



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 317**

51 Int. Cl.:
C08L 51/06 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04707130 .3**
96 Fecha de presentación : **30.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1587869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Polímeros activos sobre membranas.**

30 Prioridad: **31.01.2003 US 443906 P**
27.01.2004 US 765668

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2011

73 Titular/es: **MIRUS BIO CORPORATION**
505 S. Rosa Rd
Madison, Wisconsin 53719, US

72 Inventor/es: **Rozema, David y**
Wakefield, Darren

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 317 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

Polímeros activos sobre membranas

REFERENCIA CRUZADA PARA SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud está relacionada con la solicitud anterior provisional de documento de patente de Estados Unidos Nº de serie 60-443906 presentada el 31 de enero de 2003.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La vía de penetración celular para la mayor parte de los fármacos convencionales es la difusión a través de las membranas biológicas. Por esta razón, los fármacos tienden a ser moléculas pequeñas ($P_m < 500$) y anfipáticas, que contienen tanto funcionalidades hidrófobas como hidrófilas. Estas características engendran moléculas con solubilidad acuosa, al tiempo que les permiten cruzar la bicapa lipídica no polar de la membrana celular. Por el contrario, los fármacos utilizados en las terapias antisentido y génicas son polímeros hidrófilos relativamente grandes y con frecuencia también ácidos nucleicos cargados muy negativamente. Ambas de estas características físicas obstaculizan su difusión directa a través de la membrana celular. Por esta razón, la principal barrera para la terapia génica y terapia antisentido es el transporte del fármaco al interior celular. Esta situación contrasta con el desarrollo de medicamentos estándar en el que la identificación del fármaco es la principal barrera en el desarrollo.

15 La ruta de entrada para la mayoría de las macromoléculas como el ADN y oligonucleótidos en células es la endocitosis. Una vez absorbidas por la célula, el endosoma es o bien reciclado de vuelta a la superficie celular, o madura a un endosoma final y finalmente a un lisosoma. En este proceso, el pH gradualmente disminuye de 7 a 6 a medida que el endosoma inicial se convierte en endosoma final. En el endosoma final, el pH disminuye de 6 a menos de 5 a medida que madura en un lisosoma. En el endosoma final y lisosoma, enzimas tales como proteasas, nucleasas y glicosilasas digieren los componentes hidrolizables en el compartimento. Para evitar la degradación de los ácidos nucleicos y otros fármacos potenciales en el lisosoma, debe romperse el endosoma, y su contenido liberado, antes de su evolución a un lisosoma. Una vez que se produce la endocitosis, el endosoma se convierte en un endosoma final en el curso de unos 10 minutos [Mukherjee et al. 1997]. El endosoma final contiene enzimas hidrolíticas tales como proteasas [Berg et al. 1995] y otras enzimas hidrolíticas. Enzimas digestivas adicionales aparecen a medida que el endosoma se transforma en un lisosoma.

20 Para que los materiales escapen de los endosomas al citoplasma, la membrana del endosoma debe romperse. La ruptura del endosoma puede ocurrir por presión osmótica que causa que la membrana se hinche y explote [Zuber et al. 2001], por agentes perturbadores de la membrana que desnaturalizan la estructura de dos capas de la membrana, o una combinación de estas fuerzas. Métodos para lograr la liberación del endosoma a menudo se basan en el entorno del lisosoma y/o endosoma para desencadenar la ruptura de la membrana y liberar su contenido. Por ejemplo, los vectores pueden ser sustratos de enzimas lisosomales tales como las proteasas. La proteólisis puede dar como resultado una activación de un compuesto activo sobre la membrana que a continuación desestabiliza las dos capas. Un ejemplo de rotura de membrana desencadenada por enzimas son las proteínas de la cubierta de los adenovirus que modifican su estructura y su capacidad disruptiva de la membrana con la ruptura proteolítica [Skehel et al. 2000].

