1,84	2,65	1,69
	40% Chol	1,40	1,24	32,96	83,33	83,33	83,33	1,00	1,00	5,00	2,39	4,48	1,97

Tabela 12: Resultados da Otimização para DMGS. Valores IC<sub>50</sub> detectáveis maiores e menores são 6 e 200 nM, respectivamente.

	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK	0% Col	98	200	200	188	6	6	6	6
	20% Col	6	6	6	6	6	6	6	6
	40% Col	6	6	6	6	6	6	6	6
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR	0% Col	200	200	200	158	14	6	10	14
	20% Col	200	54	8	8	13	9	9	10
	40% Col	155	23	11	6	6	14	9	12
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR/PLK	0% Col	5,11			0,84	2,26	1,00	1,66	2,36
	20% Col	83,33	9,01	1,27	1,26	2,20	1,55	1,45	1,69
	40% Col	25,85	3,90	1,83	1,00	1,00	2,27	1,54	1,97

Tabela 13: Resultados da Otimização para DOGS. Valores IC<sub>50</sub> detectáveis maiores e menores 6 e 200 Nm, respectivamente.

	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK	0% Col	200	200	200	200	6	6	6	6
	20% Col	22	200	200	200	6	6	6	6
	40% Col	6	170	200	200	6	6	6	6
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR	0% Col	200	200	200	200	14	10	16	10
	20% Col	200	200	200	200	21	10	12	8
	40% Col	15	197	200	200	12	7	9	9
	C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
SCR/PLK	0% Col	sem efeito	sem efeito	sem efeito	sem efeito	2,40	1,59	2,65	1,63
	20% Col	22,42	sem efeito	sem efeito	sem efeito	3,45	1,65	2,07	1,29
	40% Col	2,48	1,16	sem efeito	sem efeito	1,93	1,09	1,48	1,55

#### Exemplo 8 - Lipossomas compreendendo um lipídio de piridínio

[00152]SAINT-18 foi usado como lipídios catiônicos, sua estrutura de piridínio metilada provê uma porção imino carregada. CHEM DMGS e DOGS foram utilizados individualmente como lipídios aniônicos provendo o grupo carboxila funcional. Séries de lipossomas tendo relações sistematicamente variadas entre os componentes lipídicos catiônicos e aniônicos foram produzidas e carregadas com siRNA como no Exemplo 5. A mistura de lipídios foi adicionalmente provida com 20 ou 40% em mol do colesterol. Lipossomas tendo uma razão de lipídio catiônico : aniônico de 1 ou mais foram adicionalmente providos com 2% em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar a agregação das partículas. Essa modificação é indicada por um "+" na tabela.

[00153]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e lipossomas foram adicionados às células, em concentrações entre 50 nM e 50 pM, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia de transfeção é expressa aqui como IC<sub>50</sub> como nos exemplos acima. Além disso, o IC<sub>50</sub> foi determinado para os lipossomas carregando o

siRNA inativo (SCR) e a relação entre IC<sub>50</sub> (SCR) e IC<sub>50</sub> (PLK1) foi determinada. Um valor elevado para este parâmetro indica uma inibição muito específica da viabilidade celular pelo siRNA PLK1, baixos efeitos inespecíficos contribuídos pelo veículo e baixos níveis de citotoxicidade em geral.

Tabela 14: Resultados de transfecção para lipossomas de SAINT-18, CHEMS e colesterol

lipídio anión CHEMS, sem soro									
	razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	2,2	sem ef.	1,7	33,9	17,8	7,2	4,1	2,7
	40% Col	7,8	sem ef.	1,5	32,0	7,2	4,4	2,1	6,4
SCR	20% Col	sem ef.	sem ef.	11,9	sem ef.	37,4	19,6	20,7	29,0
	40% Col	sem ef.	16,9	18,6	28,0				
SCR/PLK-1	20% Col	>22,7		7,2	>1,5	2,1	2,7	5,0	10,6
	40% Col	>6,4		>32,5	>1,6	>7,0	3,9	8,7	4,4
lipídio anión CHEMS, mais soro de camundongo									
		0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	sem ef.	sem ef.	14,4	sem ef.	sem ef.	sem ef.		31,7
	40% Col	sem ef.	35,5	23,1					
SCR	20% Col	sem ef.							
	40% Col	sem ef.	41,5	38,1					
SCR/PLK-1	20% Col			>3,5					>1,6
	40% Col							1,2	1,6

Tabela 15: Resultados de transfecção para lipossomas de SAINT-18, DMGS e colesterol

anión de lipídio DMGS, sem soro									
	razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20%	0,8	2,3	1,7	43,6	24,3	7,5	5,2	3,8
	40%	1,6	2,3	1,8	2,2	11,4	8,9	3,8	5,8
SCR	20%	7,7	8,2	5,3	36,0	28,1	27,6	10,5	10,3
	40%	4,7	sem ef.	22,6	5,7	27,7	28,5	8,1	8,2
SCR/PLK-1	20%	9,2	3,6	3,1	0,8	1,2	3,7	2,0	2,7
	40%	2,9	>22,1	12,6	2,5	2,4	3,2	2,1	1,4
anión de lipídio DMG; mais soro de camundongo									
	razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20%	4,0	8,0	2,7	sem ef.	26,5	28,8	sem ef.	sem ef.
	40%	2,0	2,2	1,6	1,6	sem ef.	21,0	sem ef.	sem ef.
SCR	20%	10,1	sem ef.	23,4	sem ef.	29,1	31,2	25,7	28,4
	40%	7,7	18,0	25,8	6,3	28,0	37,4	31,7	25,7
SCR/PLK-1	20%	2,5	>6,2	8,6		1,1	1,1		
	40%	3,9	8,0	16,5	3,9		1,8		

Tabela 16: Resultados de transfecção para lipossomas de SAINT-18, DOGS e colesterol

anión de lipídio DOGS, sem soro									
	razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK1	20% Col	36,9	38,0	sem ef.	sem ef.	9,2	8,1	7,0	6,1
	40% Col	6,9	19,4	sem ef.	sem ef.	22,7	8,7	6,6	8,5
SCR	20% Col	sem ef.	sem ef.	sem ef.	sem ef.	27,5	20,5	10,2	25,9
	40% Col	sem ef.	sem ef.	sem ef.	sem ef.				
SCR/PLK-1	20% Col	>1,4	>1,3			3,0	2,5	1,5	4,3
	40% Col	>7,3	>2,6			>2,2	>5,7	>7,6	>5,9
anión de lipídio DOGS, mais soro									
	razão C/A	0,33	0,5	0,67	0,82	1+	1,22+	1,5+	2+
PLK-1	20% Col	2,2	18,4	sem ef.	sem ef.	27,5	30,5	26,3	28,1
	40% Col	2,7	7,7	sem ef.	sem ef.	27,4	29,2	30,4	30,8
SCR	20% Col	2,8	sem ef.	sem ef.	sem ef.	32,6	34,4	30,9	33,2
	40% Col	sem ef.	8,2	sem ef.	sem ef.	30,6	sem ef.	sem ef.	42,8
SCR/PLK-1	20% Col	1,3	>2,7			1,2	1,1	1,2	1,2
	40% Col	>18,6	1,1			1,1	>1,7	>1,6	1,4

