



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 342**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/32** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99900750 .3**  
96 Fecha de presentación : **05.01.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1044021**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2000**

54 Título: **Mejora de transporte utilizando agentes de alteración de membrana.**

30 Prioridad: **05.01.1998 US 70411 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.04.2011**

73 Titular/es: **The University of Washington  
Tech Transfer 4311 11th Avenue NE, Suite 500  
Seattle, Washington 98105-4608, US  
University of Massachusetts**

72 Inventor/es: **Murthy, Niren;  
Crum, Lawrence, A.;  
Stayton, Patrick;  
Lackey, Chantal;  
Porter, Tyrone, M.;  
Hoffman, Allan, S.;  
Press, Oliver;  
Mourad, Pierre, D. y  
Tirrell, David**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 342 T3

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

## DESCRIPCIÓN

La presente invención está en el campo de cesión de agentes terapéuticos, y más en particular en el área de mejora de transporte o cesión de moléculas en el citosol de las células, a través de barreras celulares o capas de las células, o a través de membranas lípidas, usando agentes que potencian el transporte por barreras de membranas solos o en combinación con un estímulo y/o potenciador que modifica la estructura y/o propiedades de los agentes.

Específicamente, la cesión eficiente de compuestos terapéuticos y de diagnóstico a la célula es un objetivo principal de las compañías farmacéuticas. Un número de diferentes enfoques han sido utilizados para incrementar la especificidad y la absorción. El más común ha sido enfocado al agente terapéutico o de diagnóstico para especificar los tipos de células por conjugación de los agentes a anticuerpos que reconocen antígenos específicamente o predominantemente asociados con las células. Otros agentes, tales como los complejos policatiónicos, liposomas y complejos lípidos, han sido empleados para incrementar la absorción de los compuestos generalmente por células.

Hay varios agentes terapéuticos los cuales son sólo efectivos si son cedidos intracelularmente, incluyendo material genético y proteínas varias. La terapia génica requiere de la cesión intracelular de material genético para tratar desordenes genéticos, causar mutaciones en el material genético de varias células, tales como las células tumorales, y unirse a o interactuar con diferentes sitios en las células causando un efecto. Ejemplos de proteínas incluyen toxinas, las cuales son únicamente venenosas una vez que han sido liberadas desde el endosoma en el citoplasma. Para incrementar su especificidad, han sido preparadas inmunotoxinas incluyendo la toxina conjugada a un anticuerpo que se concentra en antígenos asociados al tumor. Las inmunotoxinas han tenido limitado éxito como terapéutico, sin embargo, en parte debido a la inadecuada penetración en los nódulos del tumor y a la inefectiva cesión de la toxina en los ribosomas citosólicos.

0004 Es a menudo difícil la cesión de compuestos, tales como proteínas, material genético, y otros medicamentos y compuestos diagnósticos, intracelularmente porque las membranas de la célula resisten el paso de esos compuestos. Varios métodos han sido desarrollados para administrar agentes intracelularmente. Por ejemplo, el material genético ha sido administrado en células in vivo, in vitro y ex vitro usando vectores virales, complejos ADN/lípidos y liposomas. El ADN ha sido también cedido por polímeros catiónicos sintéticos y copolímeros y portadores naturales catiónicos tales como quitosan. Algunas veces, los polímeros sintéticos son hidrofólicamente modificados para potenciar la endocitosis. Mientras que los vectores virales son eficientes, las preguntas continúan con respecto a la seguridad de un vector vivo y el desarrollo de una respuesta inmune después de una administración repetida. Los complejos lípidos y liposomas parecen menos efectivos en la transferencia de ADN en el núcleo de la célula y podrían ser potencialmente destruidos por macrófagos in vivo.

La endocitosis mediada por receptor ofrece un medio alternativo para dirigirse a tipos de células específicas y para la cesión de agentes terapéuticos intracelularmente. La endocitosis mediada por receptor (EMR) ocurre cuando los ligandos se unen a los receptores de la superficie de la célula en membranas de células eucariotas, iniciando o acompañando una cascada de fenómenos en no-equilibrio, culminando en la invaginación celular de los complejos de membrana con vesículas recubiertas de clatrina. Los compuestos que interactúan con los receptores específicos de la superficie de la célula son empleados para dirigirse a receptores específicos de la superficie de la célula. Los compuestos son endocitosados en los endosomas una vez que los compuestos interactúan con los receptores de la superficie de la célula. Los enlaces han sido hechos directamente con los compuestos, o en el caso del ADN, a través de la conjugación con polímeros policatiónicos tales como la polilisina y DEAE-dextrano que luego forman complejos con el ADN. Haensler et al., *Bioconj. Chem.*, 4:372-379 (1993).

Incluso después de que los agentes terapéuticos son cedidos intracelularmente, el tráfico normal en la célula puede minimizar su efectividad. Por ejemplo, algunos conjugados anticuerpo-antígeno están fácilmente endocitosados. Sin embargo, después de la endocitosis, el anticuerpo no es liberado en el citosol sino que continúa aislado en endosomas hasta que es conducido a un lisosoma para degradarse. Press, O. W. et al, *Cancer Research*, 48: 2249-2257 (1988). Los endosomas son vesículas fosfolípidas unidas por membrana que funcionan en el tráfico intracelular y degradación de proteínas internalizadas. El pH interno de los endosomas está entre 5.0 y 5.5. Una toxina conjugada con este anticuerpo estará similarmente aislada en el endosoma, y si se dirige a un lisosoma, quedará totalmente inutilizada. El material genético, estando cargado negativamente, forma a menudo un complejo con materiales policatiónicos, tales como quitosan y polilisina, para cederlo a una célula. Ambas, inmunoterapia y terapia génica usando complejos ácidos nucleicos/policatiónicos están limitadas por la circulación de los complejos en la célula desde los endosomas a los lisosomas, donde los anticuerpos conjugados o los ácidos nucleicos son degradados e inutilizados.

Por consiguiente, una limitación mayor de muchas terapias potencialmente útiles es que los agentes, incluso si pueden ser captados por las células deseadas y endocitosados por las células, a menudo no son liberados efectivamente desde endosomas en el citosol, pero son degradados por los lisosomas.

Diversos métodos han sido propuestos para evitar o minimizar la degradación lisosomal de estos agentes. Un método implica incluir agentes lisosomotróficos tales como cloroquina en formulaciones usadas para administrar agentes terapéuticos intracelularmente. Otro método implica alterar el endosoma de forma que el agente es cedido en el citosol antes de que sea transportado y degradado por los lisosomas. Es preferible alterar el endosoma de forma que el material nunca esté en contacto con el lisosoma. Al menos dos vías han sido elaboradas para alterar la membrana

endosomal. Un método aprovecha el pH en el interior de los endosomas, y usa materiales que son relativamente hidrofílicos a pH fisiológico (alrededor de 7.4) y relativamente hidrofóbico en el pH interno de los endosomas. Ejemplos de tales materiales son el ácido carboxílico conteniendo polímeros tales como poliácido hidrofóbico poly (ácido 2-etilacrilico) (PEAA), que están negativamente cargados a pH alcalino y sin carga en el pH interno del endosoma debido a la protonación de las fracciones de ácido carboxílico:

Se ha demostrado que PEAA solubiliza las membranas lípidas en una forma dependiente del pH, permeabilizando y solubilizando membranas en un pH ácido (aproximadamente 6.3), mientras que no tiene efecto en pH alcalino. Thomas, J.L et al., *Biophysical Journal* 67:1101-1106 (1994); Thomas, J. L. et al., *Acc. Chem. Res.*, 25:336-342 (1992). Se ha postulado que los efectos de PEAA son debidos a su anfifilicidad más que a su estructura, consistente en un proceso de micelación conducido hidrofólicamente. Un proceso similar ha sido hipotetizado para la interacción de apolipoproteínas, melitina, y otras bases de polipéptidos anfifílicos en base a hélice  $\alpha$  con membranas lipídicas.

Varios péptidos también alteran las membranas endosomales en forma dependiente de pH. Ejemplos de péptidos que muestran alterar liposomas, eritrocitos, y endosomas, incluyen péptidos virales, tales como los péptidos de virus de influenza y péptidos que incluyen la secuencia de aminoácido 23 amino terminal de la hemaglutinina del virus influenza y péptidos relacionados cuyos virus desestabilizan las membranas endosomales en una manera dependiente de pH tal como GALA (también conocido como EALA) que incluye la repetición de bloques de ácido glutámico alanina-leucina-alanina. Estos péptidos han sido conjugados con complejos de ADN que utilizaron un camino de endocitosis mediada por receptor para la absorción en las células de cultivo. Una fuerte correlación fue observada entre la interrupción de eritrocitos específica de pH con la transferencia de genes. Plank, C. et al., *J. Biol. Chem.* 17 (269): 12918-12924 (1994); Hughes, J.A. et al., *Pharm Res.*, 13(3):404-(1996). Otros péptidos incluyen la melitina y derivados, que son formadores de canales de membrana. Pawlak, M. et al., *Protein Science* 3:1788-1805 (1994). GALA ha sido conjugada con un polímero policatiónico (polímeros cascada poliamidoamina, polímeros dendríticos sintetizados de metil acrilato y etilendiamina), y el polímero bloque policatiónico ha sido complejado con plasmidos que codifican a los genes mensajeros. Haensler, J. et al., *Bioconj. Chem.*, 4:372-379 (1993).

Ninguno de estos métodos o materiales han resuelto el transporte o los problemas de administración. Sería ventajoso proporcionar composiciones mejores para administrar agentes terapéuticos y/o de diagnóstico al citoplasma de una célula sin significativa degradación lisosomal.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que mejoren el transporte de agentes terapéuticos o de diagnóstico, incluyendo proteínas o material genético, barreras celulares o capas celulares, o a través de membranas lípidas.

Es un objetivo más de la presente invención proporcionar tales composiciones que pueden ser controladas y manipuladas externamente, por ejemplo, usando medios no-invasivos como ultrasonido para mejorar la administración o el transporte.

### Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención trata de una composición como se define en la reivindicación 1. Posteriores realizaciones son definidas en las reivindicaciones 2 a 22. En otro aspecto, se proporciona un uso como se define en la reivindicación 23, reivindicación 30 y reivindicación 31.

Se describen composiciones y métodos para el transporte o liberación de agentes terapéuticos o de diagnosis o metabolitos u otros analitos de células, compartimientos dentro de células, a través de capas celulares o barreras celulares, o membranas lípidas. Las composiciones incluyen un agente alterador de membrana o "agente que mejora el transporte de barrera de membrana" como se define en la reivindicación 1 y son usualmente administrados en combinación con un potenciador y/o exposición a estímulos para efectuar la alteración, transporte o liberación. En una realización preferida, las composiciones incluyen compuestos que alteran las membranas endosomales en respuesta al bajo pH en los endosomas pero que son relativamente inactivos hacia las membranas celulares, asociadas directa o indirectamente o a un agente terapéutico o de diagnóstico. Otro estímulo de alteración puede ser usado con el agente que mejora el transporte de barrera de membrana, como la luz, estímulo eléctrico, estímulo electromagnético, ultrasonido, temperatura o combinaciones de los mismos. Los compuestos pueden estar asociados por enlaces iónicos, covalentes, hidrofóbicos o H a un agente a administrar, a un ligando que forma un complejo con el agente a administrar o a un portador. Agentes a administrar pueden ser agentes terapéuticos y/o diagnósticos, incluyendo proteínas o péptidos, moléculas orgánicas sintéticas, nucleótidos u oligonucleotidos, carbohidratos, metales, radiomarcaje, o combinaciones de las mismas.

En una realización preferida, los compuestos que alteran la membrana endosomal son polímeros, más preferibles polímeros sensibles a pH que son inertes a pH fisiológico (alrededor de 7.4) pero que alteran la membrana endosomal en el rango de pH dentro del endosoma (entre 5.1 y 5.5). Polímeros adecuados incluyen ácidos poli (alquil)acrilicos, polímeros catiónicos, copolímeros de polímeros con proteínas sensibles a pH y/o péptidos que alteran los endosomas en el rango de pH interno de los endosomas, y copolímeros con péptidos que contienen grupos imidazolas y/o otros grupos que se sabe que alteran la membrana endosomal. Opcionalmente, las composiciones pueden incluir compuestos que minimizan la función lisosomal, potencian la endocitosis o dirigen las composiciones a

tipos de células particulares. Alternativamente, o además, la composición puede incluir ligandos tales como materiales policatiónicos como polilisina o quitosán, que forman un complejo con el agente a administrar, estabilizando el agente y en algunos casos además aumentando la endocitosis causando la alteración de la membrana. Las composiciones pueden también incluir un portador, por ejemplo, nanopartículas o micropartículas, liposomas o vesículas lipídicas. Los vehículos lipídicos, especialmente liposomas catiónicos, podrían causar a sí mismos la alteración de la membrana. Los agentes alteradores de membrana pueden ser incorporados sobre, dentro o con estos portadores. Las composiciones pueden ser administradas sistémicamente o localmente usando metodologías bien conocidas, en una cantidad efectiva para diagnosticar o tratar un paciente en necesidad de ello. Los materiales son particularmente de gran ayuda para administrar el material genético a las células *in Vitro*, por ejemplo, por terapia génica. Las composiciones son de gran ayuda para la manipulación de otros tipos de células como células bacterianas, que pueden ser fácilmente expuestas a un estímulo externo para causar alteración de la membrana, incluyendo cambios de pH.

Tratamientos que mejoran el transporte pueden también ser usados con los agentes alteradores de membrana. En una realización preferida particularmente, el ultrasonido es usado para mejorar el transporte hacia dentro o fuera de las células o a través de la piel. Esto es útil no solo para la administración del medicamento, sino también para el transporte de analitos como glucosa, que puede luego ser medida y la cantidad presente en el fluido intersticial correlacionada con los niveles de sangre. Este tratamiento es también particularmente de gran ayuda para la terapia génica en otros tipos de células tales como endoteliales y células musculares lisas, especialmente en el medio arterial, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de restenosis. El tratamiento puede ser aplicado al sitio antes, al mismo tiempo, o posterior a la administración del agente alterador de membrana. Una ventaja del ultrasonido es que el agente alterador de membrana, preferiblemente dirigido a células específicas, puede ser administrado sistémicamente, permitiendo tiempo para que el agente viaje a una localización distal, seguido por la administración del ultrasonido. El tipo preferido de ultrasonido es un ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU). El ultrasonido puede transportarse por una variedad de medios, incluyendo la aplicación directa del transductor a la superficie del tejido a tratar, o a alguna distancia de la superficie del tejido, en ambos los que tanto las ondas planas y las ondas acústicas focalizadas pueden ser utilizadas. El rango de frecuencias óptimas está de 20kHz a 10MHz, preferiblemente menos que 3MHz.

#### Breve Descripción de los Dibujos.

La figura 1A es un gráfico que muestra la capacidad del poli (ácido etil acrílico) (PEAA) para lisar eritrocitos en función de pH. El porcentaje de hemólisis es mostrado en una solución de pH de 5.1 y 7.4, para 500 µg PEAA y para control. La figura 1B es un gráfico que muestra la capacidad del poli (ácido propil acrílico) (PPAA) para lisar eritrocitos en función de pH. El porcentaje es mostrado como una solución de pH de 6.1 y 7.4 para 3µg PPAA y para control. La figura 1C es un gráfico que compara la capacidad de PPAA y PEAA para lisar eritrocitos en función de pH. El porcentaje de hemólisis es mostrado en una solución de pH de 6.1 para PPAA y PEAA. La figura 1D es un gráfico que compara la capacidad del poli (ácido butil acrílico) (PBAA) y PPAA para lisar eritrocitos en función de pH. El porcentaje de hemólisis es mostrado como una solución de pH de 6.1 y 7.4 para PBAA y 6.1 para PPAA. La figura 1E es un gráfico que compara la capacidad al azar del copolímero de etil acrilato y ácido acrílico (EA-AA) y PEAA para lisar eritrocitos como una función de pH. El porcentaje de hemólisis de eritrocitos es mostrado en una solución de pH de 5.5.