30 La disminución en el pH a medida que un endosoma madura a un lisosoma puede también utilizarse para desencadenar la disrupción de la membrana y la liberación de su contenido. Las infecciones virales a menudo requieren la acidificación del compartimento endosomal [Carrasco 1994]. Para imitar esta actividad viral sintéticamente, se han diseñado muchos agentes de transfección no víricos con componentes dependientes de pH. Agentes que son débilmente básicos, pK_a 5-7, pueden ser protonados de forma reversible en el entorno ácido del endosoma. Algunos ejemplos son la cloroquina, polietilenimina y poli-L-lisina histidilada. El efecto de estos compuestos tampón es aumentar el número de protones necesarios para una disminución en el pH. Se postula que el aumento del número de protones, y como consecuencia sus contraiones, produce un aumento en la presión osmótica del endosoma, que lleva a la ruptura de la membrana, el efecto de esponja de protones [Zuber et al. 2001].

35 Otro mecanismo para la disrupción de la membrana dependiente del pH es el uso de agentes cuya interacción con una membrana depende de su protonación, por ejemplo, el hemisuccinato de colesterol [Lai et al. 1985], péptidos de la cubierta vírica y sus derivados [Plank et al. 1998] y ácido polipropilacrílico (PPA) [Cheung et al. 2001]. Una característica común de estos agentes es que son moléculas que contienen ácidos carboxílicos y grupos hidrófobos que están menos cargados a medida que baja el pH. La disminución en la carga hace que las moléculas sean más hidrófobas, y por lo tanto más disruptivas de las membranas.

40 El polímero sintético más estudiado que contiene carboxilatos para la disrupción del endosoma es el PPA [Lackey et al. 2002]. El grupo de propilo en cada monómero de grupos de PPA constituyen los grupos hidrófobos del polímero. Otro polímero sintético que contiene carboxilatos es el ácido polietilacrílico (PEA). PEA también es activo en la membrana de manera dependiente del pH. Sin embargo, dependiendo del peso molecular del polímero, se produce el inicio de la actividad de membrana para PEA muy por debajo del pH de 6. Mediante el aumento de la longitud del grupo hidrófobo de PEA por un carbono, para producir PPA, la dependencia del pH del polímero cambia a

condiciones menos ácidas tal que la iniciación de la actividad de la membrana se produce al pH fisiológicamente más pertinente de 6,5. Además de los ácidos poliacrílicos, polímeros de ácidos poliaminos que contengan residuos de aspartato o glutamato también exhiben carga negativa sensible al pH. Muchos polímeros naturales sensibles al pH dependen de estos residuos aniónicos para su dependencia del pH

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

En una realización preferida, describimos una clase de polímeros aniónicos basados en el anhídrido maleico capaces de romper las membranas celulares. Los polímeros pueden ser homopolímeros, copolímeros aleatorios o copolímeros alternos. Se incorporan grupos hidrófobos en los polímeros por medio de la copolimerización con monómeros hidrófobos o haciendo reaccionar grupos hidrófobos con anhídridos en el polímero.

- 10 En una realización preferida los polímeros descritos pueden utilizarse para transportar compuestos biológicamente activos a las células *in vivo* o *in vitro*. Los polímeros facilitan la liberación de compuestos biológicamente activos desde vesículas en el citoplasma después de la coendocitosis del polímero y el compuesto. En una realización, el compuesto biológicamente activo y el polímero se asocian con la célula de manera que en ambas moléculas se produce endocitosis por la célula. En otra realización el compuesto biológicamente activo y el polímero se asocian entre sí a través de una interacción no covalente para formar un complejo. El complejo es, a continuación, asociado a la célula. En otra realización, el compuesto biológicamente activo se une de forma covalente al polímero. La molécula de polímero-compuesto es, a continuación, asociada a la célula.

En una realización preferida, la funcionalidad del polímero puede ser modificada o mejorada por la unión covalente de grupos funcionales. Pueden agregarse grupos funcionales al polímero por medio de la copolimerización o por medio de la reacción con un anhídrido en el polímero.