[00154]Como fica claro a partir dos dados nas tabelas 14 a 16, um grande número de lipossomas anfotéricos facilita a transfecção de células, mesmo na presença de soro de camundongo. Particularmente úteis são lipossomas compreendendo SAINT-18 em combinação com os cliacilglicerols DMGS e DOGS, enquanto a

combinação com CHEMS só foi eficaz em C/A = 0,67. Tal como acontece com as combinações PONA, os construtos anfotéricos transfetam as células com alta especificidade, enquanto as composições tendo C/A > 1 não fornecem uma transfeção altamente específica, como indicado por SCR/PLK1 sendo abaixo de 2.

[00155]Outras modalidades e usos da invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica da consideração da especificação e da prática da invenção divulgadas neste documento. A especificação e exemplos devem ser considerados exemplares apenas com o verdadeiro escopo e espírito da invenção indicados pelas seguintes reivindicações.

*Exemplo 9 - Medições de potencial zeta*

9.1 Análise do potencial zeta para lipossomas formados a partir de PQNA: CHEMS: CHOL

[00156]100  $\mu$ l de uma mistura de lipídio compreendendo x% em mol de PONA, y% de mol de CHEMS e 20% em mol de colesterol (20mM de concentração de lipídios totais, solvente: isopropanol) foram injetados em 900  $\mu$ l de um tampão compreendo 10 mM de ácido acético e 10mM de ácido fosfórico pH4. X e Y, as percentagens molares para PONA e CHEMS foram ajustados para produzir o razões de C/A na tabela 17.

[00157]A suspensão foi imediatamente centrifugada e 3 mL de um tampão de ajuste de pH foi adicionada. Tampões foram selecionados a partir do grupo de: ácido acético 50mM e ácido fosfórico 50mM, pH ajustado para 4, 5, 6,5 ou 7,5 utilizando NaOH ou 50mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/50mM de acetato de sódio PH9,4. O pH da mistura foi gravado e é dado na tabela 17 abaixo, juntamente com os potenciais zeta das partículas lipídicas resultantes que foram monitoradas através de um Zetastzer HSA3000.

Tabela 17: Potenciais Zeta para as partículas de lipídios de PONA: CHEMS: CHOL

razão C/A	0,5	0,67	0,82	1,00	1,22	1,5	2,00
pH final							
7,56	-54,40	-58,90	-58,20	-61,80	-21,80	22,60	#NV
7,20	-48,47	-46,00	-44,90	-50,00	-21,10	14,97	#NV
6,32	-44,33	-37,07	-31,37	0,64	23,43	9,60	#NV
4,84	19,67	18,00	22,15	31,80	32,77	32,57	28,37
3,93	35,53	41,73	43,75	46,63	46,20	43,40	43,23

[00158]Claramente, as partículas exibem caráter anfotérico mesmo para misturas tendo C/A de 1,22, isto é, maior que 1. Partículas tendo um C/A de 0,67, 0,82 ou 1 também foram produzidas em pH7.4 e, posteriormente, expostas ao menor pH. Não houve mudanças aparentes para os potenciais zeta apresentados na tabela 17.

#### 9.2 Medições Zeta potenciais de combinações em que DOPA é o lipídio aniónico

[00159]Partículas lipídicas também foram preparadas a partir de misturas binárias de GUADACA e DOPA, uma combinação imino / fosfato de grupos cabeça de lipídios. As partículas foram preparadas da mesma maneira como descrito em 9.1 e os potenciais zeta da tabela 18 foram registrados para misturas com diferentes razões C/A:

Tabela 18: Potenciais Zeta para partículas lipídicas de GUADACA: DOPA

C/A	0,65	0,75	0,98	1,16	1,4
pH final					
4,5	21	13	38	46	51
5,32	-24	22	20	33	35
6,25	-8	-45	-30	2	24
7,02	-61	-67	-8	-56	-6
7,81	-67	-78	-76	-65	-21

[00160]Tal como acontece com as partículas obtidas em 9.1, partículas com caráter anfotérico também são obtidas com C/A > 1. Ainda assim, o drift no ponto isoelétrico segue as expectativas.

#### 9.3 Medições Zeta potenciais para DQTAP: CHEMS: CHOL

[00161]Para comparação, as mesmas medidas foram realizadas com mistu-

ras de lipídios no qual PONA foi substituído por DOTAP. Os resultados são mostrados na tabela 19. Em contraste com PONA: CHEMS partículas anfotéricas de DOTAP: CHEMS são encontradas somente em C/A < 1.

Tabela 19: Potenciais Zeta de partículas lipídicas de DOTAP: CHEMS: CHOL

Razão C/A	0,67	0,82	1	1,22
pH final				
7,56	-37,7	-21,63	4,9	13,25
7,20	-50,17	-24,1	#NV	12,55
6,32	#NV	#NV	11,43	7,37
4,84	25,6	32,1	20,27	9,3
3,93	52,13	43,93	47,77	12,15

*Exemplo 10 - Síntese dos CHOLGUA*

[00162] 25g de Colesterolcloroformiato e 50 equivalentes (eq.) de etitenodiamina foram dissolvidos em diclorometano e permitidos reagir por 6h a 20 °C. O aminoetilcarbamoil-colesterol foi isolado por cromatografia e cristalização. Rendimento foi de 28.7g e 90% de pureza.

[00163] CHOLGUA foi sintetizado a partir do aminoetilcarboamoil colesterol isolado antes. 30g da substância foram incubados com 1.5 eq. de cloridrato de 1H-pirazol-1-carboxamidínio e 4eq. de N,N-diisopropiletilamina em diclorometano / etanol por 16h a 20 °C, após o qual o produto foi isolado por cromatografia. Pureza de 95%, Rendimento 16.5g.