La figura 2 es un gráfico comparando la capacidad de EALA (GALA) y un ácido conjugado EALA/poliacrilico (GALA/PAA) para lisar eritrocitos. El porcentaje de hemólisis de eritrocitos versus la concentración es mostrada para ambos EALA y el ácido conjugado EALA/poli acrílico.

La figura 3 es un gráfico que compara la capacidad de PEAA, un conjugado IgG/PEAA, y para IgG solo para lisar eritrocitos. El porcentaje de hemólisis de eritrocitos versus la concentración es mostrada para PEAA, un conjugado IgG/PEAA y para IgG solo.

Las figuras 4A-D son graficas comparando la capacidad de PEAA, un conjugado de estreptavidina/PEAA, PEAA biotinilado y un conjugado de estreptavidina/biotina-PEAA (en una proporción de 3:1 o 1:1) para lisar eritrocitos. El porcentaje de hemólisis de eritrocitos versus la concentración de polímero es mostrado para PEAA, un conjugado de estreptavidina/PEAA, PEAA biotinilado y un conjugado de estreptavidina/biotin-PEAA es mostrado en las figuras 4A y 4B; porcentaje de hemólisis de el eritrocitos como una función de pH es mostrada en las figuras 4C y 4D.

La figura 5 es un esquemático de terapia de inmunotoxina usando alteración de membrana inducida por polímero sensible a pH.

La figura 6 es un gráfico del incremento de la toxicidad de RTA por la mezcla con PPAAC, medida como un porcentaje normalizado de la síntesis de proteína en función de la concentración del polímero (µg/ml) para RTA, PPAAC, y RTA+PPAAC.

La figura 7A es un gráfico del efecto de la combinación de PEAA y ultrasonido en hemólisis de eritrocitos (porcentaje de hemólisis en el tiempo en minutos). La figura 7B es un gráfico del porcentaje de hemólisis para PEAA, ultrasonido, PEAA seguido de ultrasonido a pH 6.1, ultrasonido seguido de PEAA a pH 6.1, y PEAA seguido de ultrasonido a pH 7.4.

**Descripción Detallada de la Invención****A. Composiciones para Mejorar el Transporte de Membrana y****Métodos de Realización del mismo.**5 1. Agentes Mejoradores del Transporte de Barrera de Membrana.

10 Cualquier agente alterador de membrana puede ser usado para alterar el transporte por las células, liposomas o otras vesículas lípidas, membranas dentro de un célula o a través de capas celulares tale como la capa de la cornea, que no afecta adversalmente la capacidad del agente terapéutico o diagnóstico a la función posterior a la administración, y que rompe la membrana o el espacio intersticial tal que el agente es estregado pasando a través de la célula o capa celular (es). Aunque referido aquí como “agentes alteradores de membrana”, los agentes no alteran, de hecho, la membrana por lo que el término se puede intercambiar por “agente aumentador de transporte barrera de membrana”. Por ejemplo, un número de polímeros responden a grandes cambios físicos a pequeños cambios en las condiciones del medio, tal como la solución de pH, fuerza iónica, composición de solvente, temperatura, luz y campo eléctrico. Estos polímeros están referidos como un estímulo respuesta, sensibles al medio, polímeros “inteligentes” o “listos”. Hoffman, A.S., “Intelligent Polymers in Medicine and Biotechnology”, Macromol. Symp., 98, 458-467 (1995). En el caso de los agentes alteradores de membranas endosomales, es preferible usar polímeros que rompan membranas por virtud del bajo pH en los endosomas tal que los agentes que sean administrados lo hagan en el citosol sin una degradación significativa por los lisosomas.

20 Aunque se describe aquí con referencia a la alteración de las membranas endosomales como comparación de membranas celulares, barreras celulares, capas de células o membranas liposomales, los agentes pueden ser usados para administrar a células, fuera de células, o a través de capas celulares o barreras tales como barreras cerebrales sanguíneas, o liposomas o otras vesículas lípidicas por alteración de otras membranas que membranas endosomales, si el estímulo induce a alteración puede ser proporcionado selectivamente a la membrana de la célula para ser rota.

Agentes sensibles a pH**Polímeros**

30 Ejemplos de agentes alteradores de membrana endosomal incluidos polímeros sensibles al pH que no alteran las membranas de la célula a pH fisiológico pero que alteran la membrana endosomal en un rango de pH dentro de los endosomas, aleatoriamente, copolímeros bloque o de injerto de esos polímeros con péptidos que llegan a ser hidrofóbicos en el rango de pH en el endosoma y polímeros, proteínas, y péptidos que atacan las bicapas fosfolípidas.

35 Cualquier polímero que pueda ser usado que sea hidrofóbico a pH fisiológico, típicamente en el rango entre 6.8 y 7.5, y aproximadamente 7.4 en el interior de las células, pero que llegan a ser hidrofóbicas al pH interno de los endosomas (entre 5.0 y 6.5). Los polímeros que incluyen múltiples grupos de ácidos carboxílicos, por ejemplo, polímeros con mas de 0.5 grupos de ácido carboxílico por monómero de media, tienden a ser relativamente hidrofílicos a rangos de pH en los cuales los grupos de ácido carboxílicos son desprotonados, y tienen a ser relativamente hidrofóbico a rangos de pH en los cuales los grupos de ácidos carboxílicos son protonados. El pKa para los grupos de ácido carboxílico es tal que ellos tienden a ser protonados en el rango de pH presente en los endosomas.

40 Aleatoriamente, los copolímeros bloques o de injertos que incluyen grupos acrilato y grupos acrilatos alquil sustituidos son preferidos. Preferiblemente, el grupo alquil es una cadena de C<sub>1-6</sub>, ramificada o cicloalcano. Los monómeros preferidos para el uso de la preparación de materiales poliméricos incluyen poli (ácido etil acrílico) (PEAA), poli (ácido propil acrílico) (PPAA), y poli (ácido butil acrílico) (PBAA). Los copolímeros de estos monómeros son ellos mismos o incluso los ácidos acrílicos pueden ser usados. Un ejemplo de un copolímero al azar es EA-AA. Este podría ser modificado injertado un componente de la columna vertebral de otro compuesto, o por un copolímero bloque de un conjugado a un bloque de otro.

45 Aleatoriamente, un copolímero bloque o de injerto de polímeros sensibles a pH con grupos sulfonados pueden ser también sintetizados. Los grupos sulfonados interactuarán fuertemente por interacciones ión-ión con las cargas del polímero catiónico o portadores lípidos de ADN y deberían incrementar el acoplamiento físico de los polímeros sulfonados con los portadores catiónicos. Los grupos carboxilos en polímeros sensibles a pH no deberían interactuar tan fuertemente como los grupos sulfonados con los grupos catiónicos en los portadores. Los polímeros sensibles a pH pueden ser modificados por inclusión de AMPS, un monómero acrilamida propil sulfonado. Además, grupos -COOH y terminales hidrofóbicos en los polímeros, monómeros que tienen grupos terminales sulfonados pueden ser añadidos (pe, usando un monómero llamado AMPS que

es un monómero metacrilamida propil sulfonado y esta disponible comercialmente), que no permitiría el enlace iónico fuerte de nuestro polímero alterador de membrana a el portador catiónico de ADN, incluyendo micelas lípidas catiónicas o liposomas, cationes poliméricos y dendrimeros. El grupo sulfonato  $-SO_3^-$  se acoplará mas fuertemente a un grupo catiónico cuaternario que el grupo  $-COO^-$ , y los pHs de 5-6.5 dentro del endosoma, solo el grupo  $-COOH$  será protonado, debido al bajo pK del grupo  $-SO_3^-$ .

Los polímeros pueden incluir bloques de otros materiales poliméricos, incluyendo bloques policatiónicos tales como polilisina o quitosán que forman complejos con el material genético. Tales polímeros policatiónicos son bien conocidos en la técnica. Los polímeros pueden ser también acoplados covalentemente a uno o más de un polisacárido naturalmente-ocurrido, ejemplo un ester hidrocarbonato de carboximetil celulosa (CMC), esteres de hidrocarbóno o amidas de ácido hialurónico (HA). Los hidrocarbónos pueden ser o pueden incluir colesterol y otras moléculas hidrofóbicas.

Importantes variables de la composición del polímero las cuales cambian las características del polímero incluido el peso molecular ("pm") y su distribución, tacticidad de las configuraciones de unión del polímero de cadena principal, estructura del copolímero, enlaces degradables y composición del polímero. Por ejemplo, los polímeros pueden ser sintetizados en formas estereoregulares (p.e. formas isotácticas o sindiotácticas, que son estereoregulares), o forma atáctica, en la que falta cualquier estereoregularidad. Esto puede ser controlado, por ejemplo, a través de la selección de apropiados solventes durante la polimerización. Los copolímeros están formados de dos o más diferentes monómeros. Estos pueden ser copolímeros al azar, con organización aleatoria de dos monómeros a lo largo de la estructura de la cadena del polímero, o pueden ser copolímeros bloques con largos segmentos de un polímero adjunto relativamente a largos segmentos del otro. Estos también pueden ser copolímeros de injertos, donde uno de los dos componentes está acoplado como una cadena a la otra, la cual forma la estructura del copolímero. El copolímero bloque o de injerto pueden contener segmentos que actúan para romper las membranas lípidas y otros segmentos que pueden llevar acoplado medicamentos iónicamente o covalentemente, donde el ADN es un ejemplo de la unión al medicamento iónicamente.

Como se demostró en los ejemplos, los copolímeros aleatorios pueden ser sintetizados de monómeros convencionales para demostrar la "ingeniería molecular" de la composición de copolímeros que tengan propiedades alteradoras de membrana a pH menores de 7.4. A pH menores para estos nuevos copolímeros, mostrarán un aumento brusco en la hemólisis con la pH decreciente que ocurre a diferentes pHs para las diferentes composiciones de polímero. El ejemplo 1 demuestra que un copolímero aleatorio 1:1 de etil acrilato (EA) y ácido acrílico (AA) pueden causar hemólisis de RBCs a pH bajo, como hace el homopolímero del ácido etilacrilico (PEAA), que imita en composición. El ejemplo 1 también muestra que los copolímeros aleatorios de EA-AA como los copolímeros aleatorios de propil acrilato (PA) con AA, y butil acrilato (BA) con AA, son efectivamente agentes hemolíticos de diferentes grados a pH 5.5. Si el contenido de comonómero hidrofóbico es aumentado suficientemente, los copolímeros pueden causar la hemólisis a pHs mayores como a pH 7.4. La mayoría de las composiciones de polímeros hidrofóbicos que son de membrana alteradora a pHs por encima de 6.0 por ejemplo, hasta 7.4, podrían ser adecuados para aumentar el permeado transdermal o transmucosal en presencia de un estímulo físico tal como el ultrasonido, o campos eléctricos o electromagnéticos.

#### Péptidos

Los péptidos que pierden su carga a pH bajo y llegan a ser hidrofóbicos, de ahí que cambien su estructura u otras propiedades, rompiendo la membrana endosomal en el proceso, puede ser usado como polímeros bloques sensibles a pH como se describe arriba. Ejemplos de tales péptidos incluyen péptidos virales y bacterianos, tales como péptidos de virus influenza, péptidos que incluyen la secuencia del amino ácido terminal amino 23 de la hemoglutinina del virus influenza, y péptidos que imitan la clase en la que los virus desestabilizan las membranas endosomales en un tipo de acidificación dependiente. Tales péptidos imitan la estructura de la proteína de virus que desestabilizan las membranas endosomales. Por ejemplo, los péptidos basados en la proteína de la hemoglutinina del virus influenza (HA) ha sido estudiada para sufrir un cambio estructural a pH bajo debido a la protonación de los grupos carboxílicos, provocando la formación de una conformación  $\alpha$ -helicoidal. Estas hélices antipáticas pueden entonces penetrar y causar una alteración en la membrana endosomal. Ejemplos de péptidos adecuados incluyen EA-LA (conocido como GALA), un péptido que tiene una repetición de la estructura glutámica ácido- alanina-leucina-alanina, y melitina.

Estos péptidos pueden ser incorporados a los polímeros, por ejemplo, polímeros sensibles a pH descritos arriba. El copolímero de injertos de ácido GALA-poliacrilico puede ser preparado, por ejemplo, polimerizando el monómero N-acriloxi-succinimida a través de la polimerización de un radical libre, reactuando el resultado de poli- (N-hidroxisuccinimida) (poli-NHS) con una deseada proporción molar de GALA en un solvente polar aprótico como dimetilsulfoxida (DMSO), e hidrolizando los grupos NHS restantes no reaccionados para cederlos a los copolímeros de injertos. La proporción molar de GALA de los monómeros acriloxi deberían presentar al menos un, grupo de ácido carboxílico para que estén presentes en el polímero final. Sin los restantes grupos de ácidos carboxílicos, la capacidad del polímero para responder a los cambios

de pH son es limitado. La incorporación de los péptidos en estos polímeros se incrementa dramáticamente y en algunos casos pueden conceder la actividad en los péptidos cuando ellos están de otra manera inefectivos.

Estructuralmente relacionados los co-polímeros de injertos, pueden ser preparados por la sustitución, por ejemplo, de metil acriloxi succinimida, etil acriloxi succinimida, propil acriloxi succinimida, butil acriloxi succinimida, y combinaciones de la misma.

Los copolímeros bloques pueden ser preparados sintetizando secuencias de EALA adjuntas a las secuencias de melitina. Los copolímeros bloques pueden ser preparados, incluyendo diferentes polímeros sintéticos, usando técnicas de polimerización de transferencia de grupo. Los conjugados de dos diferentes polímeros o péptidos pueden ser más efectivos que uno sólo, o mezclas físicas de los dos. La purificación del conjugado de los componentes libres puede ser desarrollada usando la cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, un intercambio fuerte del catión. Es ventajoso eliminar el polímero libre del conjugado del polímero y el agente que va a ser transportado. El polímero libre, estando negativamente cargado, puede ser separado del conjugado por la cromatografía de intercambio iónico. La carga negativa tiende a cambiar la afinidad del anticuerpo para que la matriz de intercambio del catión, haga posible la separación del anticuerpo libre desde el conjugado.

#### **Agentes Alteradores de la Bicapa Fosfolípida**

Los polipéptidos y polímeros que incluyen grupos imidazolas, pueden también ser agentes alteradores de membranas endosomales que funcionan atacando la bicapa fosfolípida a pH bajo. Los grupos imidazola hidrolizan los esteres fosfatos y esteres carboxil. La hidrólisis de los lípidos lidera la formación de lisofosfolípidos y ácidos grasos, ambas las cuales desestabilizan las bicapas fosfolípidas y causan la alteración de las membranas celulares. De acuerdo con estos polímeros y péptidos pueden ser usados como polímeros bloques o acoplados a los polímeros sensibles al pH y las proteínas descritas arriba.