Más objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada cuando se tome junto con los dibujos que la acompañan.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

25 FIG. 1 Ilustración de la formación de polianiones basada en la polimerización de anhídrido maleico: homopolímeros, copolímeros aleatorios, y copolímeros alternos. Los grupos carboxilo se muestran en forma protonada.

FIG. 2 Ilustración de polímeros sintetizados por polimerización del polímero de butil vinil éter - anhídrido maleico (BVEMA) con alcoholes y aminas para formar ésteres y amidas. Los grupos carboxilo se muestran en forma protonada.

FIG. 3. Ilustración gráfica del potencial hemolítico de los polímeros BVEMA, M-BVEMA y P-BVEMA.

30 DESCRIPCION DETALLADA

Se describe una nueva clase de polímeros aniónicos que se pueden utilizar para transportar compuestos biológicamente activos a las células. Estos polímeros contienen monómeros de anhídrido maleico y facilitan la liberación de compuestos biológicamente activos desde las vesículas después de la endocitosis. En la FIG 1 se muestran polianiones sintéticos basados en la polimerización del anhídrido maleico. El anhídrido maleico polimerizado por iniciación por radicales puede polimerizarse consigo mismo para formar un homopolímero, para formar homopolímeros de anhídrido maleico, o puede polimerizarse con comonómeros tales como el estireno o los éteres de vinilo para formar los copolímeros de anhídrido maleico. El estireno mismo se polimeriza por un mecanismo basado en radicales; por lo tanto, los copolímeros de estireno y anhídrido maleico (copolímeros basados en estireno - anhídrido maleico) son aleatorios, es decir, la composición total del polímero depende de la proporción de los monómeros, pero el orden de los monómeros es aleatorio. Por el contrario, los monómeros de éter de vinilo no se polimerizan por polimerización de radicales a menos que reaccionen con anhídrido maleico; por lo tanto, los polímeros compuestos de anhídrido maleico y éteres de vinilo (copolímeros basados en éter de vinilo -anhídrido maleico), son alternantes, es decir, el monómero de éter de vinilo va seguido del monómero de anhídrido maleico seguido del éter de vinilo y así sucesivamente. Los polímeros resultantes contienen grupos anhídrido. Estos grupos anhídrido, a continuación, pueden ser hidrolizados para formar grupos diácido. Alternativamente, puede hacerse reaccionar los polímeros con alcoholes y/o aminas para formar ácidos y ésteres y/o amidas. Los polímeros resultantes contienen de 1-2 grupos carboxilato por cada anhídrido maleico. Los polímeros son por lo tanto, polianiones.

Pueden incorporarse grupos hidrófobos en polianiones derivados del anhídrido maleico por copolimerización con estireno o éter de vinilo (FIG. 1 y 2), y/o haciendo reaccionar el polianhidrido con cualquier molécula (incluyendo, pero sin limitarse a, alcoholes y aminas) capaz de reaccionar con un anhídrido para formar un enlace covalente de manera que al menos permanezca un carboxilo en el monómero de anhídrido. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que la molécula puede formar un enlace covalente con cualquier carbonilo del anhídrido (FIG. 2). La reacción de alcoholes hidrófobos y/o aminas hidrófobas con grupos de anhídrido en el polianhidrido ocasiona la formación de ésteres hidrófobos y/o amidas hidrófobas de ácido polimaléico. Los polianiones resultantes puede adquirir hidrofobicidad por los grupos alquilo en el éter de vinilo, el grupo fenilo del estireno o por moléculas

que se han hecho reaccionar con el anhídrido. Los éteres de vinilo pueden seleccionarse del grupo integrado por: alquil vinil éter, éteres de arilo vinilo y similares.