*Exemplo 11 - Síntese de DACA, PDACA e MPDACA*

[00164] 42,4g, de álcool oleílico, 2,5 eq. de diisopropilazodicarboxylato 2.5 eq. de trifenilfosfina e 5 eq. de LiI foram reagidos em tetrahidrofurano (THF) pó R24h a 20 ° C. Iodeto de oleíla foi isolado por cromatografia em fase com uma pureza de 90%, o rendimento foi 13.4g.

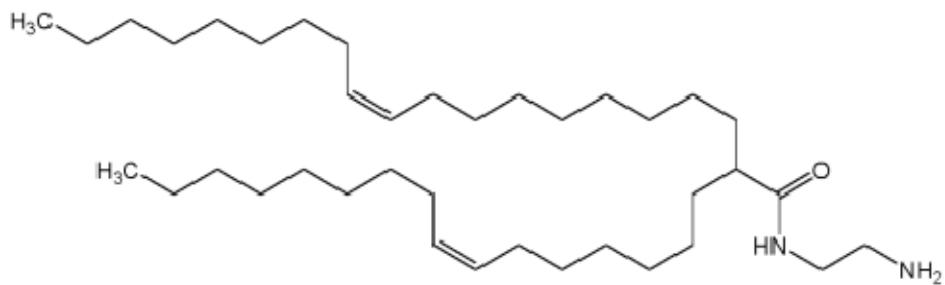
[00165] Em uma segunda etapa, 10 g de ácido oleico foram misturados com 2,2 eq. de litiumdiisopropilamida em THF para 0,5 h em 20 °C, após o que 1Eq. de oleiliodeto foi adicionado. A mistura foi incubada por 2h a 20 °C e DACA purificado a

partir da mistura de reação utilizando cromatografia. Pureza de 95%, rendimento 14,96 g.

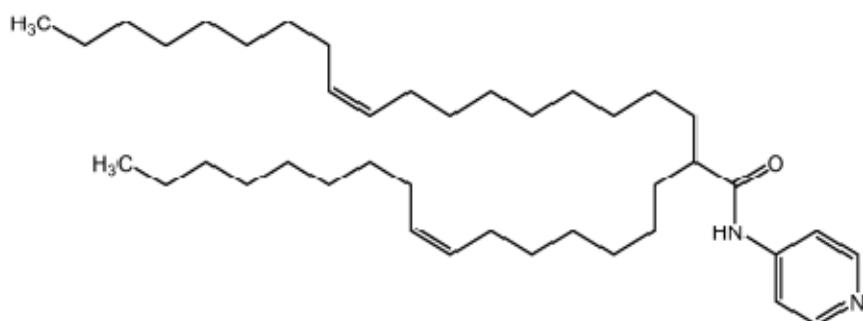
[00166]Para a síntese de PDACA, 2g de DACA, 1,2 eq. de 4-picolilamina, 1,4 eq. de tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronium e 4 eq. de N-metilmorfolina foram misturados em THF por 24h a 20 °C. A mistura de reação foi purificada incluindo cromatografia. Pureza de PDACA foi de 95%, o rendimento foi de 1,72g.

[00167]Para a síntese de MPDACA, 2g de PDACA foi dissolvido em THF, juntamente com 2eq. de dimetilsulfato e a mistura foi incubada por 16h a 20 °C, após o que MPDACA foi purificado por cromatografia. Pureza de MPDACA: 95%, Rendimento: 1.71g.

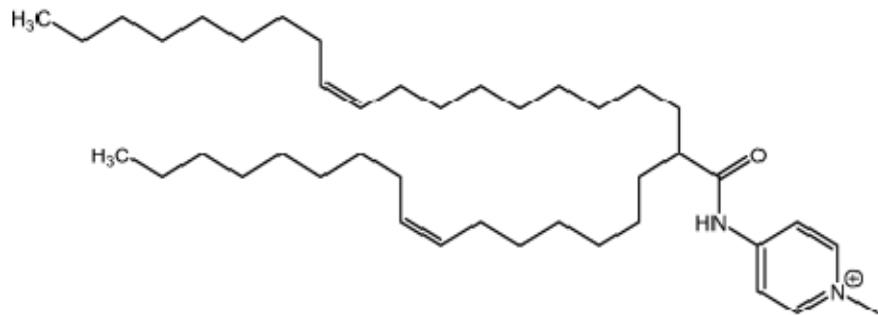
[00168]As estruturas de ADACA, PDACA e MPDACA são representadas respectivamente por:



ADACA



PDACA



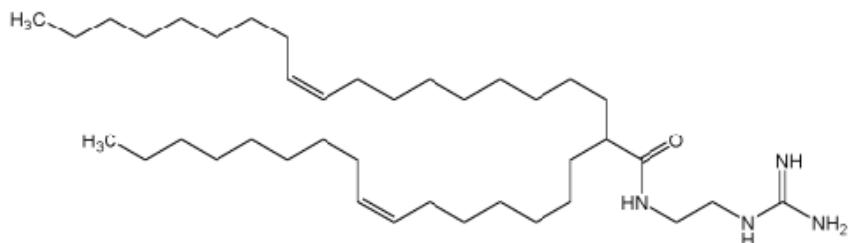
MPDACA

*Exemplo 12 - Síntese de GUADACA*

[00169] Em uma primeira etapa, 3,5 g de DACA e 1,5 eq. de 1,1'-carbonildiimidazol foram dissolvidos em diclorometano e incubados por 16h a 20 °C, após o qual 30 eq. de etilenodiamina foram adicionados. A mistura foi incubada por 4h a 20 °C após o qual aminoetil-DACA foi purificado incluindo cromatografia. Pureza foi de 90%, Rendimento 3.2g.

[00170] GUADACA foi sintetizado a partir aminoetil-DACA e para isso, 3.2g de aminoetil-DACA, 2,5 eq. de cloridrato 1H-pirazol-1-carboxamidina e 12eq. N,N-diisopropiletilamina foram incubados por 3h a 20 °C, após o que GUADACA foi isolado. Pureza: 95%, Rendimento: 2.24g.