Polímeros adecuados y polipéptidos incluyen los polímeros que incluyen unidades monoméricas de vinil imidazola y proteínas y péptidos que contienen residuos de histidina. Por ejemplo, el ácido etil acrílico monomérico puede ser copolimerizado con vinil imidazola. A pH 7.4, este polímero no interactuará con la bicapa lipídica; sin embargo, a pH bajo, este polímero llegará a ser hidrofóbico e interactuará con la membrana endosomal, trayendo el grupo imidazola cerca de los fosfolípidos, donde puede hidrolizarlos y causar la alteración de la membrana. La poliimidazola tiene su gran actividad catalítica cuando se ha protonado y desprotonado a la mitad. El pKa de la poliimidazola está sobre 6.5 y de ahí debería tener una gran actividad en los endosomas. Estos polímeros y polipéptidos pueden ser usados para formar copolímeros bloques o de injertos con polímeros sensibles a pH y los péptidos descritos arriba.

#### Agentes sensibles a otros Estímulos

Los agentes que pueden utilizarse, los cuales son sensibles a otros estímulos incluidos la temperatura, luz, estímulo eléctrico, radiación y combinaciones del mismo, sólo o en combinaciones con agentes sensibles a pH. Los polímeros descritos aquí son temperatura-, pH-, polímeros sensibles a la luz y/o ión. Hoffman, A.S., *Artif. Organs*, 19, 458-467 (1995); chen, G.H. y A.S. Hoffman, *Macromol. Chem. Phys.*, 196, 1251-1259 (1995); Irie, M. y D. Kungwachakun, *Maokromol. Chem., Rapad Común.*, 5, 829-832 (1995); y Irie, M., *ACS Polym. Preprints*, 27 (2), 342-343 (1986).

#### **Polímeros Sensibles a la Temperatura**

Polímeros sensibles a la temperatura son descritos por Feijen, et al., 11th European Conf. on BiomtIs., 256-260 (1994); Monji y Hoffman, *Appl. Biochem. and Biotech.*, 14, 107-120 (1987); Monji, et al., *Biochem. And Biophys. Res. Comm.*, 172, 652-660 (1990); Park, et al., *J. BiomtIs. Sci. Polymer Ed.*, 4,493-504 (1993); Chen and Hoffman, *Bioconj. Chem.*, 4, 509-514 (1993); Ding, et al., *Bioconj. Chem.* 7, 121-125 (1995); Chen and Hoffman, *Macromol. Chem. Phys.*, 196, 1251-1259 (1995); Takei, et al., *Bioconj. Chem.* 4, 42-46 (1993); Takei, et al., *Bioconj. Chem.*, 4, 341-346 (1993); (18) Takei, et al., *Bioconj. Chem.*, 5, 577-582 (1994); Matsukata, et al., *J. Biochem.*, 116, 682-686 (1994); Chilkoti, *Bioconj. Chem.*, 5, 504-507 (1994).

Fabricaciones ilustrativas de muchos diferentes tipos de polímeros que responden a la temperatura son polímeros o copolímeros de N-isopropil archilamida (NIPAAm). El PoliNIPAAm es un polímero térmicamente sensible que precipita fuera del agua a 32°C, por lo que la temperatura crítica de baja solución (LCST), o punto de vaporización (Heskins y Guillet, *J. Macromol. Sci.-Chem.* A2:1441-1455 (1968)). Cuando el poliNIPAAm es copolimerizado con más monómeros hidrofílicos como la archilamida, el LCST aumenta. Lo opuesto ocurre cuando es copolimerizado con más comonómeros hidrofóbicos, tal como N-t-butil-acrilamida. Los copolímeros de NIPAAm con más monómeros hidrofílicos, tal como AAm, tienen un alto LCST, y un amplio rango de temperatura de precipitación, mientras que los copolímeros con monómeros más hidrofóbicos, como N-t-butil acrilamida, tiene un LCST inferior y generalmente son más parecidos a retener la característica de transición aguda de PNIPAAm (Taylor and Cerankowski, *J. Polymer Sci.* 13:2551-2570 (1975); Priest et al., *ACS Symposium Series* 350:255-164 (1987); and Heskins and Guillet, *J. Macromol. Sci.-Chem.*

A2: 1441-1455 (1968). Los copolímeros pueden ser producidos teniendo un alto o bajo LCST y un amplio rango de temperatura de precipitación.

Los polímeros que responden a la temperatura tal como poli(NIPAAm) han sido conjugados aleatoriamente por afinidad de las moléculas, tal como anticuerpos monoclonales, por ejemplo como se describe en U.S. Patent No. 4,780,409; y Monji y Hoffman, Appl. Biochem. Biotechnol. 14:107-120 (1987). PNIPAAm activado ha sido también conjugado a la proteína A, varias enzimas, biotina, fosfolípidos, secuencias de péptido RGD y otras moléculas interactivas.

Por copolimerización aleatoria, un NIPAAm térmicamente sensible con una pequeña cantidad (p.e. menos de 10 % en mol) de un comonomero sensible a pH tal como AAC, el copolímero mostrará sensibilidad a ambas, temperaturas y a pH. Su LCST no estará casi afectado, a veces incluso a unos bajos grados inferiores de pH donde el comonomero no es ionizado, pero será fuertemente elevado si los grupos sensibles a pH son ionizados. Cuando el monómero sensible a pH está presente en un alto contenido, el componente sensible a la temperatura de la respuesta de LCST podría ser "eliminado" (p.e. separación de las no fases hasta 100°C). Los copolímeros de monómeros bloques y de injertos sensibles a pH y a la temperatura, pueden ser sintetizados para retener ambas transiciones de pH y temperatura independientemente. Chen, G.H., y A.S. Hoffman, Nature, 373, 49-52 (1995).

#### **Polímeros sensibles a otros estímulos ambientales.**

Los polímeros sensibles a otros estímulos ambientales como la concentración de ión, afinidad de ión, solubilidad diferencias son descritos por Fujimura, et al. Biotech. Bioeng., 29, 747-752 (1987); Nguyen y Luong, " Biotech. Bioeng., 34, 1186-1190 (1989); Taniguchi, et al., Biotech. Bioeng., 34, 1092-1097 (1989); Monji, et al., J. Biomtls. Sci. Polymer Ed., 5, 407-420 (1994); Chen y Hoffman, Biomtls., 11, 631-634 (1990); Stayton, et al., Nature , 378, 472-474 (1995).

Polisacáridos como carragenanos cambian su conformación, por ejemplo, de desordenada a ordenada, como en función de la exposición de iones tales como K<sup>+</sup> o Ca<sup>++</sup>. Una solución de alginato sódico puede ser gelatinizada por exposición al Ca<sup>++</sup>. Otros específicos polímeros sensibles al ión, incluyen los polímeros con grupos quelantes iónicos terminales, tal como histidina o ETDA, etc. Un grupo lípido o fosfolípido puede ser químicamente o iónicamente acoplado a la estructura del polímero alterador de membrana, para facilitar su inserción en la micela lípida catiónica o sistemas portadores de ADN del liposoma. Esto podría hacerse por ejemplo, por conjugación de un alcohol graso a un grupo terminal -COOH para formar un grupo ester, o por conjugación de dipalmitoil fosfatidil etanolamina a grupo terminal -COOH para formar un grupo amina. Los grupos lípidos podrían estar químicamente acoplados a un grupo terminal de los polímeros. Si el monómero sulfonato AMPS descrito arriba es usado en el polímero alterador de membrana, entonces podría iónicamente acomplejar a un lípido catiónico para así facilitar al polímero su inserción en los sistemas portadores de medicamento en el lípido catiónico.

#### **Polímeros Sensibles a la Luz**

Los polímeros con respuesta a la luz, usualmente contienen grupos terminales cromofóricos a lo largo de la cadena principal del polímero y cuando son expuestos en una adecuada longitud de onda, puede isomerizarse desde la forma trans a cis, por lo que es bipolar y más hidrofílico y puede causar cambios reversibles conformacionales en los polímeros. Otros componentes sensibles a la luz pueden ser convertidos por estimulación de la luz de un estado no ionizado relativamente hidrofóbico no polar a un estado iónico hidrofílico. Esto es posible porque incorpora múltiples sensibilidades ambientales en el mismo polímero, como la temperatura y la sensibilidad a la luz, por copolimerización.

En el caso del grupo terminales de polímeros sensibles a la luz, los colorantes sensibles a la luz, tal como compuestos aromáticos azoicos o derivados de estilbena, podría conjugarse con un monómero reactivo (una excepción es un colorante como la clorofilina, que contiene un grupo vinil) y entonces homopolimerizarse o copolimerizarse con otros monómeros convencionales, o copolimerizarse con monómeros sensibles a la temperatura o pH utilizando la polimerización de transferencia de cadena como se describe arriba. El grupo sensible a la luz, podría conjugarse con un extremo de un polímero sensible diferente (ej, temperatura). Un número de protocolos para cada síntesis de monómero colorante-conjugado son conocidos.

Los compuestos sensibles a la luz podrían ser moléculas colorantes que isomerizan o llegan a ser ionizadas cuando absorben ciertas longitudes de ondas de luz, conviertolas de conformaciones hidrofóbicas a hidrofílicas, o podrían ser otras moléculas colorantes que emiten calor cuando se absorben en ciertas longitudes de ondas de luz. En el primer caso, la isomerización solo causa una expansión de la cadena o el colapso, mientras que en el segundo caso, el polímero precipitara solo si es sensible a la temperatura.

Los polímeros sensibles a la luz usualmente contienen grupos terminales cromofóricos de la cadena principal del polímero. Los grupos cromofóricos típicos que han sido utilizados son los colorantes diazoicos aromáticos (Ciardelli, Biopolymer 23: 1423-1437 (1987); Kungwachakun y Irie, Makromol. Chem., Rapad Común. 9:243-246 (1988); Lohmann y Petrak, CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 5 :263 (1989) ; Mamada et al., Macromolecules 23 : 1517 (1990). Cuando este tipo de colorante es expuesto a luz UV 350-410 nm, la forma trans de colorante diazoico aromático, la cual es más hidrofóbica, es isomerizada a la forma cis, que es bipolar y más hidrofílica, y esta puede causar cambios

conformacionales en el polímero, causando una solución de polímero de turbia a clara, dependiendo del grado de la conjugación-colorante de la estructura de la cadena y la solubilidad del agua de la unidad principal de dicha estructura. La exposición a unos 750 nm en la luz visible invertirá este fenómeno. La conversión de los grupos terminales de un estado hidrofílico a hidrofóbico puede causar que las cadenas individuales se expandan o colapsen sus conformaciones. Los colorantes sensibles a la luz podrían ser incorporados a lo largo de la cadena principal, tal que la conformación cambia debido a la isomerización inducida del colorante que provocará cambios conformacionales en la cadena del polímero. Cuando la principal cadena del polímero contenga grupos sensibles a la luz (ej, colorantes azoico benceno), el estado, estimulado por la luz puede contraerse y hacerse más hidrofílico a la isomerización de la luz-inducida.

La luz puede utilizarse como un estímulo, por ejemplo, que convierte un colorante catiónico a neutro, más hidrofóbico, de ahí que la liberación de ADN aniónica y la producción de una molécula más hidrofóbica que pueda romper las membranas endosomales.

#### Tratamientos para Aumentar la Alteración de Membranas

Como se describe arriba, los agentes de alteración de membrana son transportados a las células o las barreras de células donde el transporte es deseado, en el punto donde el estímulo, tal como un cambio de pH en el sitio, o un estímulo externo como cambios de luz y temperatura, es aplicado y la membrana se rompe. La alteración puede ocurrir también debido a los efectos combinados de los agentes alteradores de membrana con los tratamientos físicos que aumentan la eficacia del tratamiento, tal como la aplicación de ultrasonido, campo eléctrico, campo electromagnético, iónoforesis, electropolarización o combinación de los mismos.

#### Ultrasonido

El ultrasonido será aplicado usando dispositivos los cuales están disponibles comercialmente. Estos dispositivos tienen un rango terapéutico de entre 20 kHz y 10MHz, y son utilizados normalmente al menos a 3MHz. En una realización en la que es deseable inducir a la cavitación, un campo ultrasónico (US) de baja intensidad (que provoca la cavitación) es aplicado a las células en suspensión en presencia de polímeros alteradores de membrana. Como se demostró por ejemplos, los polímeros significativamente aumentan la alteración de las membranas y liberan las moléculas que se inducieren a través del ultrasonido. La dosis efectiva del agente alterador de membrana puede ser determinada empíricamente, midiendo la cavitación (acústicamente o por producción de radicales libres o trazadores químicos como la yodina) o midiendo el transporte o la liberación de material desde el interior de las células o por endocitosis y por el tráfico intracelular de medicamentos en las células. Cuando la piel está ligeramente acidificada, ello podría ser posible hacer una composición de polímero a través de la ingeniería molecular para promover el permeado específico de medicamentos en presencia del campo de ultrasonido de cavitación.

El ultrasonido puede ser aplicado continuamente o por pulsos. El ultrasonido puede ser aplicado a células en suspensión o directamente a células en el tejido o transdermalmente, usando un apropiado medio de ultrasonido, antes, durante o después de la administración de los agentes alteradores de membrana.

#### Campos Eléctricos

La iónoforesis, electroporación, u otras aplicaciones de campos eléctricos para aumentar el transporte son conocidas. Estas pueden ser utilizadas en combinación con la administración de agentes de alteración de membrana para aumentar la alteración de membrana. Los campos eléctricos pueden ser aplicados en bajo voltaje, campos eléctricos continuos, o altos voltajes, campos eléctricos por pulsos. El campo eléctrico puede ser aplicado para inducir un flujo electroforético de moléculas cargadas a través de la piel de las células (iónoforesis). La electroporación es el uso de un campo eléctrico para romper la capa celular o la membrana.

#### Radiación

Los tipos de radiación incluida la radiación ionizante y la terapia fotodinámica podría ser útil en combinación con los agentes de alteración de membrana, especialmente aquellos que son sensibles a la luz. En la terapia fotodinámica, la luz de la fuente correcta y longitud de onda es absorbida por fotosensibilizadores cuando utiliza la energía absorbida para convertir el oxígeno que está normalmente en estado triplete a oxígeno simple, el cual es un potente destructor de célula. Esto último es particularmente efectivo en el transporte de medicamentos cito terapéuticos en las células tumorales.

#### II. Agentes de Diagnóstico y Terapéuticos.

Cualquier agente terapéutico, agente profiláctico o agente diagnóstico, puede ser unido iónicamente o covalentemente, directamente o indirectamente, al agente de alteración de membrana, tanto tiempo ya que la unión no interfiere con la actividad del agente terapéutico o de diagnóstico de la siguiente administración a la célula y a la endocitosis. El agente puede estar directamente acoplado al agente de alteración de membrana endosomal, tal que el agente que aumenta la endocitosis, un componente captador, un componente que disminuye la función del lisosoma; o al ligando adjunto o un agente de alteración de membrana endosomal que se une al agente terapéutico o de diagnóstico, tal como un polímero policatiónico que se une con el ácido nucleico.

Los agentes terapéuticos o de diagnósticos pueden ser nucleosidos, nucleótidos o oligonucleotidos, proteínas o péptidos, polisacáridos y otros azúcares, compuestos sintéticos orgánicos e inorgánicos, metales o compuestos radiactivos o moléculas.