Otras moléculas capaces de reaccionar con un anhídrido también pueden ser vinculadas covalentemente al polímero. Moléculas que pueden asociarse al polímero pueden seleccionarse de la lista que comprende: compuestos biológicamente activos, grupos de señal con las células como dianas, modificadores de interacción, estabilizadores estéricos, moléculas reportero y otros grupos diseñados para agregar funciones al polímero o aumentar la utilidad del polímero.

Se ha estudiado el copolímero de estireno y anhídrido maleico (SMA) como un agente de transporte de fármacos [Maeda et al. 2001]. Diversos derivados de SMA han sido sintetizados en los que diversos grupos alquilo se han incorporado al polímero por reacción con el anhídrido. En concreto, se ha sintetizado un polímero de transporte de fármacos por medio de la reacción de los anhídridos de SMA con alcohol butílico a fin de producir un polímero que contiene tanto grupos butilo como fenilo seguido de la conjugación al fármaco anticancerígeno neocarzinostatina (NC). El polímero-fármaco conjugado resultante, SMANC, ha sido aprobado para los tratamientos de cáncer en Japón. SMANC y otros polianiones macromoleculares conjugados a fármacos se han utilizado para dirigir fármacos a los tumores por medio de un fenómeno de los tumores sólidos denominado permeabilidad y retención mejoradas (EPR). El efecto EPR es una función de la hipervascularización y la arquitectura vascular defectuosa asociados con los tumores sólidos. Esta vasculatura inusual da como resultado mayor permeabilidad de los vasos del tumor y mayor retención de las moléculas grandes. El efecto EPR facilita la extravasación de fármacos poliméricos más selectivamente a los tejidos del tumor y es un mecanismo ampliamente invocado para la selección de una variedad de polímeros a los tumores.

Se describen polímeros que contienen anhídrido maleico para transportar compuestos biológicamente activos al citoplasma de las células por medio de la endocitosis, no sólo como vehículos para el transporte basado en EPR de fármacos a la superficie de la célula. Estos polímeros son capaces de romper las membranas intracelulares después de la endocitosis. Nosotros hemos investigado copolímeros alternos de diversos vinil alquil éteres y anhídrido maleico. Los grupos de anhídrido de estos polímeros pueden ser hidrolizados para forma diácidos o pueden hacerse reaccionar con otras moléculas, tales como alcoholes y/o aminas para producir ésteres y/o amidas. Estos polímeros son sintetizados fácilmente a partir de los monómeros comercializados: alquil vinil éteres y anhídrido maleico. Por el contrario el polímero PPA se sintetiza a partir de un monómero que es el producto de una síntesis de 4 etapas [Borszky et al. 1997]. Los copolímeros de anhídrido maleico - éter de vinilo resultantes contienen grupos anhídrido que pueden hacerse reaccionar con cualquier nucleófilo para producir fácilmente una variedad de nuevos polímeros.

Los polímeros que contienen anhídrido maleico pueden ser evaluados en cuanto a su potencial para endosomolisis por el ensayo de la lisis de glóbulos rojos de la sangre en función del pH. Por ejemplo, se polimerizaron etil, propil y butil vinil éter con anhídrido maleico y se hidrolizaron para formar los monómeros de diácido. Los polianiones obtenidos se probaron en cuanto a la lisis dependiente del pH. El polímero basado en butil vinil éter fue el único capaz de lisar la membrana de los glóbulos rojos. Por el contrario, los polímeros de ácido acrílico que contienen grupos de propilo son eficaces en la lisis.

También se describen los polímeros formados por reacción del polímero de butil vinil éter - anhídrido maleico (BVEMA) con alcoholes y aminas para formar ésteres y amidas (FIG. 2). El éster metílico de BVEMA (M-BVEMA) y la amida propílica de BVEMA (P-BVEMA) fueron sintetizados y probados en cuanto a su actividad hemolítica. La incorporación de ambos grupos alquilo aumentó la actividad de lisis de estos polímeros y aumentó el pH al que se produjo la actividad de lisis, de pH 6 a 6.5 (FIG. 3). Estos efectos sobre la actividad de la membrana pueden ser debidos a la disminución de densidad de carga del polímero por la formación de los grupos éster y amida y/o por el aumento de la hidrofobicidad de los polímeros.