[00171] A estrutura de GUADACA é representada por:



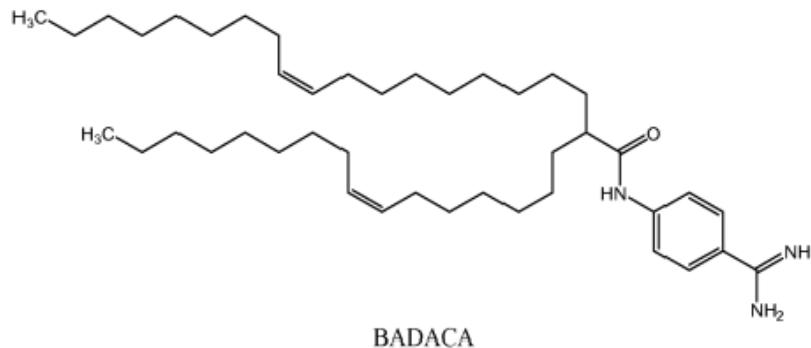
GUADACA

*Exemplo 13 - Síntese de BADACA*

[00172] BADACA foi sintetizado a partir de DACA de acordo com o seguinte procedimento: 4,15 g de DACA, 1,2 eq. de p-aminobenzamidina, 1,2 eq. de N,N'-diciclohexilcarbodiimida e 3 eq. de 4-dimetilaminopiridina foram misturados em dime-

tilformamida seca e incubadas por 16h em 70 °C. BADACA foi isolado a partir da reação utilizando cromatografia. Pureza: 95% Rendimento: 1, 62g.

[00173]A estrutura de BADACA é representada por:



Exemplo 14 - Transfecção resistentes a soro de lipídios catiônicos baseados em DACA ou colesterol em combinação com lipídios de carboxila

[00174]Série de lipossomas tendo razões sistematicamente variadas entre os componentes lipídicos catiônicos e aniónicos foram produzidas e carregadas com siRNA como no Exemplo 5. Os componentes lipídicos catiônicos foram CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, TC-CHOL GUADACA, MPDACA, BADACA e PDACA. Os lipídios aniónicos foram CHEMS, DMGS ou DOGS e o teor de colesterol foi 20 ou 40% em mol, todas as misturas de lipídios são identificadas nas tabelas de dados. Lipossomas tendo uma razão de lipídio catiônico : aniónico de um ou mais ( $C/A \geq 1$ ) foram adicionalmente providos com 1.5% em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats).

[00175]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e soro de camundongo (SIGMA-Aldrich) foi adicionado diretamente às células por 120 min. Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. As maiores concentrações de lipossomas foram 40nM e 36nM para experimentos na ausência ou presença de soro de camundongo, respectivamente. A eficácia de transfecção é expressa aqui como IC<sub>50</sub> (em nM de siRNA) como no Exemplo 5. Todos os resulta-

dos desse experimento de triagem são mostrados nas figuras 1 - 6.

[00176] Muitas das misturas de transfecção resultaram em transfecção muito potente de células HeLa com siRNA, como indicado pelos baixos valores IC<sub>50</sub>. Combinações de lipídios compreendendo lipídios de imino como CHOLGUA, mas mais ainda MPDACA, GUADACA ou PONA permanecem transfectantes potentes, mesmo na presença de soro de camundongo.

*Exemplo 15 - Transfecção resistente a soro de vários lipídios catiônicos em combinação com lipídios de fosfato*

[00177] Séries de lipossomas tendo razões C/A de 0,75 ou 1 foram produzidas e carregadas com siRNA como no Exemplo 5. Os componentes lipídicos catiônicos foram CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, GUADACA, MPDACA, BADACA, PONA, DOTAP ou DODAP. O lipídio aniónico foi DOPA e o conteúdo de colesterol foi de 40% em mol, todas as misturas de lipídios são identificadas na tabela 20. Lipossomas foram adicionalmente providos com 1,5% em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats).

[00178] Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e soro de camundongo (SIGMA-Aldrich) foi adicionado diretamente às células por 120 min. Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia da transfecção se expressa aqui como IC<sub>50</sub> (em nM de siRNA) como no Exemplo 5.

[00179] Muitas das misturas de transfecção resultaram em transfecção muito potente de células HeLa com siRNA, como indicado pelos valores muito baixos de IC<sub>50</sub>. Combinações de lipídios compreendendo lipídios de imino como CHOLGUA, mas mais ainda MPDACA, GUADACA ou PONA permanecem transfectantes potentes, mesmo na presença de soro de camundongo.

Tabela 20: Valores IC<sub>50</sub> (nM de siRNA) para vários lipossomas na presença e ausência de soro de camundongo. Inibição do soro "não potente" refere-se à falta

de potência mínima, na presença de soro de camundongo, nesses casos o fator de inibição não pode ser definido. A maior concentração de siRNA no teste foi 146nM.

C/A	Cátion	- soro de camundongo		+ soro de camundongo		inibição de soro
		IC50 PLK1	IC50 Scr.	IC50 PLK1	IC50 Scr.	
0.75	CholGUA	8	160	104	146	12
	CHIM	26	160	146	146	não potente
	DC-Chol	28	160	146	146	não potente
	MPDACA	5	67	10	146	2
	GUADACA	6	39	26	146	4
	BADACA	159	160	146	146	não potente
	PONA	6	24	146	146	não potente
	DOTAP	21	152	146	146	não potente
	DODAP	160	160	146	146	não potente
1	CholGUA	9	141	128	146	14
	CHIM	33	160	146	146	não potente
	DC-Chol	29	160	146	146	não potente
	MPDACA	12	100	4	146	0,3
	GUADACA	9	89	7	146	1
	BADACA	38	160	146	146	não potente
	PONA	2	66	21	146	10
	DOTAP	13	160	76	146	6
	DODAP	94	160	146	146	não potente

*Exemplo 16 - Transfecção resistente a soro é pobre na ausência de lipídios carregados negativamente.*

[00180]Uma série de lipossomas foi produzida a partir de lipídios catiônicos e colesterol como um lipídio neutro. Nenhum lipídio aniónico foi utilizado nestas preparações. Os componentes lipídicos catiônicos foram CHOLGUA, CHIM, DC-CHOL, ADACA, GUADACA, MPDACA, BADACA, PONA, DOTAP e DODAP e os lipossomas foram produzidos com o procedimento descrito no exemplo 5.

[00181]O teor de colesterol foi de 40% em mol e lipossomas foram adicionalmente providos com 1.5% em mol de DMPE-PEG2000 (Nippon Oils and Fats) para evitar a formação de agregados na presença de siRNA.

[00182]Células HeLa foram cultivadas e mantidas como no Exemplo 2 e soro de camundongo (SIGMA-Aldrich) foi adicionado diretamente às células por 120 min.

Depois disso, os lipossomas foram adicionados às células, a incubação foi mantida por 72 horas e viabilidade celular foi determinada como descrito acima. A eficácia de transfecção é expressa aqui como IC<sub>50</sub> (em nM de siRNA) como no Exemplo 5.