5 Nucleosidos, nucleótidos y oligonucleotidos incluyen oligómeros y polímeros producidos naturalmente o nucleótidos modificados, incluidos los producidos naturalmente o purina modificada y bases pirimidinas, modificaciones 2' y 3' tal como O-alkil, modificaciones halo y azida, y modificaciones de uniones fosfato, por ejemplo sustitución de uniones fosforotioato por uniones fosfato. Los oligonucleotidos incluyen ARN y secuencias de ácido nucleico de cadenas dobles de ADN. Las moléculas pueden ser moléculas antisentido que unen el ADN complementario para inhibir la transcripción, genes, aptámeros, compuestos formados de triple hélice, ribozomas y secuencias guías externas para los ribozomas, ADNzimas, plásmidos de ADN, y vectores virales. Muchos plásmidos y vectores virales están disponibles comercialmente y un número ha sido usado en procesos clínicos, especialmente vectores adenovirales, vectores retrovirales, y vectores virales adeno-asociados. Los vectores incorporarán usualmente el gen que será transportado en fase y bajo el control de los agentes reguladores asociados para la expresión en la célula donde el material va a ser administrado. Los genes podrían ser genes marcadores, genes codificadores defectivos o de proteínas perdidas, o genes codificadores de una proteína letal.

20 Los compuestos preferidos para destruir células incluyen toxinas en base-glicoproteína tal como la ricina, la cadena B de la toxina de la difteria, y péptidos derivados del adenovirus, virus influenza, y el péptido GALA. Una toxina representativa es la ricina. La ricina es un heterodímero glicoproteína y se produce de manera natural e incluye una cadena-A con actividad de N-glicosidasa capaz de inactivar a las subunidades de los ribosomas 60S eucariotas, y una cadena-B capaz de unir las moléculas a la superficie de la célula (ej, los residuos de galactosa para ricina B). La cadena-A debe ser transportada a los ribosomas citosólicos para que las células sean destruidas: cuando estas toxinas se unen virtualmente a cada célula a través de la cadena-B, ellas no tienen la especificidad requerida para ser efectiva a los agentes quimioterapéuticos. Otras toxinas ribosilán y en consecuencia inactivan el factor de elongación 2 que es requerido para la síntesis de proteínas. Otras toxinas representativas son abrina, modeccina, exotoxina de pseudomonas, briodina, lectina de muérdago, toxina de Shiga, toxina lábil de Escherichia coli, toxina de Pertussis, toxina de cólera, toxina de ántrax, viscumina, saporina, gelonina, momordina, tricosantina, y proteína antiviral de Phytolacca. Las toxinas pueden ser conjugadas a un anticuerpo específico para absorberse en las células. Los polisacáridos como heparina también pueden ser utilizados, donde el polisacárido se une a los receptores en la superficie de la célula. Los componentes con un amplio rango de peso molecular, por ejemplo, entre 100 y 500,000 Daltons pueden ser usados.

35 Cuando el agente que es transportado es una toxina, y el agente que aumenta la endocitosis es un anticuerpo absorbido en la célula para ser destruida, el conjugado resultante es una inmunotoxina la cual puede efectivamente transportarse al citosol. El grupo carbohidrato presente en las regiones Fcs de los anticuerpos están en una localización conveniente para la conjugación. Cuando se oxida, estas regiones de carbohidratos ceden los grupos aldehídos, que no están presentes en otro lugar de la proteína. Cuando esta región se encuentra lejos del sitio de unión del epitopo, ello reduce la interferencia con el antígeno de unión. Además, abandona los residuos de lisina del anticuerpo, un acceso directo al sitio de conjugación, disponible para las secuencias de las conjugaciones. La cadena-A de toxinas, tal como ricina, pueden estar covalentemente unidas a un anticuerpo usando una conocida química de enlace, por ejemplo usando un cruzador heterobifuncional N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio-propinato) (SPDP), o por afinación reductiva. Estudios del cultivo celular con una célula de toxina, la proteína ricina (RTA) y un polímero sensible a pH, PPAA, son descritos en los ejemplos. Cuando el RTA es añadido al propio cultivo celular, y las células muertas no son descritas, se debe al tráfico intracelular de la toxina hacia los lisosomas. Cuando PPAA fue físicamente mezclada con RTA, el incremento de las concentraciones de la mezcla (a una proporción fijada de 3/1 PPAA/RTA) encabeza el aumento de las células muertas. El polímero propio no era tóxico a las células. Estas observaciones indican que el polímero está actuando dentro de la célula para aumentar la acción de la toxina, presumiblemente por la alteración de la membrana endosomal.

50 Los ejemplos posteriores demuestran la eficacia del conjugado Log y un complejo "conjugado" biotinilado PEAA-estreptavidina mostrando que los polímeros de alteración de membrana están todavía activos cuando se acoplan a la proteína. Los ejemplos también demuestran que PPAA es hemolítica cuando está acoplada a la estreptavidina y cuando está en libre solución.

55 Cualquier de las variedades de los agentes diagnósticos pueden ser empleados. Estos pueden ser administrados solos o acoplados a uno o más agentes terapéuticos descritos arriba. Los agentes pueden ser radio etiquetados, fluorescentemente etiquetados, enzimáticamente etiquetados y/o incluye tintes o compuestos magnéticos y otros materiales que pueden ser detectados usando rayos-x, ultrasonidos, resonancia magnética de imagen (RMI), tomografía de emisión de positrón (TEM), tomografía asistida por ordenador (TAO), tomografía de emisión simple de fotón por ordenador, fluoroscopia u otras tecnologías comúnmente usadas en el diagnóstico. Ejemplos de materiales adecuados para el uso de agentes de contraste en RMI incluyen quelatos de gadolinio actualmente disponibles, tal como ácido pentacético dietileno triamina (DTPA) y gadopentotato de dimeglumina, o como quelatos de hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo. Ejemplos de materiales de gran uso para (TAO) y rayos-x incluyen los materiales basados en yodina, tal como monómeros tipificados iónicos como diatrizoato y iotalamato, monómeros no iónicos como iopamidol, isohexol, y ioversol, dímeros no iónicos, tal como iotrol y iodixanol, y dímeros iónicos, por ejemplo iosagalto.

Los agentes de contraste de ultrasonido útiles que pueden ser acoplados a los agentes de alteración de membrana incluyen un agente de contraste acústico que es preferiblemente brillante cuando es percibido con un ultrasonido de diagnóstico.

5 Los compuestos radioactivos pueden ser utilizados terapéuticamente. Los radioisótopos incluyen isótopos de indio ( $^{111}\text{In}$ ), yodo ( $^{131}\text{I}$ ) e itrio ( $^{90}\text{Y}$ ), los cuales pueden ser citotóxicos.

10 Estos materiales pueden estar acoplados al conjugado usando técnicas químicas estándar, o en algún caso, usando tecnología recombinante, por ejemplo, para hacer la fusión de la proteína. J. Clin. Oncol. 14, 1383-1400 (1996)). Las uniones covalentes pueden formarse a través de reacciones químicas conocidas para un especialista en la técnica. Por ejemplo, las glicoproteínas a menudo tienen grupos sacáridos que pueden oxidarse para proporcionar grupos aldehídos. Los grupos aldehídos reaccionan con la aminas para formar bases de Schiff, que pueden entonces reducirse con hidruro de cianoboro de sodio en un proceso conocido como la reducción de amina. Los péptidos que tienen grupos aminos y grupos de ácidos carboxílicos, polímeros con grupos de ácidos carboxílicos y polímeros y péptidos con grupos imidozoicos y otros grupos que hidrolizan membranas fosfolípidas en el rango de pH dentro de los endosomas que pueden estar covalentemente acoplados usando métodos bien conocidos para los especialistas en esta técnica. El agente puede estar acoplado por una unión degradable como un anhídrido, ester, ortoester, amida, base de Schiff o unión disulfida.

15 Los agentes pueden estar acoplados iónicamente a un complejo formando el material, que es covalentemente acoplado al agente de alteración de la membrana endosomal. Los oligonucleótidos y otros materiales negativamente cargados tal como agentes antitumorales antraciclino son conocidos para formar complejos con materiales policatiónicos. Los materiales adecuados policatiónicos incluyen poliaminas sintéticas y naturales como quitosán, poli (etilenoimina) (PEI), poli (N-N-dimetil-aminoetil metacrilato) (PDMAEMA), poliamidoamina (PAMAM), poli (vinil piridina), poli (imadozoico), poli (vinil amina) (obtenido por hidrólisis de polivinil formamida), formas cuaternarias de estas aminas, y dendrímeros de Starburst con grupos funcionales cationicos que son positivamente cargados a pH bajo. Los materiales policatiónicos pueden estar covalentemente o iónicamente unidos a los agentes de alteración del endosoma e iónicamente complejados a los agentes cargados negativamente para ser transportados. El complejo podría estabilizar y aumentar la endocitosis. Los componentes intercalados podrían usarse para el transporte de ácidos nucleicos. Por ejemplo, PEAA puede estar covalentemen unido al bromuro de etidio. Otros agentes intercalados incluyen algunos de porfinas y ftalocianinas.

20 Aunque se describió primeramente en referencia al transporte hacia las células, la misma tecnología puede ser usada para aumentar el transporte afuera de las células, o a través de las capas celulares. Por ejemplo, una puede aumentar el transporte de metabolitos u otros analitos en el fluido intersticial o dentro del citosol o a través de las barreras de membrana por administración de los agentes de alteración y por estímulos apropiados o estímulos como la luz, ultrasonido, campo eléctrico o cambio en la temperatura.

### III. Agentes Incrementadotes de Endocitosis y Agentes de Absorción

35 Los agentes que mejoran la endocitosis pueden ser acoplados iónicamente o covalentemente, directamente o indirectamente, a los agentes de alteración de membrana endosomal. Estos pueden utilizarse solos con el agente de alteración de membrana o en combinación con el agente de alteración de membrana y un potenciador como el ultrasonido, campo eléctrico y/o un estímulo. Agentes ejemplares potenciadores de endocitosis incluyen anticuerpos, estreptavidina-biotina, y ligandos receptor-membrana tal como péptidos receptores de transferasa, que no unen específicamente el agente de alteración de membrana endosomal a la célula donde el agente es transportado; policatiónicas; y fosfolipasas. Otros ligandos que interactúan con los receptores en la superficie de la célula incluyen la transferasa, galactosa, asialoorosomucoida, insulina, citoquina tal como interleuquina 2, y factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento epidérmico, factor derivado de las plaquetas, y factor de crecimiento del nervio. Ejemplos de conjugado de agentes de alteración de membrana endosomal y agentes potenciadores de endocitosis incluyen poli (ácido etilacrílico) (PEAA) directamente conjugado con Log y estreptavidina conjugada con un ligando (ej, Log), entonces complejo con PEAA biotinilado (B-PEAA), con un conjugado indirectamente al agente de alteración de membrana con el agente potenciador de endocitosis.

40 Otros compuestos que aparecen para potenciar la endocitosis y/o la alteración de membrana podrían ser incluidos en la formulación. Los policatiónicas, tales como polilisina, son particularmente efectivos cuando se usan en combinación con los materiales cargados negativamente tales como oligonucleótidos. En otra realización, el agente de alteración del endosoma está conjugado iónicamente o covalentemente, directamente o indirectamente con enzimas tales como fosfolipasas, neuroamididasas y esfingomilinasas, que son capaces de hidrolizar lípidos, por ese motivo se produce la alteración de la membrana. Enzimas adecuadas incluyen la esfingomilinasas aislada de la placenta humana y la fosfolipasa A2 de los lisosomas. Otros compuestos que no están directamente unidos al agente de alteración de membrana o al agente potenciador de endocitosis pero que se conoce que tienen estas propiedades como el glicerol, podrían incluirse en las formulaciones.

55 Ejemplos de moléculas encontradas en la superficie del tipo de célula específica incluidos antígenos específicos de células específicas (que pueden ser especies específicas, individuales o tejidos de origen), antígenos virales (en el caso de células virales infectadas) y antígenos tumorales. Estas moléculas pueden ser absorbidas usando anticuerpos,

preferiblemente anticuerpos monoclonales, más preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos humanizados, o usando ligandos receptor-específico. Los antígenos tumorales son más útiles como absorbentes para un anticuerpo conjugado quimioterapéutico o agentes citotóxicos. Estos no son marcadores específicos para células tumorales en la mayoría de los casos; pero ellos están sobrepuestos a las células tumorales comparadas con el tejido normal, o ellas se encuentran en asociación con el tejido normal fetal [CEA (Gold, et al., J. Exp. Med. 122, 467-481 (1965)), AFP (Abelev, Adv. Cancer Res. 14, 295-350 (1971)) o con células normales del progenitor de un órgano en el adulto (CEA). Los antígenos tumorales pueden estar localizados en el intersticio del tumor, o en la membrana celular del tumor, o en el núcleo o citoplasma de la célula tumoral.

Los antígenos que son encontrados en células en circulación y antígenos expresados en el tumor neovascular son directamente accesibles vía intravenosa (v.i.) por el reactivo administrado. Los antígenos que son expresados en la superficie del tejido o las células tumorales acceden directamente al intralesional (i.l.) o intraperitoneal (i.p.) por conjugados administrados. Los antígenos segregados en el intersticio tumoral son más accesibles por administración i.l.

Los agentes de alteración de membrana pueden estar conjugados en los ligandos de la célula a través de brazos separadores, tal como el polietilén glicol (PEG). Esto podría aumentar la efectividad del agente de alteración de la membrana endosomal. La efectividad de los injertos de los agentes de alteración para romper la estructura del polímero (ej, GALA-g-PAA) por conjugación o por inserción de ellos en el polímero vía separación de brazos PEG.

#### IV. Compuestos que Minimizan la Función del Lisosoma.

Las formulaciones incluyendo los agentes de alteración de membrana para la alteración de los endosomas pueden incluir cantidades efectivas de compuestos que minimizan la función del lisosoma. Cualquier compuesto que minimiza la función del lisosoma sin interferir en la eficacia del agente para ser transportado o con el agente de alteración de membrana que pueda ser usado. Los ejemplos incluyen enzimas inhibidoras de lisosomas en general. Otros compuestos adecuados son la amantadina, verapamil, cloroquina, clorpromazina, monesina, y cloruro de amonio.

#### V. Portadores

Las composiciones descritas aquí pueden ser incorporadas en las nano- y micropartículas, incluidas microesferas y microcapsulas, liposomas, vesículas lipídicas, emulsiones o complejos policatiónicos, usando cualquier método que no destruya la actividad de los agentes que son transportados. En otras realizaciones, los agentes de alteración son acoplados por enlaces iónicos, covalentes o hidrofóbicos de los polímeros con los lípidos catiónicos o portadores de partículas. En una realización preferida, el agente de alteración endosomal es un polímero que es hidrofóbico o ha sido hidrofóticamente modificado por ejemplo por conjugación con colesterol que puede ser incorporado al liposoma, especialmente liposomas catiónicos, por lo que el polímero forma parte del sistema de administración. Estos podrán ser usados solos con el agente de alteración de membrana o en combinación con el agente de alteración de membrana y un potenciador como el ultrasonido, campo eléctrico, y /o un estímulo.

Micropartículas y nanopartículas podrían estar preparadas usando una simple y doble emulsión de evaporación de solvente, spray de secado, extracción de solvente, evaporación de solvente, separación de fases, coacervación simple y doble, polimerización interfacial, y otros métodos conocidos en las características de la técnica. Métodos desarrollados para la realización de microesferas para la administración de medicamentos son descritos en la literatura, por ejemplo, como describió en Doubrow, M., Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", CRC Press, Boca Raton, 1992.

Las composiciones pueden ser administradas en otros vehículos fisiológicamente aceptables, tales como buffer de fosfatos salinos, u otros vehículos de administración tópica, local, intersticial o intravenosa.

#### **B. Métodos de Administración**

Las composiciones pueden ser administradas a las células directamente, tópicamente, en suspensión, como pomadas o spray, o a un animal, sistemáticamente, regionalmente (intralesionalmente) o localmente. Una dosis efectiva puede estar determinada por modificación en la actividad de la célula- por ejemplo, midiendo la muerte de la célula, por detección de un agente de diagnóstico, o por medida del transporte de un particular analito. Las composiciones pueden ser administradas en píldoras simples, continuamente, o repetidamente.