El transporte de compuestos biológicamente activos al citoplasma de la célula se ve facilitado por la coendocitosis de los compuestos biológicamente activos con los polímeros que contienen anhídrido maleico. En uno de los aspectos de la invención, el compuesto biológicamente activo y los polímeros que contienen anhídrido maleico no están asociados entre sí pero ambos sufren endocitosis por la célula. En otro aspecto de la invención, el compuesto biológicamente activo y el polímero que contiene el anhídrido maleico están asociados entre sí por medio de interacciones covalentes o no covalentes. Las interacciones no covalentes incluyen interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, interacciones de Van der Waals e interacciones de afinidad. Esta asociación puede activar o mejorar la co-endocitosis del compuesto biológicamente activo y los polímeros que contienen anhídrido maleico. La célula puede estar *in vivo* o *in vitro*. Para el transporte de un compuesto biológicamente activo a una célula *in vivo*, el polímero y compuesto biológicamente activo se insertan en el animal de una manera que permita que el polímero y el compuesto biológicamente activo se pongan en contacto con la célula. Las vías de administración parenteral incluyen intravascular, intramuscular, intraparenquimal, intradérmica, subdérmica, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, intratecal, subdural, epidural y las inyecciones intralinfáticas que utilizan una jeringa y una aguja o catéter. Otras vías de administración incluyen intraparenquimal en tejidos como el músculo (intramuscular), hígado, cerebro y riñón. Las rutas epiteliales incluyen la vía de administración oral, nasal, respiratoria y vaginal.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención presente, se definen a continuación una serie de términos y frases:

Un polímero es una molécula construida por enlaces repetitivos de unidades más pequeñas llamadas monómeros. El polímero puede ser de tipo lineal, de red ramificada, estrella, peine o de escalera. El polímero puede ser un homopolímero en que se utiliza un único monómero o puede ser un copolímero, en el que se utilizan dos o más monómeros.

La cadena principal de un polímero se compone de los átomos cuyos enlaces se necesitan para la propagación de la longitud del polímero. Por ejemplo en poli-L-lisina, se requieren el carbono carbonilo, carbono α y los grupos amino α para la longitud del polímero y son por lo tanto, átomos de la cadena principal. La cadena lateral de un polímero se compone de los átomos cuyos enlaces no son necesarios para la propagación de la longitud de polímero. Por ejemplo, en poli-L-lisina, los carbonos β , γ , δ y ϵ y el nitrógeno ϵ no son necesarios para la propagación del polímero y son por lo tanto átomos de cadena lateral.

Otros componentes de los monómeros y polímeros: los polímeros pueden tener grupos funcionales que mejoran su utilidad. Estos grupos pueden ser incorporados en los monómeros antes de la formación del polímero o conectados al polímero después de su formación. Los grupos funcionales se pueden seleccionar de la lista que consiste en: grupos de diana, modificadores de interacción, estabilizadores estéricos y compuestos activos de membrana, grupos de afinidad y grupos reactivos.

Los grupos de diana o ligandos, se utilizan para dirigir el polímero o complejo polimérico a las células, a células específicas, a los tejidos o a ubicaciones específicas en una célula. Los grupos de diana mejoran la asociación de las moléculas con una célula. Ejemplos de grupos de diana incluyen aquellos que dirigen al receptor de la asialoglicoproteína mediante el uso de residuos de asialoglicoproteínas o galactosa. Otras proteínas tales como la insulina, EGF o transferrina pueden utilizarse para dirigir. Otros grupos de diana incluyen moléculas que interaccionan con las membranas, tales como los ácidos grasos, colesterol, compuestos de dansilo y derivados de anfotericina. Se han utilizado una variedad de ligandos para dirigir fármacos y genes a las células y a receptores celulares específicos. El ligando puede buscar un destino dentro de la membrana celular, sobre la membrana celular o cerca de una célula. La unión de un ligando a un receptor puede iniciar la endocitosis.