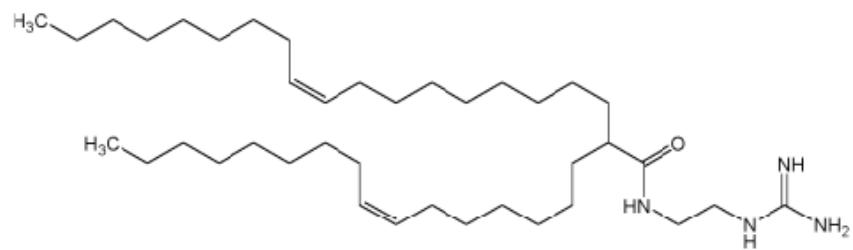
[00183]Os resultados obtidos são apresentados na tabela 21 abaixo. Em todos os casos, a eficácia de transfecção é substancialmente menor do que as misturas adicionais compreendendo um lipídio aniónico. Com a exceção de GUADACA ou PONA, não havia nenhuma atividade detectável na presença de soro de camundongo.

Tabela 21: Valores IC<sub>50</sub> (nM de siRNA) para vários lipossomas na presença e ausência de soro de camundongo. Inibição do soro "não potente" refere-se à falta de potência mínima na presença de soro de camundongo, nesses casos o fator de inibição não pode ser definido. A maior concentração de siRNA no teste foi de 160 ou 146nM na ausência de presença de soro de camundongo, respectivamente.

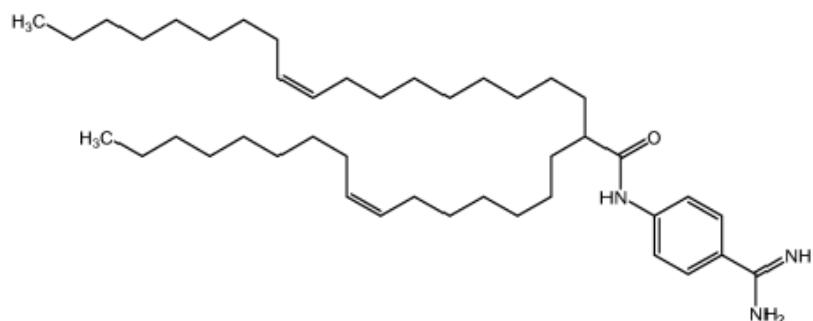
Cátion	sem soro de camundongo		com soro de camund.		inibição de soro
	IC50 PLK1	IC50 Scr.	IC50 PLK1	IC50 Scr.	
CholGUA	93	160	146	146	não potente
CHIM	160	160	146	146	não potente
DC-Chol	101	109	146	146	não potente
MPDACA	27	154	146	146	não potente
GUADACA	22	69	95	146	4
BADACA	99	160	146	146	não potente
PONA	30	100	70	99	2
DOTAP	160	160	146	146	não potente
DODAP	160	160	146	146	não potente

## REIVINDICAÇÕES

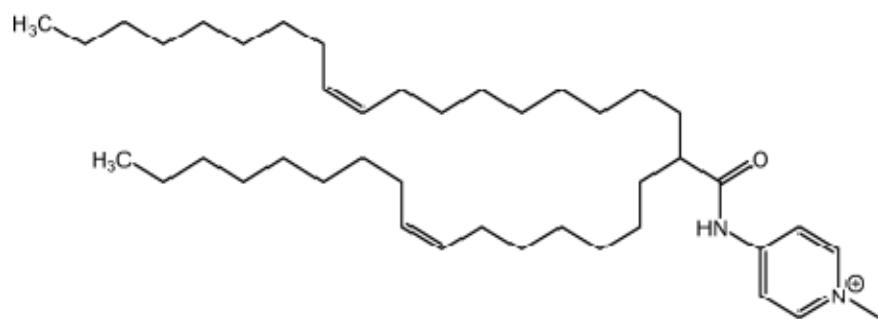
1. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma das seguintes estruturas:



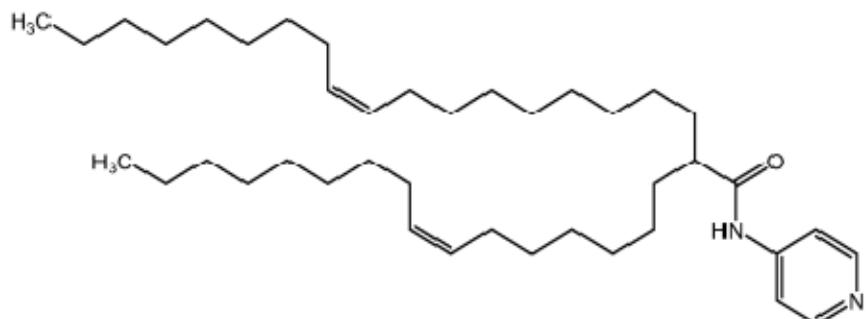
GUADACA



BADACA

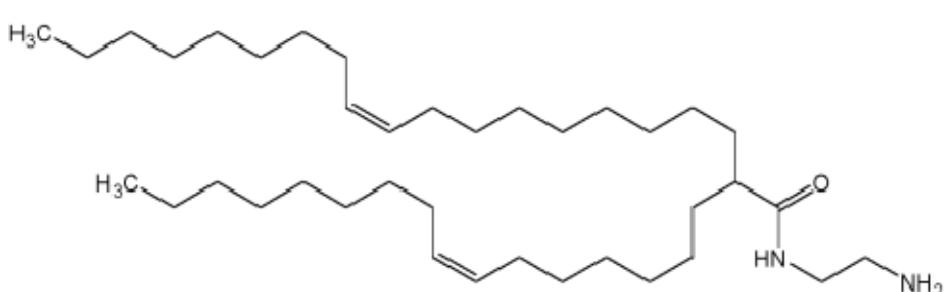


MPDACA



PDACA

ou



ADACA

2. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de reação de ácido oleico com álcool oleílico na presença de litiodiisopropilamina.

3. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de reação do composto, conforme definido na reivindicação 2, com 4-picolinilamina na presença de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio e N-metilmorfolina.

4. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de reação do composto, conforme definido na reivindicação 3, com dimetilsulfato.

5. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de reação do composto, conforme definido na reivindicação 2, com etilenodiamina na presença de 1,1'-carbonildiimidazol.

6. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de reação do composto, conforme definido na reivindicação 5, com N,N-diisopropiletilamina na presença de 1H-pirazol-1-carboxamidina.

7. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o produto de

reação do composto, conforme definido na reivindicação 2, com p-aminobenzamidina e 4-dimetilaminopiridina na presença de N,N'-dicicloexilcarbodiimida.

8. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um conjunto lipídico para transfecção de células, o conjunto lipídico compreendendo um composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o conjunto lipídico encapsula um agente ativo.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente ativo é um ácido nucléico ou um RNA.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença em um humano.

Figura 1

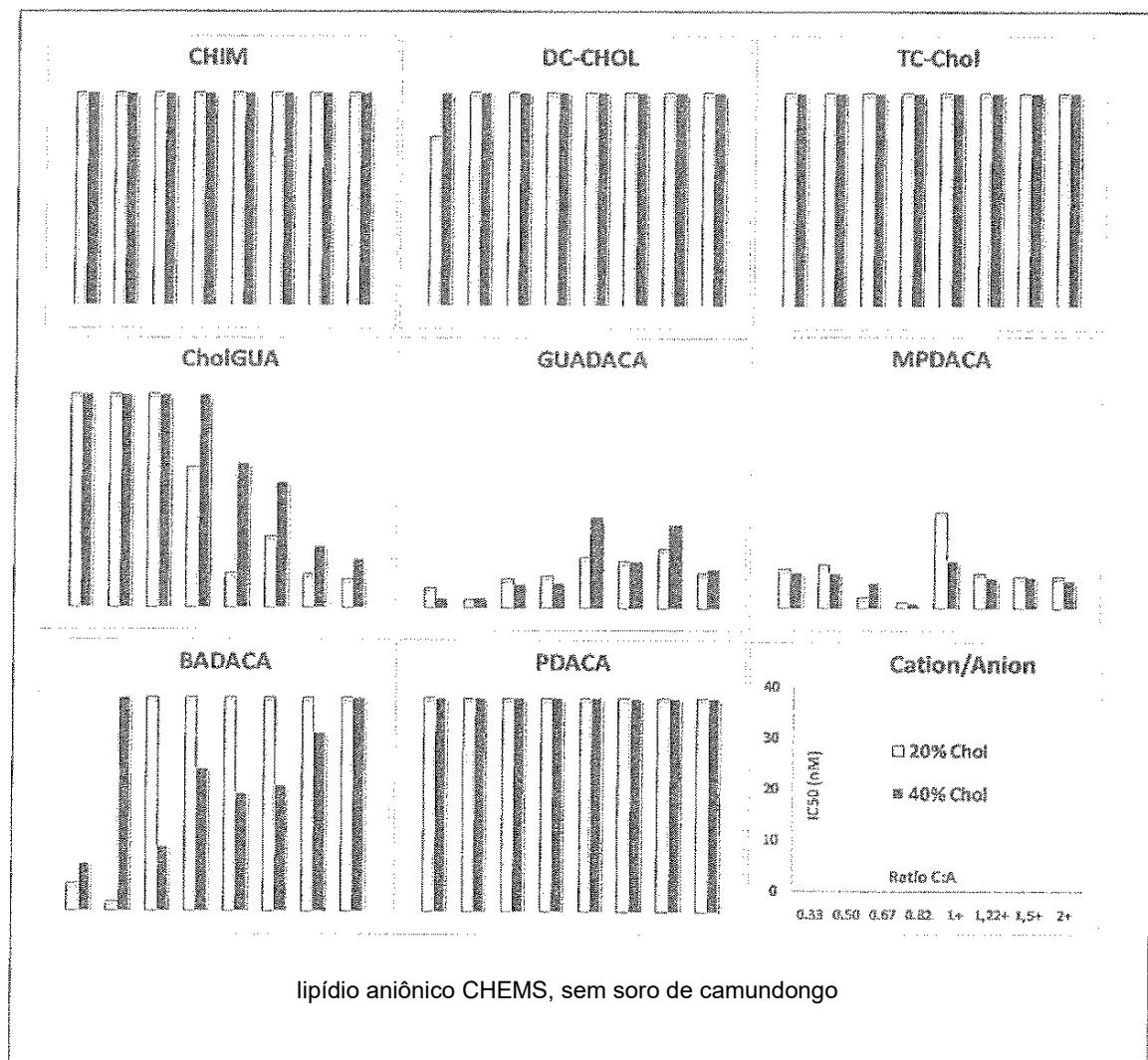
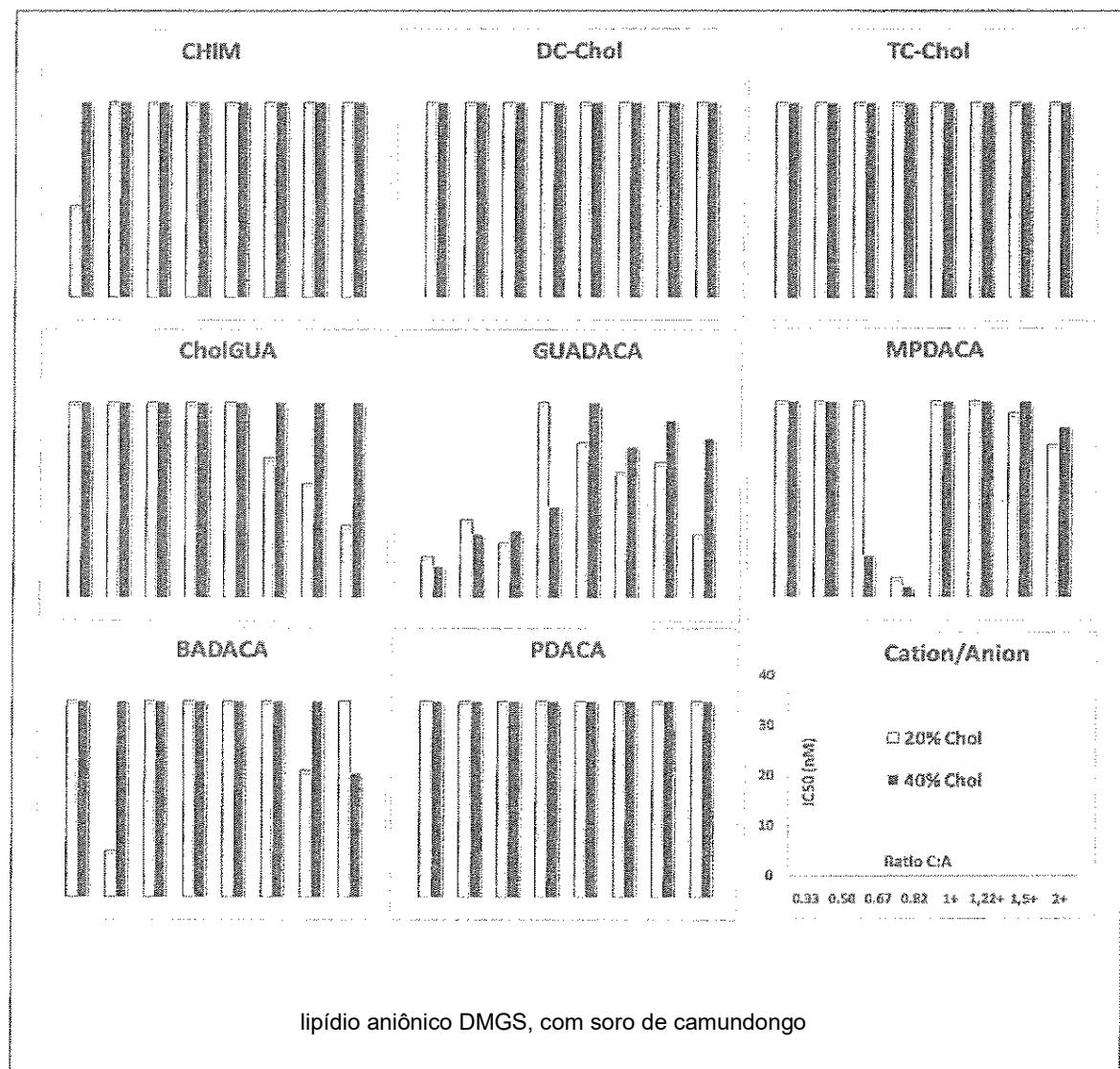