En una realización preferida, las composiciones son administradas in Vitro a las células. Por ejemplo, las células madres son eliminadas del cuerpo, con las composiciones tratadas, solas o en combinación con el potenciador como el ultrasonido, in Vitro para introducir material genético en las células, entonces se reintroducen en el paciente para ser tratadas. En otros ejemplos, las células bacterianas son tratadas con las composiciones y estímulos aplicados para causar la alteración de la membrana. El estímulo puede ser el cambio de pH.

Como se describe en los ejemplos, un test que predice la alteración de las membranas endosomales es el test de hemólisis eritrocito. Las propiedades de alteración de la membrana endosomal son evaluadas determinando la lisis de eritrocitos. El ensayo de hemólisis se dispone añadiendo un pequeño volumen (ej, 500 microgramos o 0.5 g de composición en 1% de solución, en 0.005 ml) de solución de composición a las células sanguíneas en suspensión de

aproximadamente  $10^8$  células (en un ml), e incubándose por una hora a  $37^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, las células son centrifugadas, y la absorbancia del sobrenadante es medida a 541 nm. Esto refleja el número de células lisadas.

En posteriores estudios deseados, uno puede etiquetar las composiciones con un fluoróforo dependiente de pH, como se discutió en Geisow, M. J. Fluorescein Conjugates as Indicators of Subcellular pH. *Experimental Cell Research*, 150:29-35 (1984). Los conjugados de endocitosis de las células, o su tráfico, son seguidos a través de la visualización del fluoróforo. Dependiendo de la emisión máxima, uno puede determinar si la composición está en un ambiente bajo de pH (endosoma) de pH fisiológico (el citoplasma).

En estas fabricaciones en que el agente que mejora la endocitosis ha sido incluido en las composiciones, esos experimentos pueden determinar si la afinidad del agente ha sido alterada por la conjugación, o si las capacidades de alteración de la membrana del polímero son efectivas en la estimulación de la liberación endosomal.

Las composiciones y métodos descritos aquí serán comprendidos en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplo1: Evaluación de la sensibilidad del pH de PEAA-62K; PPAA.**

##### Objetivo:

Los objetivos de este trabajo eran para determinar si los polímeros al azar del acrilato de ácido butil acrílico y el acrilato de ácido propil acrílico tienen potencial para actuar como agentes liberadores endosomales. Esto puede determinarse por la medida de la actividad hemolítica de los polímeros de arriba a pH endosomal (5.5) y pH fisiológico (7.4).

##### Protocolo:

(I) Síntesis de polímeros: Los polímeros y copolímeros aleatorios del acrilato de ácido propil acrílico y acrilato de ácido butil acrílico fueron sintetizados por polimerización de radicales libres en varias proporciones de alimentación de monómero, a granel, usando AIBN como iniciador. Las proporciones de alimentación de comonómero son indicadas en las figuras relevantes. Los polímeros fueron purificados por precipitación.

(II) Ensayo de Hemólisis: La sangre humana fue aislada en vacutainers conteniendo EDTA lavados tres veces con 150 mM de NaCl, y resuspendidas a concentración de  $10^8$  células/ml en buffer PBS a pH 5.5 o 7.4 o en buffer MES, como se estudió. Los polímeros fueron disueltos en DMSO o en buffer PBS a pH 10. El apropiado volumen de la solución de polímero fue añadido a la solución de RBC e incubado durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Las células fueron entonces centrifugadas y el grado de hemólisis fue determinado midiendo la absorbancia del sobrenadante a 541 nm. El 100% de la lisis fue determinada por la alteración de los glóbulos rojos en agua diionizada. Los RBCs suspendidos de control estuvieron en buffer sin el polímero.

El poli (ácido etil acrílico) con una etiqueta de peso molecular medio de 62.000 (PEAA-62K) (500 $\mu\text{g}$ ) fue añadido a la suspensión de glóbulos rojos de aproximadamente  $10^8$  células en 100mM MES a pH 5.1 o 100mM de fosfato sodico a pH 7.4, e incubado durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, las células fueron centrifugadas, y la absorbancia del sobrenadante fue medida a 541 nm. La absorbancia refleja el número de células lisadas. El control fue aproximadamente  $10^8$  células en el apropiado buffer.

PEAA logró casi el 100% de la lisis de eritrocito a pH 5.1 pero menos del 5% a pH 7.4, como muestra la figura 1 A. Por consiguiente, el polímero es útil como un agente de alteración de membrana endosomal.

PPAA (3  $\mu\text{g}$ ) fue evaluado usando el mismo diseño experimental. Los glóbulos rojos fueron suspendidos en 100 mM de fosfato sodico a pH 6.1 o 7.4.

Como muestra la figura 1B, PPAA logró casi el 100% de la lisis del eritrocito a pH 6.1, y menos del 10% en la alteración a pH 7.4. Por consiguiente, el polímero es útil como agente de alteración de membrana endosomal.

El mismo diseño experimental fue usado como se describe, con los glóbulos rojos en un buffer a pH 6.1 para comparar PEAA y PPAA.

Como se muestra en la figura 1C, significativamente se necesita menos PPAA que PEAA para lograr una substancial lisis a pH 6.1. Aproximadamente el 100% de la lisis se logró con aproximadamente 3  $\mu\text{g}$  de PPAA. Por consiguiente, PPAA es un agente de alteración de membrana significativamente mejor que PEAA.

La capacidad de PBAA para alterar eritrocitos fue comparada con la de PPAA a pH 6.1 y a pH 7.4 usando el mismo diseño experimental descrito arriba.

Los resultados se muestran en la figura 1D. PBAA mostró menos del 5% de lisis a pH 7.4, a una concentración de 5  $\mu\text{g}$ . A pH 6.1, PBAA y PPAA mostraron una lisis parecida, cediendo sobre el 100% de la lisis a una concentración

de unos 5 µg. Estos datos demuestran que PBAA y PPAA tienen una eficacia similar como agentes de alteración de membrana endosomal.

La capacidad de EA-AA (un copolímero aleatorio de etil acrilato y ácido acrílico) para alterar eritrocitos fue comparada con PEAA a pH 5.5 usando el mismo diseño experimental como se describe arriba.

5 Los resultados son mostrados en la figura 1E. Los datos demuestran que el copolímero EA-AA era menos efectivo que PEAA a pH 5.5 al hidrolizar eritrocitos, logrando un 35% de lisis a concentración de 10 µg, comparado con un 55% de lisis para PEAA a una concentración de 10 µg.

10 La concentración dependiente de la lisis fue determinada. La figura 1F muestra el porcentaje de lisis de los copolímeros de AAc/PA: 50% AAc/50% PA, 40% AAc/60% PA; y 60% AAc/40% PA a pH 5.5. La figura 1G muestra el porcentaje de lisis de los copolímeros de AAc/BA: 50% AAc/50% BA; 75% AAc/25% BA; y 90% AAc/10% BA, a pH 5.5.

Los resultados muestran que los copolímeros aleatorios de ácido propil acrilato-acrílico son hemolíticos a pH 5.5, el copolímero más hemolítico es 50/50 copolímero, requiriendo 50 µg para causar el 54% de hemólisis de  $10^8$  RBCs. Los copolímeros de ácido propil acrilato-acrílico muestra la hemólisis sensible a pH, y el 50/50 de copolímero causa solo el 30% de la hemólisis de  $10^8$  RBCs a pH 7.4 y por el contrario a 54% a pH 5.5.

15 Los copolímeros de ácido butil acrilato-acrílico, son extremadamente agentes potenciadores hemolíticos. 10 µg de 50/50 copolímero causa más de 60% de la hemólisis de  $10^8$  RBCs a pH 5.5. Los copolímeros de ácido butil acrilato-acrílico son también sensibles al pH. 10 µg de 50/50 copolímero causa menos de 10% de hemólisis de  $10^8$  RBCs a pH 7.4.

20 Ambos tipos de copolímeros aleatorios de acrílico de ácido butil acrilato y acrílico de ácido propil acrilato muestran una actividad hemolítica sensible al pH son significativamente más eficaces al inducir la hemólisis a pH 5.5 que a pH 7.4. Además, la actividad hemolítica y la sensibilidad al pH de los copolímeros aleatorios pueden ser racionalmente ingenieradas por el cambio de la composición de comonomero.

#### **Ejemplo 2: Comparación de la sensibilidad de EA-LA con el conjugado de ácido poliacrílico EALA**

25 La capacidad de EALA para romper eritrocitos fue comparada con el conjugado de ácido poliacrílico EALA a pH 5.0 utilizando aproximadamente  $10^7$  glóbulos rojos en 100 mM de  $\text{NaPO}_4$  dibásico, incubado a 37°C durante 20 min. Una mezcla física de EALA y PAA fue también examinada.

Los resultados se muestran en la figura 2. El péptido EALA por sí mismo, como una mezcla física de EALA con PAA, demostró una cantidad insignificante en la cantidad de lisis si el conjugado cedió sobre el 70% de la lisis a una concentración de 100 µg.

#### **Ejemplo 7: Comparación de la sensibilidad de pH de PEAA con el conjugado Log/PEAA y el Log sólo.**

30 La capacidad de PEAA, y el conjugado Log/PEAA y el Log sólo para alterar eritrocitos fue comparada por el desarrollo de un ensayo de hemólisis a pH 5.0 utilizando  $10^8$  glóbulos rojos en 100 mM de fosfato dibásico sodico, e incubándose a 37°C durante 1 hora. El hidrocloreuro de 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) fue utilizada para conjugar PEAA y configurar la inmunoglobulina G (Log). El EDC reacciona con los grupos carboxílicos con el PEAA para formar una amina reactiva intermedia, que reacciona con los grupos amina lisina de Log. El Log fue oxidado usando 100 mM periodato sodico para ceder los grupos aldehídos reactivos al grupo carbohidratado. La conjugación se realizó via formación de base de Schiff entre el extremo del grupo amino de la amina-terminal PEAA y el grupo aldehído de Log. Este enlace es reducido usando 5M de cianoborohidrato sodico para ceder un enlace covalentemente al conjugado de PEAA y Log. La proporción molar de PEAA:lgG fue 2:1.

40 La capacidad del conjugado Log/PEAA para lisar eritrocitos fue comparada con el PEAA libre y con Log libre. Los resultados se muestran en la figura 3.

#### **Ejemplo 3: Comparación de la sensibilidad de pH del conjugado de estreptavidina/PEAA con el conjugado B-PEAA y con el conjugado estreptavidina/B-PEAA.**

Objetivo:

45 Para verificar que la complejación de PPAAc con las proteínas no afecta a su capacidad para romper las membranas de las células.

Protocolo:

Biotinilación de PPAAc: Complejación con estreptavidina via afinidad estreptavidina-biotina (proporción estequiometrica de PPAAc: estreptavidina en ambas 3:1 y 1:1)

50 Se realizó RBCs por centrifugación de la sangre completa durante 4 minutos. Se lavó tres veces con 100 mM con fosfato dibásico sodico a pH deseado. Se resuspendió y diluyó a  $10^8$  RBCs por 200 µl. Cada tubo contenía 800 µl

de buffer, 200:1 de suspensión RBC, el polímero de muestra. Cada muestra se hizo por triplicado, y se repitió para verificar su reproducibilidad. Los tubos se incubaron durante 1 hora y media a 37°C. Los tubos giraron durante 5 minutos a la velocidad completa en la microcentrifugadora. La lisis se determinó por la medida de la absorbancia del sobrenadante a 541 nm, reflejando la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante. El porcentaje de hemólisis calculado asumiendo el 100% de la lisis de los glóbulos rojos en sangre. Controles de RBCs en buffer sin polímero o buffer con estreptavidina añadida, también se llevó a cabo. Las capacidades de las 4 diferentes estreptavidinas y las muestras de PEAA para romper los eritrocitos fueron comparadas desarrollando el ensayo de hemólisis a pH 5.0 usando aproximadamente  $10^8$  glóbulos rojos en 100 mM de fosfato sodico dibasico, e incubándose a 37°C durante una hora. Las cuatro muestras fueron biotililadas PEAA ("B-PEAA"), amino-terminal PEAA, y una mezcla física de estreptavidina y amino-terminal PEAA, y un complejo de estreptavidina y PEAA biotililada. El complejo formó en esta última muestra un resultado de afinidad de biotina-estreptavidina. En ambas muestras que contenían una proteína y un polímero, la proporción molar de PEAA: esteptavina fue de 3:1 1(Figuras 4 A y 4C) o 1:1 (figuras 4B y 4D). Esta proporción se mantuvo constante para todas las concentraciones de PEAA.

Los resultados indican que cualquier modificación de PEAA (biotinización o asociación con una proteína) causa un incremento en el perfil de la hemólisis, en comparación a la disociación vista en la amina terminal PEAA sin modificar. Se observó que la diferencia no significativa en porcentaje de hemólisis era en función de pH (figuras 4C y 4D) o de la concentración entre cualquier complejo diferente de proteína-polímero. El porcentaje de hemólisis era dependiente del pH y de la concentración de polímero.

#### **Ejemplo 4: la Muerte celular aumenta cuando PPAA es mezclada con una toxina.**

La figura 5 es un esquema de la terapia de inmunotoxina utilizando un polímero-inducido sensible al pH de alteración de membrana. En el paso 1 el receptor es mediado por endocitosis; en el paso 2 es cuando el polímero-inmunotoxina es absorbida en el endosoma, el paso 3 es cuando el pH endosomal de 5-6 provoca la alteración de la membrana, y el paso 4 es cuando la inmunotoxina es liberada en el citoplasma, llevando así a la muerte celular.

##### Objetivo:

Determinar si la mezcla PPAAc con la cadena ricina A (RTA) incrementará su liberación endosomal y su toxicidad. El ensayo de endocitosis para cuantificar la inhibición de la síntesis de proteína en células tratadas con PPAAc y RTA comparadas con células tratadas solo con PPAAc, sol RTA, o células no tratadas.

##### Protocolo:

Las células Ramos fueron suspendidas en un medio libre de leucina a una concentración de 50.000 por pocillo en 100 microlitros. Las células fueron cultivadas durante 4 horas a 37°C, entonces leucina radioetiquetada (1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-leucina por 25 $\mu$ l del medio) fue añadido, y las células cultivadas durante 4 horas adicionales a 37°C. 25  $\mu$ l de muestra fue eliminado de cada pocillo, en cada muestra por triplicado. Los pocillos de control contenían 25 $\mu$ l del medio. Los pocillos estaban recolectados sobre un filtro de papel y la cantidad de radioactividad contada utilizando un contador de centelleo. El polímero-toxina fue añadida para tratar células con una proporción de PPAAc:RTA =3:1.

##### Resultados:

Como se muestra figura 6, las células no muertas fueron observadas cuando el RTA fue añadido por si misma al cultivo de la célula, presumiblemente debido a el trafico intracelular de la toxina de los lisosomas. Cuando PPAA era físicamente mezclada con el RTA, aumentado las concentraciones de mezcla (a una proporción fija de 3:1 PPAA:RTA) lideraban el número de muertes celulares. El polímero por si mismo no intoxica las células. Estos resultados demuestran que la mezcla de PPAAc y RTA causa la inhibición de la síntesis de proteína en concentraciones dependientes de manera que las concentraciones donde RTA está sola no es toxica. Estas observaciones indican que el polímero está actuando dentro de la célula para incrementar la acción de la toxina, presumiblemente por la alteración de membrana endosomal.