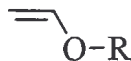
Un estabilizador estérico es un grupo hidrófilo de cadena larga que previene la agregación del polímero final obstaculizando estéricamente las interacciones electrostáticas de partículas a partículas. Los ejemplos incluyen: grupos alquilo, cadenas de PEG, polisacáridos, moléculas de hidrógeno, y alquilaminas.

Un modificador de interacción cambia la manera en que una molécula interacciona con ella misma u otras moléculas, comparada con la molécula que no contiene ningún modificador de interacción. El resultado de esta modificación es que las auto interacciones o interacciones con otras moléculas o aumentan o disminuyen. Por ejemplo, el polietilenglicol es un modificador de interacción que disminuye las interacciones entre las moléculas con ellas mismas y con otras moléculas.

Los polímeros o compuestos activos sobre las membranas son moléculas que son capaces de modificar la estructura de la membrana. Este cambio en la estructura puede demostrarse cuando el compuesto induce uno o más de los siguientes efectos en una membrana: una alteración que permite la permeabilidad de moléculas pequeñas, la formación de poros en la membrana, una fusión o fisión de las membranas, una alteración que permite la permeabilidad de las moléculas grandes o una disolución de la membrana. Esta alteración puede ser funcionalmente definida por la actividad del compuesto en al menos uno de los siguientes ensayos: lisis de glóbulos rojos (hemólisis), fuga de liposomas, fusión de liposomas, fusión celular, lisis celular y liberación de endosomas. Más concretamente, los compuestos activos en la membrana permiten el transporte de moléculas para cruzar la membrana con un peso molecular superior a 50 unidades de masa atómica. Este transporte puede lograrse tanto por la pérdida total de la estructura de la membrana, como por la formación de agujeros (o poros) en la estructura de la membrana, o el transporte asistido del compuesto a través de la membrana.

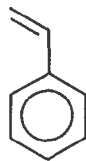
Un compuesto biológicamente activo es un compuesto con el potencial de reaccionar con componentes biológicos y está diseñado para cambiar un proceso natural asociado con una célula. A efectos de esta solicitud, un proceso natural celular es un proceso que está asociado con la célula antes del transporte del compuesto biológicamente activo. Los compuestos biológicamente activos pueden seleccionarse de la lista que comprende: productos farmacéuticos/fármacos, proteínas, péptidos, inhibidores de enzimas, hormonas, citoquinas, antígenos, anticuerpos y polinucleótidos.

La estructura general de un éter de vinilo es:



R puede ser cualquier grupo que contiene carbono. Cualquiera de los dos átomos de carbono puede ser enlazado a átomos de hidrógeno o carbono.

La estructura general de un estireno es:



Pueden hacerse sustituciones en cualquiera de los átomos de carbono del fenilo. Cualquiera de los dos átomos de carbono que comparten un enlace doble puede ser enlazado a átomos de hidrógeno o carbono.

- 5 El término polinucleótido, o ácido nucleico o ácido polinucleico, es un término de la técnica que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos son las unidades monómeras de los polímeros de polinucleótido. Los polinucleótidos con menos de 120 unidades monómeras suelen denominarse a menudo oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales tienen un esqueleto de desoxirribosa o ribosa-fosfato. Un polinucleótido artificial o sintético es cualquier polinucleótido que es polimerizado *in vitro* o en un sistema libre de células y contiene las mismas bases o similares, pero puede contener un esqueleto de un tipo distinto del esqueleto de ribosa-fosfato natural. Estos esqueletos incluyen: PNAs (ácidos nucleicos péptidos), fosforotioatos, fosfordiamidatos, morfolinolinos y otras variantes del esqueleto de fosfato de los ácidos nucleicos naturales. Las bases incluyen las purinas y pirimidinas, que además incluyen los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales. Los derivados sintéticos de las purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a, las modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero no limitado a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y alquilhaluros. El término base abarca cualquiera de los conocidos análogos de base de ADN y ARN. El término polinucleótido incluye el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) y combinaciones de ADN, ARN y otros nucleótidos naturales y sintéticos.