Figura 2



lipídio aniônico DMGS, com soro de camundongo

Figura 3

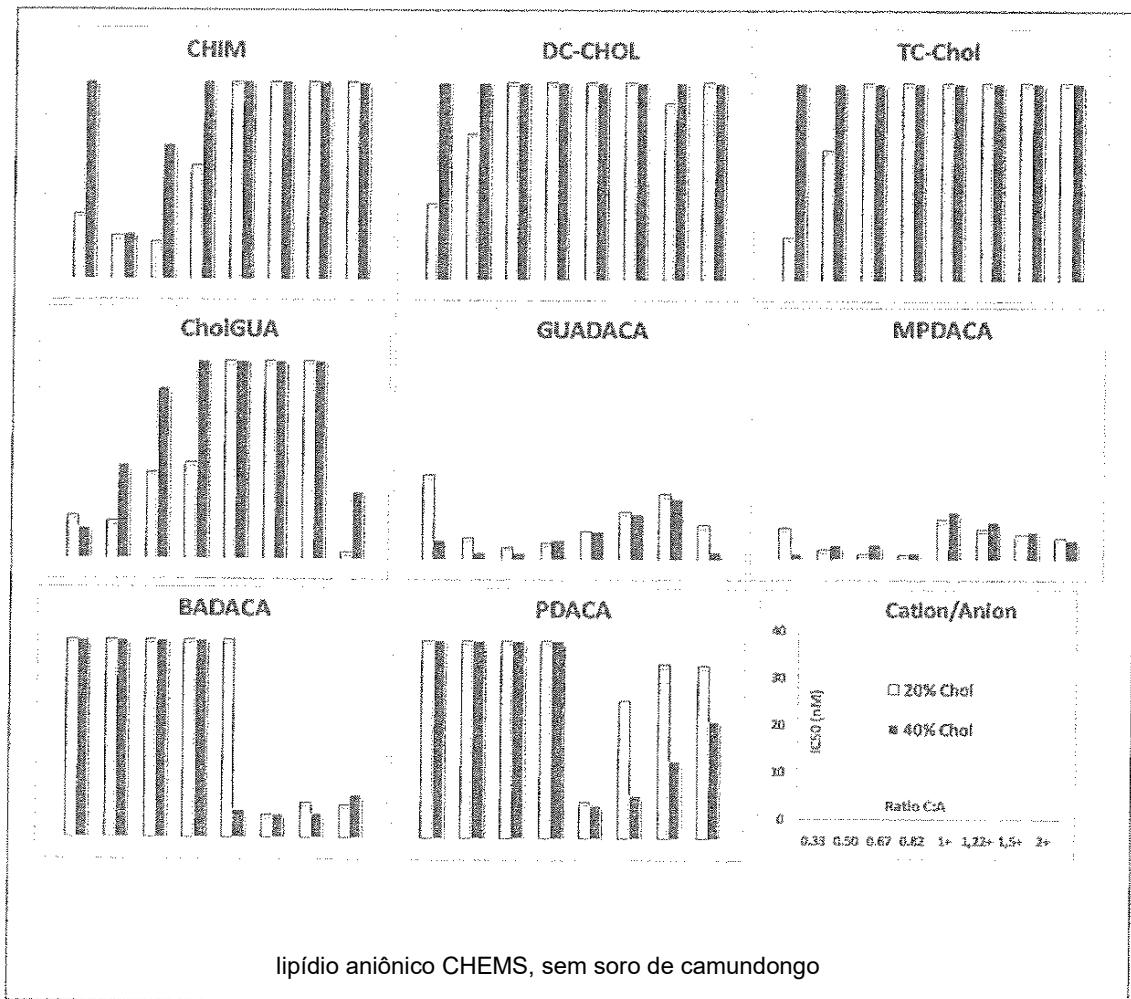


Figura 4