#### **Ejemplo 6: la Actividad Hemolítica de PEAA es incrementada cuando se combinó con ultrasonido Tone-Burst.**

En la pasada década, el tratamiento localizado de medicamento y la terapia génica in vivo para la enfermedad y el cáncer ha desarrollado una mayor área de búsqueda. Uno de los mayores obstáculos para esta técnica es la de proporcionar los medicamentos dentro de la célula una vez que han sido transportadas a la localización deseada dentro del cuerpo. Las células tienen una defensa efectiva contra los organismos extraños y los organismos que intentan invadir su medio intracelular. La sonoporación se ha observado como una posible solución a este problema. La electroporación y otras técnicas han sido usadas en el pasado para aumentar la permeabilidad de las membranas de las células, pero están limitadas a los estudios in Vitro. Utilizando un ultrasonido enfocado, la membrana de la célula puede ser permeable a macromoléculas in vivo de una manera similar a la electroporación. Esto permitiría a los medicamentos entrar en las células objetivo sin exponer el resto del tejido. La capacidad del ultrasonido y del agente polimérico sintético de alteración poli(ácido 2-etilacrilico)(PEAA) para alterar las membranas de las células a menudo utilizando eritrocitos humanos como un sistema modelo fue investigado. PEAA tiene la capacidad de crear poros y canales en la

membrana del plasma en concentraciones medianamente ácidas (Cheng et al., 1996). Sin embargo, este efecto es directamente proporcional al número de polímeros que interactúan con la membrana de la célula. En este presente estudio, se investiga la influencia del ultrasonido en el efecto de la hemólisis de PEAA bajo concentraciones activas como función del tiempo de incubación (experimento A), pH y el orden de exposición de eritrocitos de PEAA y ultrasonido (experimento B).

#### Métodos

##### Muestra de sangre:

Sangre humana fue obtenida para cada experimento. Las células fueron lavadas 3 veces con 150 mM de solución de NaCl. Las células fueron diluidas con una solución buffer de fosfato para dar una concentración final de  $2 \times 10^8$  células/ml. El pH de la solución es 6.1 que es requerido para la actividad de PEAA, o 7.4 que inactiva PEAA, dependiendo de la elección del experimento. En cada caso, un total de 1 mL de la suspensión celular fue pipeteado en los tubos de muestras construidos tubo termorretráctil (Polímeros Avanzados, Inc., Salem NH) y emplazados en el foco del transductor de potencia.

##### Montaje Acústico:

Todos los tratamientos de ultrasonido fueron llevados a cabo en un tanque acrílico de 16.5 cm x 12.5 cm x 12.5 cm conteniendo un buffer desgasificado salino fosfatado (PBS). La temperatura del tanque se mantuvo a 37°C usando un sistema de calefacción. El tanque está diseñado para contener un tubo de muestra en el foco del transductor todo el tiempo. Un diámetro de 70 mm orientó a la fuente del transductor con una anchura focal de 15 mm y una longitud de foco de aproximadamente 12mm (Sonic Concepts, Woodinville, WA) está fijada en una pared del tanque. El balance de la fuerza de radiación fue utilizada para calibrar el transductor de potencia. Un transductor de elemento simple a 1.1 MHz transmite a 10 ms tone burst (PRF=1Hz) con una intensidad SATA de 2200 W/cm<sup>2</sup>. Una silicona absorbidora está localizada en el extremo final del tanque para reducir las reflexiones. Una técnica de detección pasiva de cavitación (Atchley et al, 1988) es usada para monitorizar las señales acústicas para la formación de la burbuja. Un hidrofono enfocado a 5 MHz es posicionado a 90° en haz del transductor focalizado. El hidrofono está montado en la pared del tanque confocalmente con la fuente del transductor. Todas las señales acústicas recibidas por el hidrofono son dispuestas en el osciloscopio LeCroy 9304AM. (Se vió en todos los estudios que un aumento de los episodios de cavitación cuando el ultrasonido fue aplicado en presencia del polímero correlacionaba bien con el aumento en los niveles de hemólisis). El tanque es limpiado y rellenado con buffer salino fosfatado desgasificado (pH = 7.4) a 37°C y los tubos de muestra son emplazados en el foco de la fuente del transductor.

Cada muestra de glóbulos rojos diluida fue expuesta a 150 pulsos a 10 ms de forma de onda de ultrasonido de 1.1 Mhz con un ciclo de trabajo de 1% a una intensidad de 2200 W/cm<sup>2</sup>. El número bajo de células reducidas por el umbral de cavitación, aumenta el potencial de las interacciones células/burbuja, y el bajo ciclo de trabajo redujo los efectos de temperatura.

##### Objetivo A:

La actividad de la PEAA solo es dependiente del pH de la solución y del periodo de tiempo de incubación. El polímero cambia su conformación a un estado activo a pH 6.1 y es incubado con una suspensión celular a 37°C durante una hora para lograr la máxima lisis de la célula. 10 microgramos de PEAA fueron añadidos a 1 ml de suspensión celular e incubados antes de la exposición al ultrasonido. Para examinar la sinergia ultrasonido/polímero de la muestra, fue tratada a t = 0, 20, 40 o 60 minutos después de la inyección de PEAA. Después del tratamiento de ultrasonido, un grupo de células fueron inmediatamente llevadas a una microcentrifugadora (Eppendorf 5410, Westbury, NY) a 14.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante es eliminado y el contenido de hemoglobina es medido por espectrofotometría a 541 nm. El otro grupo de células fueron devueltas al baño de agua para incubarse durante el resto de la hora, después de lo cual estas suspensiones fueron centrifugadas, etc, como arriba. En ambos casos los resultados son normalizadas contra 100% de la hemólisis lograda por mezcla de la sangre de muestra con la destilada, agua diionizada.

##### Resultados A:

En las pruebas preeliminarias de los efectos del ultrasonido y PEAA solo en los eritrocitos humanos, se determinó que para 150 tone bursts, exponiendo las células a menos de 3000 W/cm<sup>2</sup> o menos de 50 micrograms de PEAA, produjeron unos insignificantes niveles de hemólisis. La figura 7 A, muestra los niveles óptimos de hemólisis cuando el polímero permitido es incubado con eritrocitos por al menos 20 minutos antes del tratamiento de ultrasonido, y bien se devuelve al baño o se centrifuga inmediatamente. Había una pequeña diferencia en el porcentaje de hemólisis en este conjunto de experimentos (figura 7 A).

##### Objetivo B:

El objetivo de este experimento era comprobar los efectos de pH y ordenar la exposición de los eritrocitos al PEAA durante una hora y con ultrasonido. Para este experimento, el pH de la suspensión celular estaba entre 6.1 o 7.4. Para el caso de pH=6.1, en un experimento el ultrasonido fue aplicado antes de la introducción de PEAA. En otro

experimento, el ultrasonido fue aplicado después de la introducción de PEAA. Para el caso de pH=7.4, el ultrasonido fue aplicado después de la introducción de PEAA.

Resultados B:

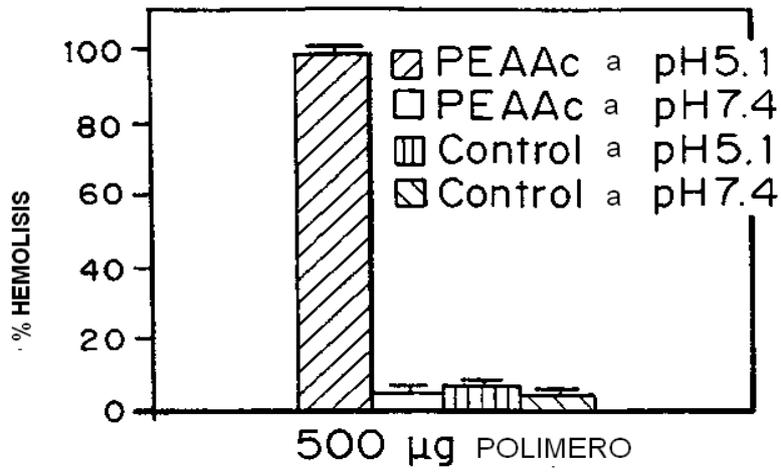
5 El pH de la suspensión celular y la presencia de PEAA durante el tratamiento de ultrasonido, eran definitivamente importante para la producción del aumento del efecto de PEAA. La conformación de la estructura del polímero depende del pH del solvente en el que el PEAA es disuelto. El tratamiento de las células a pH=7.4 o la aplicación del ultrasonido antes de la mezcla de la suspensión con PEAA y la incubación durante una hora a pH=6.1, produjo una pequeña hemólisis (figura 7B), mientras que a pH=6.1, el ultrasonido aplicado a los eritrocitos en presencia de PEAA, produjeron profundos niveles de hemólisis. Así que la presencia de PEAA durante el tratamiento por ultrasonido es la clave en este ejemplo.

10

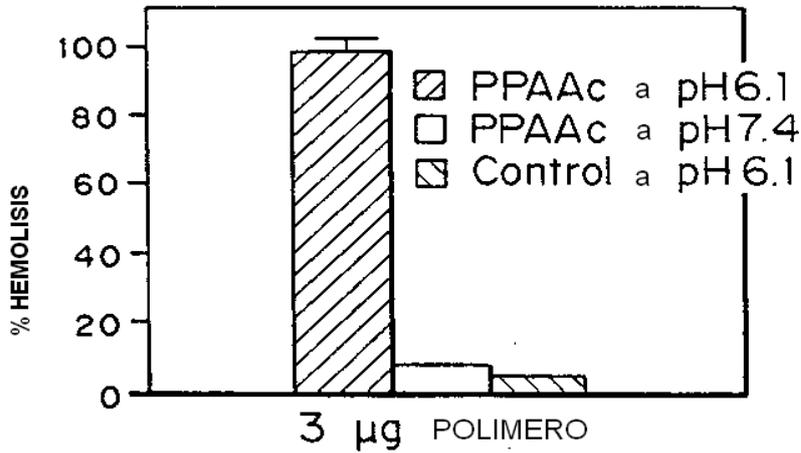
## REIVINDICACIONES

1. Una composición para mejorar el transporte a través de las membranas que contienen lípidos, consta de:
  - (a) un agente terapéutico o de diagnóstico; y
  - (b) un agente que mejora el transporte por la barrera de la membrana, donde el agente de transporte es sensible al pH y es hidrofóbico a valores de pH entre 5.1 y 5.5 y el agente que mejora el transporte comprende un polímero que tiene múltiples grupos carboxílicos seleccionados del grupo consistente en:
    - (i) un polímero poli (ácido etilacrilico) covalentemente unido al agente terapéutico o de diagnóstico;
    - (ii) un polímero poli (ácido propilacrilico);
    - (iii) un polímero poli (ácido butilacrilico); o
    - (iv) un copolímero de injerto aleatorio o copolímero bloque, donde el copolímero se compone de grupos de ácidos acrílicos y grupos de ácidos acrílicos alquilsustituídos.
2. La composición de la reivindicación 1, donde el agente que mejora el transporte de barrera de membrana no es hidrofóbico en el rango de pH entre 6.8 y 7.5.
3. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de transporte está acoplado con un ligando que se une a la superficie de una célula.
4. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico es un agente citotóxico.
5. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o el agente de diagnóstico es seleccionado de los grupos consistentes en un nucleósido, un nucleótido, y un oligonucleótido.
6. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o de diagnóstico es seleccionado del grupo consistente en una proteína, una toxina a base de glicoproteína, y un péptido.
7. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o de diagnóstico es seleccionado del grupo consistente en un azúcar o un polisacárido.
8. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico es una toxina seleccionada del grupo consistente en ricina, cadena B de la toxina de difteria, péptido adenovirus, péptido de virus influenza, péptido GALA, abrina, modeccina, exotoxina de Pseudomonas, briodina, lectina de muérdago, toxina Shiga, toxina Escherichia coli lábil, toxina Pertussis, toxina de cólera, toxina de ántrax, viscumina, saponina, gelonina, momordina, tricosantin y proteína antiviral Phytolacca.
9. La composición de la reivindicación 8, donde el agente terapéutico es ricina.
10. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de transporte es un polímero poli (ácido propilacrilico).
11. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o de diagnóstico es un agente radioetiquetado.
12. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de diagnóstico es un agente fluorescentemente etiquetado.
13. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de diagnóstico es un agente enzimáticamente etiquetado.
14. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de diagnóstico es un agente de contraste.
15. La composición de la reivindicación 1, donde el polímero es un polímero de injerto o polímero bloque, donde el copolímero se compone de grupos de ácidos acrílicos y grupos ácidos acrílicos alquil sustituidos.
16. La composición de la reivindicación 1, donde el polímero es un copolímero aleatorio que contiene grupos de ácidos acrílicos y grupos de ácidos acrílicos alquilsustituídos.
17. La composición de la reivindicación 15 o 16, donde el polímero comprende grupos etil acrilatos, grupos propil acrilatos o grupos butil acrilatos.
18. La composición de la reivindicación 15 o 16, donde el polímero consta de grupos ácidos acrílicos, grupos ácidos etilacrilicos, grupos ácidos propilacrilicos y grupos ácidos butilacrilicos.

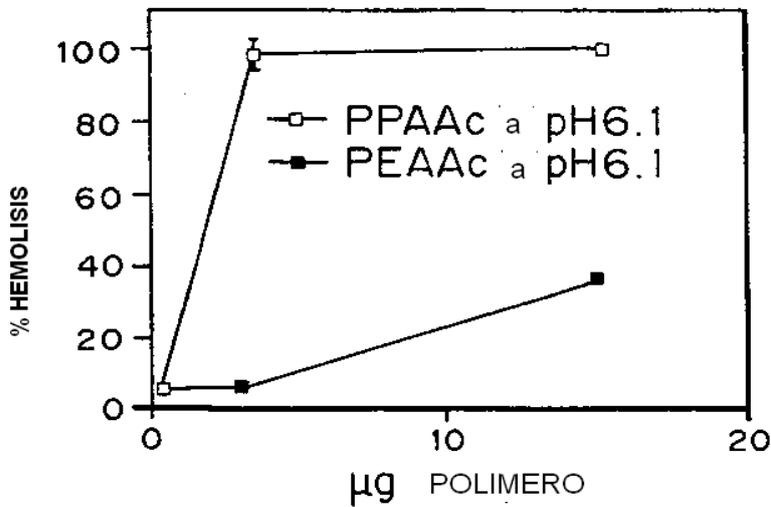
19. La composición de la reivindicación 1, donde el agente de transporte contiene además un péptido, que es hidrofóbico en un rango de pH de 5.1 y 5.5.
20. La composición de la reivindicación 19, donde el péptido es seleccionado del grupo consistente en EALA, melitina, y un péptido que contiene una estructura repetitiva ácido glutámico -alanina-leucina- alanina.
- 5 21. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o el agente de diagnóstico está covalentemente acoplado al agente de transporte.
22. La composición de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico o el agente de diagnóstico está acoplado iónicamente al agente de transporte.
- 10 23. El uso de la composición de cualquiera de las anteriores reivindicaciones en la fabricación de un medicamento para mejorar el transporte del agente terapéutico a través de membranas que contienen lípidos.
24. El uso de la composición de la reivindicación 23, donde la composición es para administrarse a células en una suspensión.
25. El uso de la composición de la reivindicación 23, donde la composición es para administrarse a capas de células para mejorar el transporte a través de las capas celulares.
- 15 26. El uso de la composición de la reivindicación 23, donde la composición es para administrarse a membranas de los lípidos para mejorar el transporte hacia dentro y fuera de las membranas lipídicas.
27. El uso de la composición 23, donde la composición es para administrarse con un estímulo para mejorar adicionalmente el transporte del agente terapéutico o de diagnóstico a través de la membrana que contiene lípidos.
- 20 28. El uso de la reivindicación 27, donde el estímulo es seleccionado del grupo consistente en ultrasonido, campos eléctricos, radiación y combinaciones de las mismas.
29. El uso de la reivindicación 28, donde el estímulo es ultrasonido.
30. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para mejorar el transporte del agente terapéutico a través de membranas que tienen lípidos.
- 25 31. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para uso en medicina.