- 20 Un polinucleótido puede ser transportado a una célula para expresar una secuencia de nucleótido exógeno, para inhibir, eliminar, aumentar o alterar la expresión de una secuencia de nucleótido endógeno, o para afectar a una característica fisiológica específica no naturalmente asociada con la célula.

- 25 Un inhibidor de la expresión de genes basado en un polinucleótido comprende cualquier polinucleótido que contenga una secuencia cuya presencia o expresión en una célula causa la degradación de o inhibe la función, transcripción o traslación de un gen de manera específica a la secuencia. Los inhibidores de la expresión basados en polinucleótidos pueden seleccionarse del grupo que comprende: siARN, microARN, ARN de interferencia o ARNi, bicatenario dsARN, ribozimas, polinucleótidos antisentido y casetes de expresión de ADN que codifican siARN, microARN, dsARN bicatenario, ribozimas o ácidos nucleicos antisentido. siARN comprende una estructura de cadena doble que por lo general contiene de 15-50 pares de bases y preferentemente de 19-25 pares de bases y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen diana expresado o ARN dentro de la célula.
- 30 Un siARN puede constar de dos polinucleótidos anelados o un polinucleótido único que forma una estructura de horquilla. Los microARNs (miARNs) son polinucleótidos pequeños que no codifican, aproximadamente de 22 nucleótidos de longitud, que dirigen la destrucción o represión de la traslación de sus mARNs dianas. Los polinucleótidos antisentido comprenden una secuencia que es complementaria a un gen o mARN. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolinolinos, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares. El inhibidor de expresión basado en polinucleótidos puede ser polimerizado *in vitro*, recombinante, puede contener secuencias quiméricas, o pueden ser derivados de estos grupos. El inhibidor de expresión basado en polinucleótidos puede contener ribonucleótidos, desoxirribo-nucleótidos, nucleótidos sintéticos o cualquier combinación adecuada tal que el ARN y/o gen dianas sean inhibidos.

Ejemplos

- 40 Ejemplo 1. Transporte del fármaco a las células usando polímeros aniónicos basados en anhídrido maleico: para evaluar la habilidad de estos polímeros como ayudantes en el transporte de un compuesto biológicamente activo elegimos evaluar la habilidad de estos polímeros para trasportar un oligonucleótido antisentido.

- 45 Los oligonucleótidos de morfolino fosfordiamidato (PMOs) son una clase de oligómeros antisentido que han demostrado ser muy eficaces en la inhibición de la expresión de genes específicos *in vivo* [Heasman et al. 2000; Nasevicius et al. 2000]. Estos agentes antisentido ejercen sus efectos por mecanismos de inhibición estérica y se pueden utilizar para bloquear la traslación o división de un ARN diana [Kang et al. 1998; Giles et al. 1999; Ghosh et al. 2000]. PMOs son análogos de nucleótido sin carga en el que un anillo de morfolino de seis miembros está sustituido por ribosa y un enlace de fosfordiamidato sin carga reemplaza el enlace de fosfodiéster [Summerton et al. 1997]. Como PEG, los oligómeros antisentido con carga y sin carga pueden ser interiorizados por endocitosis [Carrasco 1994], pero no pueden difundirse a través de las membranas de la célula [Akhtar et al 1991; Akhtar et Al. 2000].