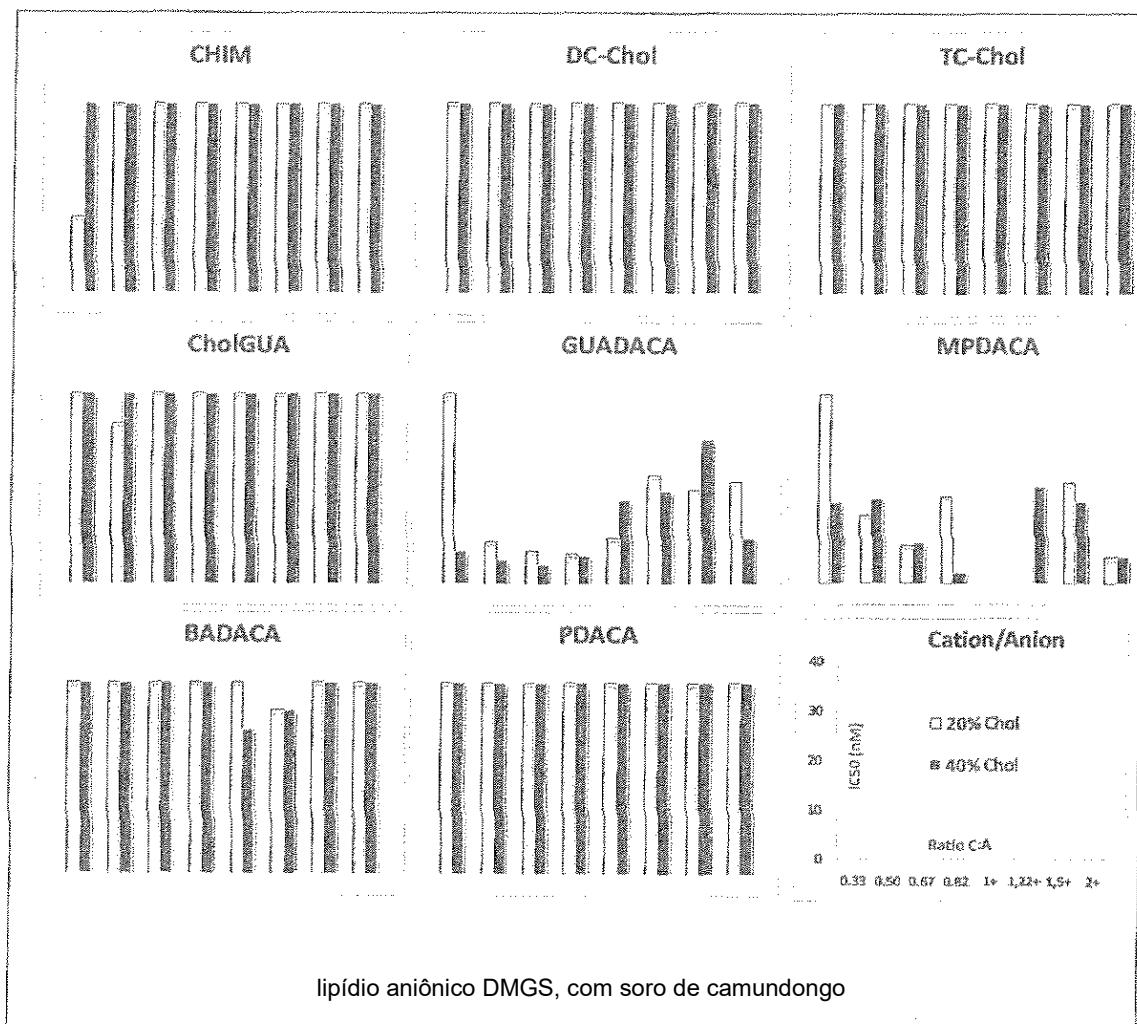
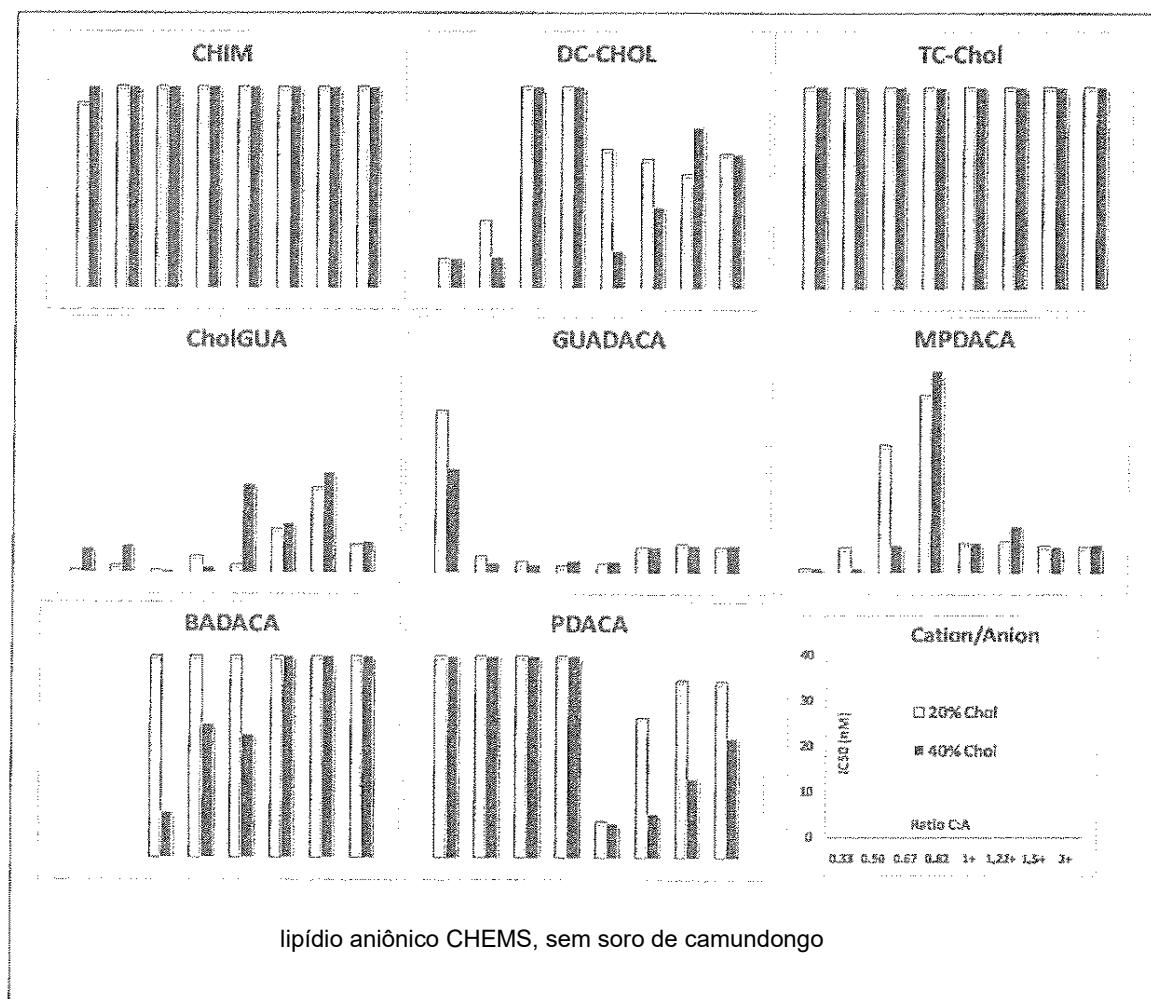


Figura 5



lipídio aniónico CHEMS, sem soro de camundongo

Figura 6