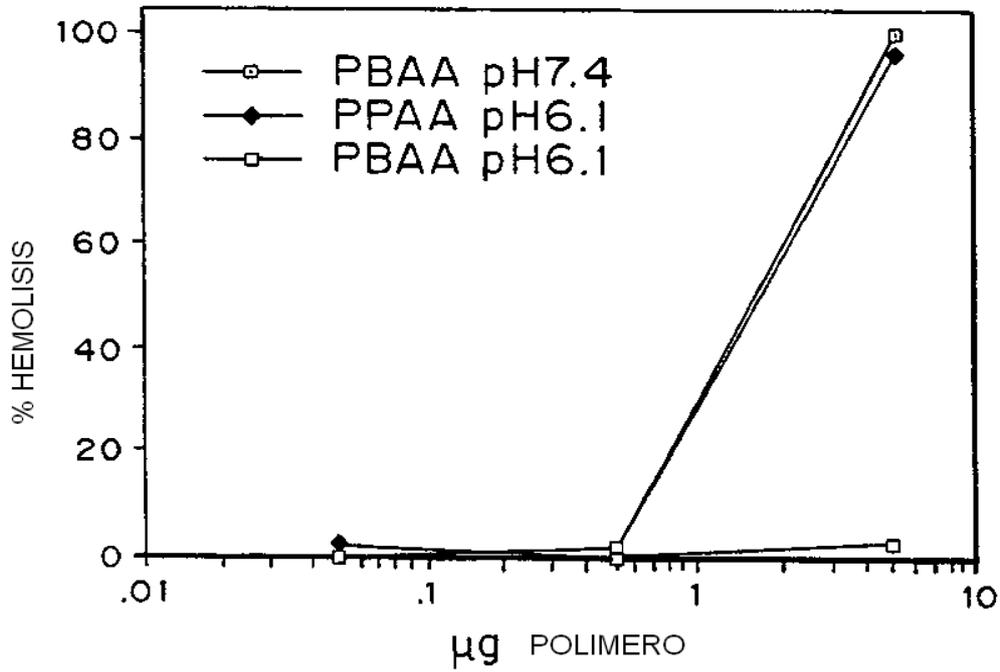
**FIG. 1A**



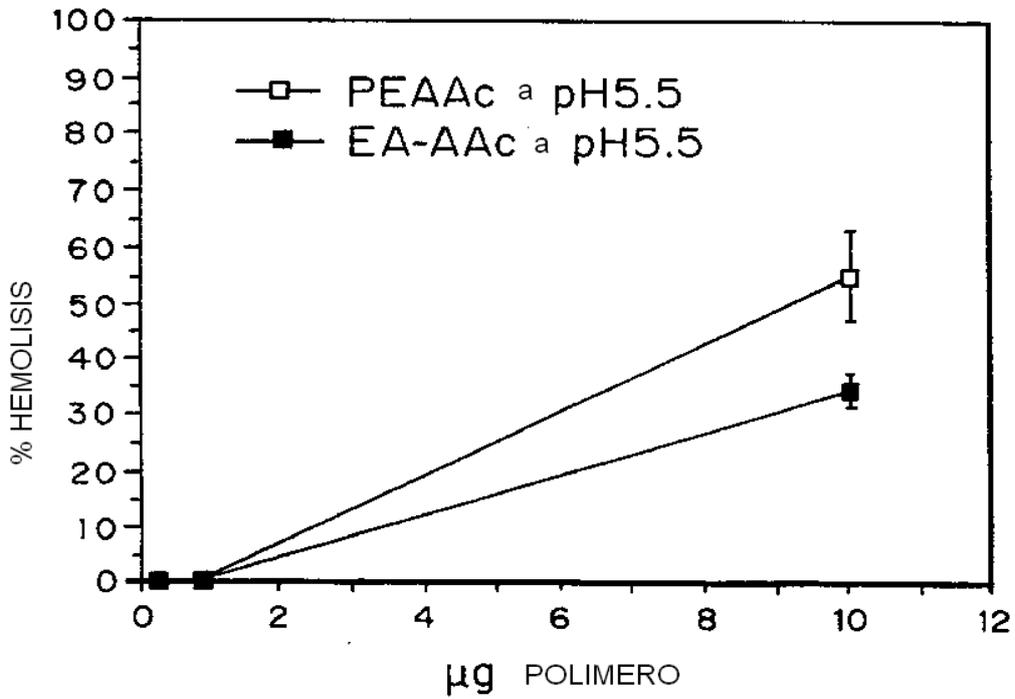
**FIG. 1B**



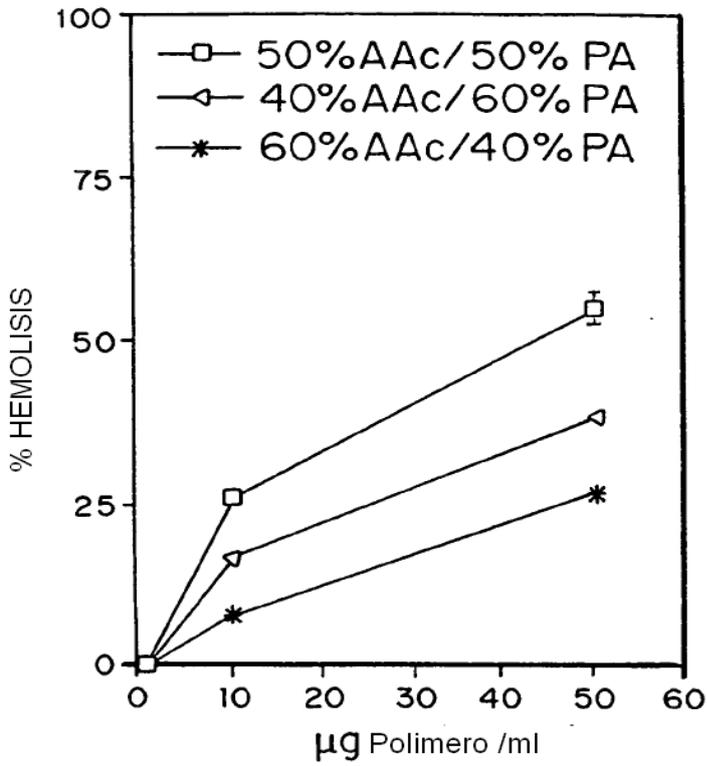
**FIG. 1C**



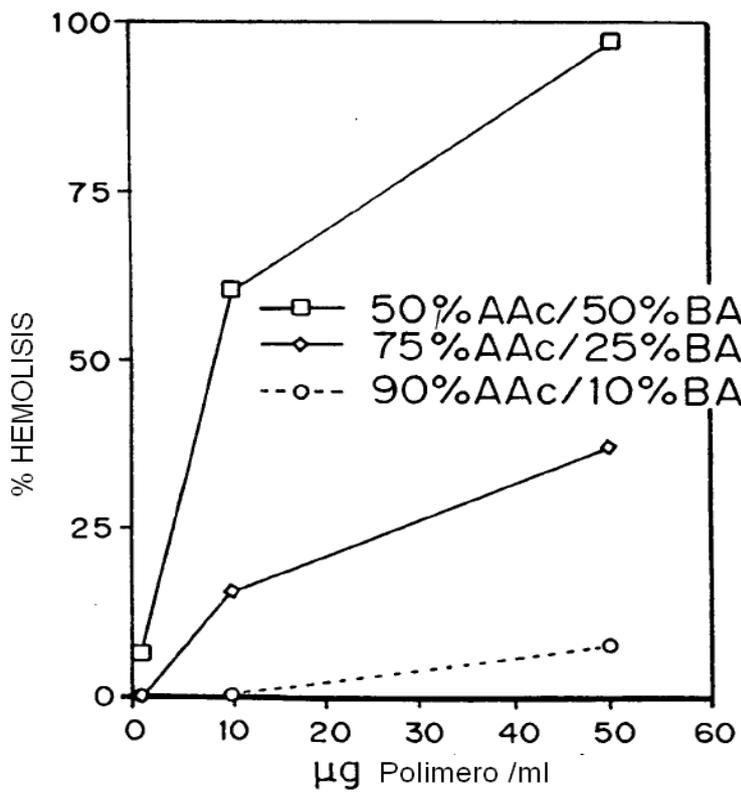
**FIG. 1D**



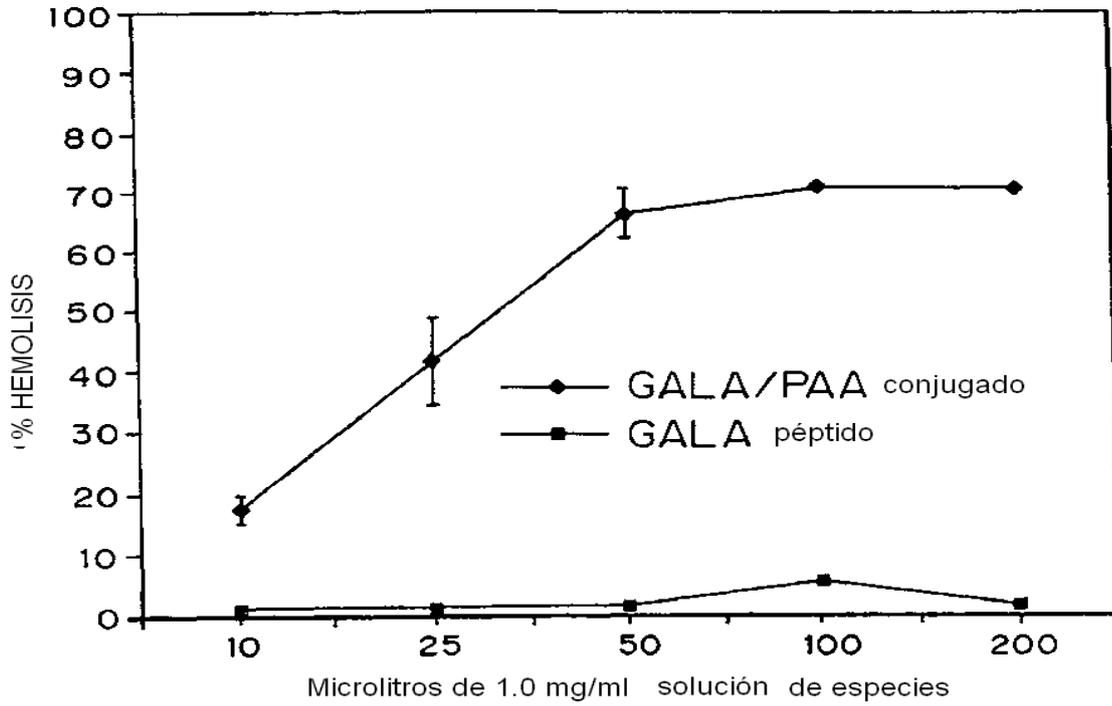
**FIG. 1E**



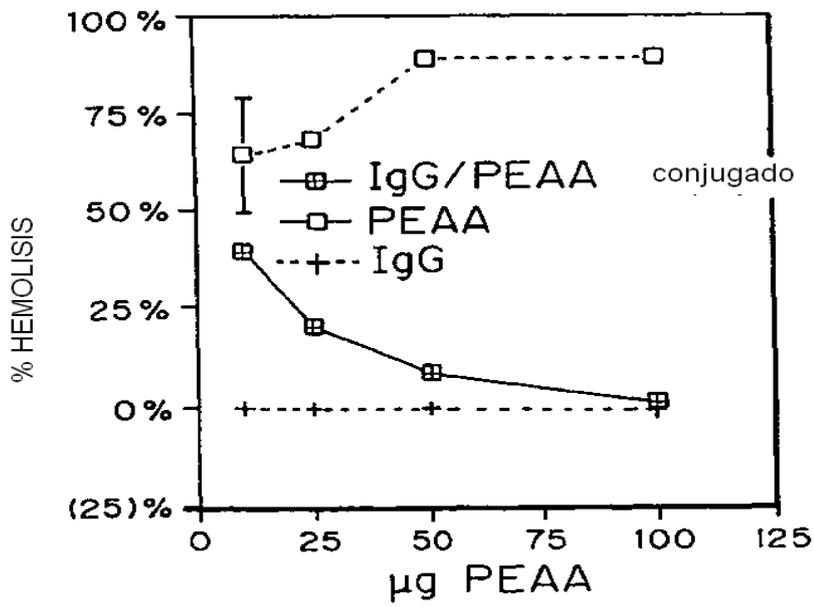
**FIG. 1F**



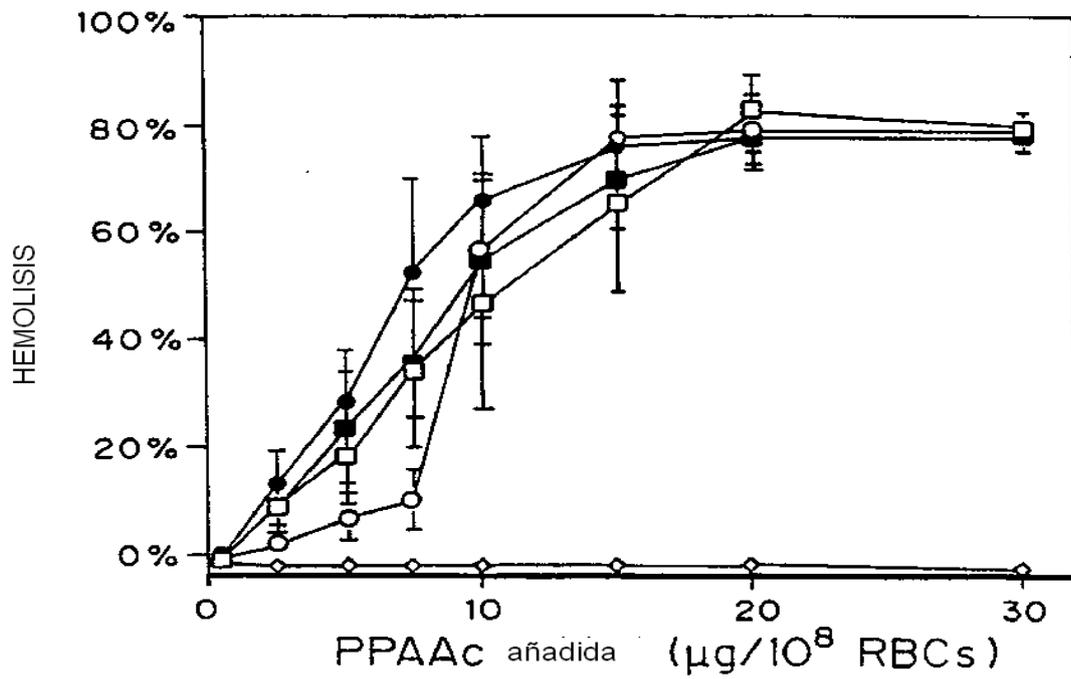
**FIG. 1G**



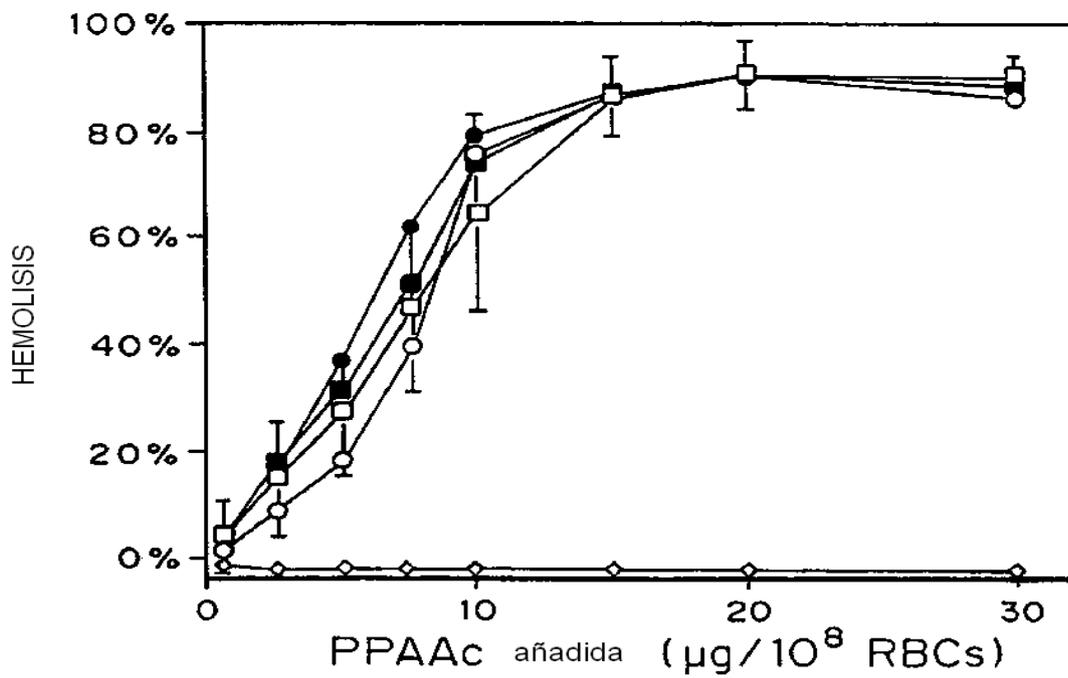
**FIG. 2**



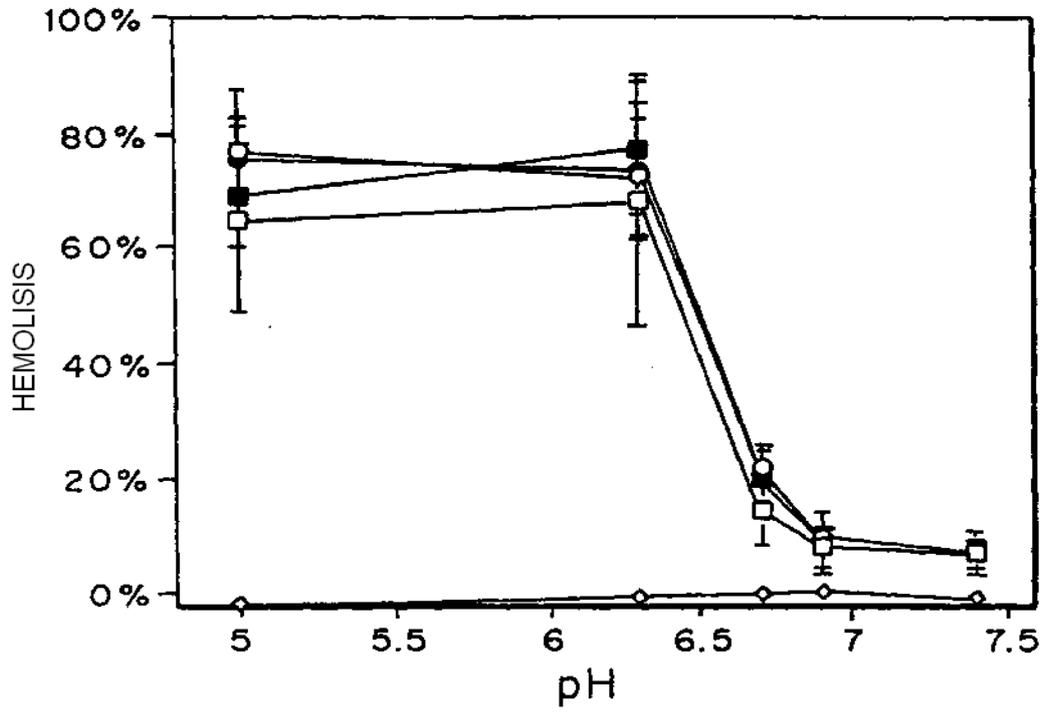
**FIG. 3**



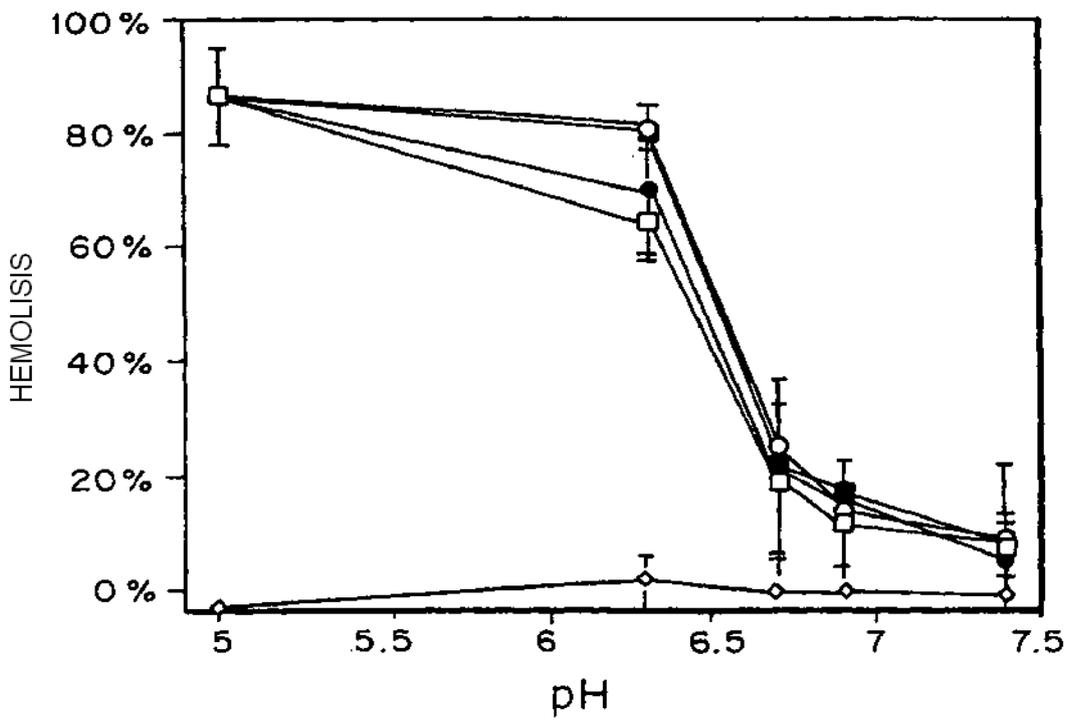
**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 4C**



**FIG. 4D**

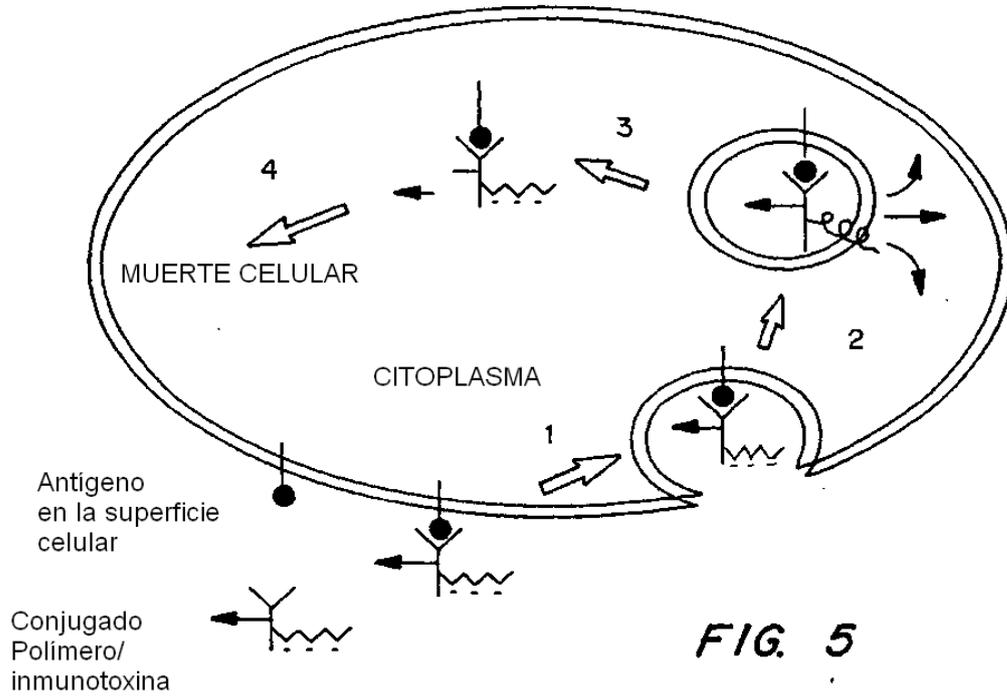


FIG. 5

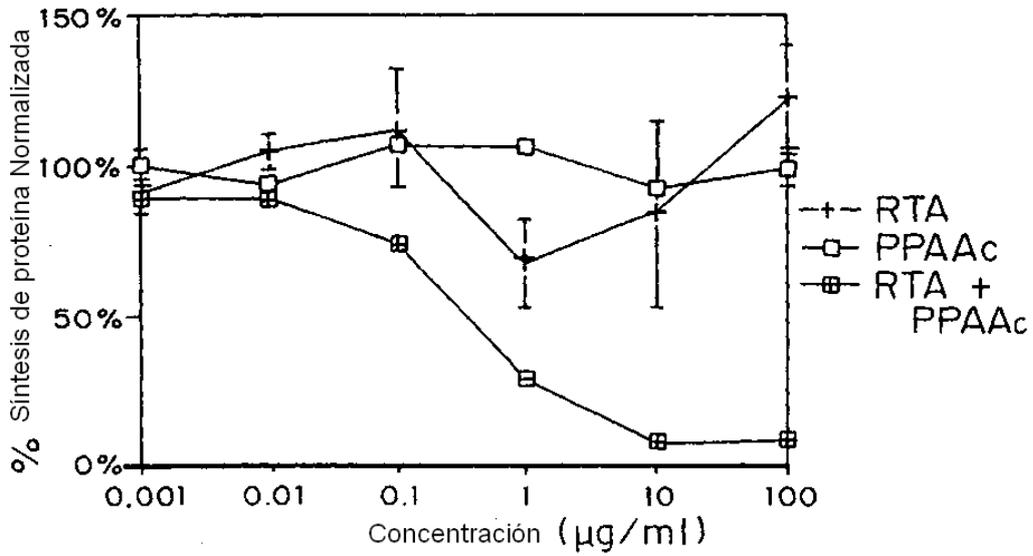
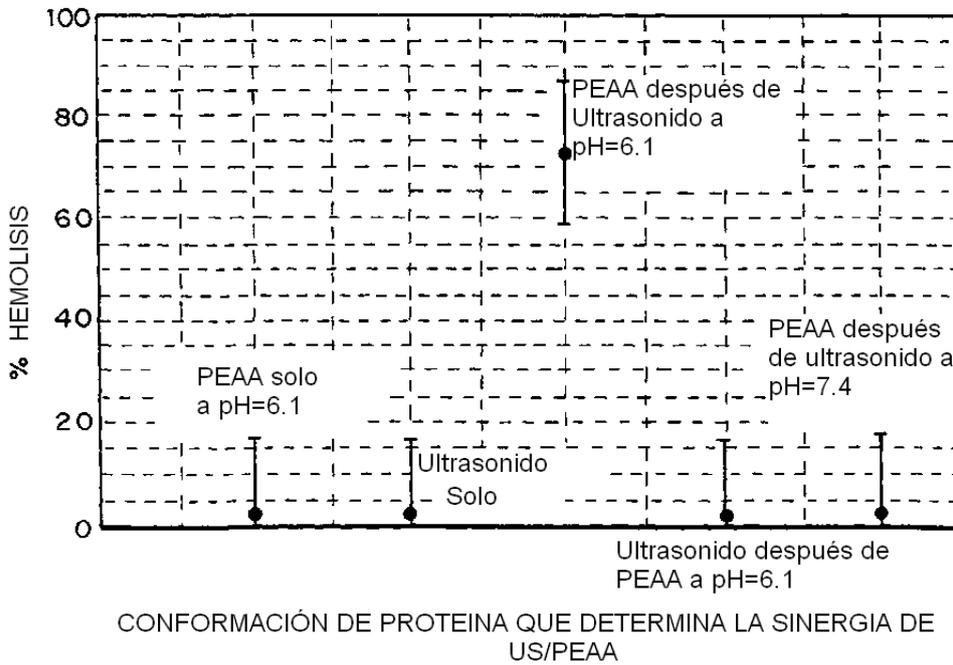
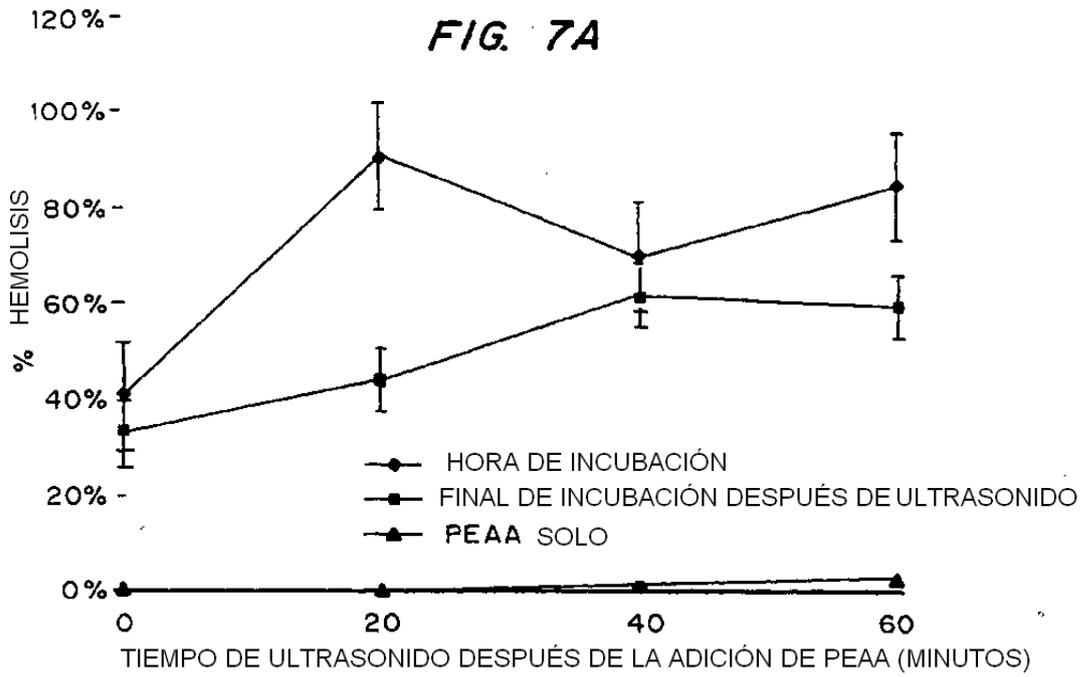


FIG. 6



**FIG. 7B**