Para el transporte de oligómeros aniónicos, se utilizan habitualmente lípidos catiónicos [Hope et al. 1998; Audouy et al. 2001] y polímeros [Robaczewska et al. 2001] que son eficaces en el transporte de ADN del plásmido. Sin embargo,

para poder utilizar estas estrategias para el transporte de oligonucleótidos sin carga tales como PMOs, el PMO debe primero estar formando un complejo con una cadena complementaria de oligonucleótido aniónico para formar un complejo cargado. Dos otros métodos para el transporte de PMOs, carga por raspadura y carga por jeringa, implican ambos físicamente dañar las células para crear lesiones transitorias en la membrana plasmática [Ghosh et al. 2000].

- 5 Para probar el transporte de PMO por polianiones hidrofóbos, se utilizó una línea celular de HeLa disponible en el mercado que lleva un gen de luciferasa integrado con un sitio de empalme mutante [Kang et al. 1998]. Este lugar de empalme mutante origina la producción de un mRNA que codifica una proteína de luciferasa inactiva truncada. Las bases del PMO bloqueante se emparejan, por lo tanto, bloqueando este sitio de empalme, permitiendo así la expresión de la enzima activa de longitud completa. Por lo tanto, el nivel de expresión de la luciferasa en esta línea celular es directamente proporcional a la cantidad de PMO que se puede transportar al núcleo.

10 La coincubación de PMO bloqueante 2,5 μM con distintos polianiones anfífilicos, que incluyen PPA, SMA, BVEMA y sus derivados dio lugar a un aumento de la producción de luciferasa. La cantidad de unidades de luz, que es proporcional a la cantidad de luciferasa producida, se normaliza para las células cultivadas en ausencia de agentes de transporte.

- 15 Tabla 1. Transporte celular del fármaco de morfolino que utiliza polímeros basados en anhídrido maleico.

Agente	<u>Veces de aumento en unidades de luz relativa</u>	
	Opti-DMEM (sin suero)	medio de crecimiento + 10% de suero
PPA (20 μg)	27	1
BVEMA (80 μg)	1	–
P-BVEMA (80 μg)	3	5
P-BVEMA (320 μg)	–	15
M-BVEMA (80 μg)	2	6
M-BVEMA (320 μg)	–	8
SMA diácido (500 μg)		1
Éster butílico de SMA (500 μg)		1,6
Propilamida de SMA		1

- El polianión PPA es un agente de transporte muy bueno en los medios libres de suero como cabría esperar de datos publicados. Sin embargo, la adición de proteínas del suero a los medios de cultivo completamente inhibe cualquier transporte por PPA. Como se mencionó anteriormente, el polianión SMA se ha estudiado como un vehículo de transporte de fármacos únicamente por su capacidad, como se ha visto para otros polímeros, para secuestrarse en tumores por el efecto EPR. Muy poco se ha publicado en relación con la actividad sobre la membrana de SMA; sin embargo, se ha informado de que la capacidad de unión a la célula de SMA depende del pH y la temperatura del medio [Oda et al. 1987]. La dependencia de la temperatura de la unión a la célula sugiere que la unión aumentada a pH ácido puede no ser debido a cambios en SMA en sí mismo, cuya protonación debería ser insensible a la temperatura, sino debido a un cambio en la membrana celular.

- 25 Cabe señalar que los valores en la tabla son para la cantidad máxima de polianión que podemos añadir sin ver toxicidad. Los intentos de aumentar el transporte mediante el aumento de la cantidad de PPA y el éster butílico de SMA produjeron considerable muerte celular, observada como una disminución en la confluencia celular.

- Al contrario que con los polianiones basados en PPA y SMA, la asistencia en el transporte del polianiones derivados de BVEMA parece ser activa en la presencia de proteínas del suero. El polímero más hidrófobo de la serie BVEMA es el derivado de propilamida, que dio las concentraciones más altas de transporte de oligonucleótidos en presencia de proteínas de suero.

Estos resultados de transporte son importantes porque demuestran que los polianiones pueden transportar compuestos biológicamente activos. Además, los PMOs no sólo fueron transportados al citoplasma, sino que su difusión en el núcleo no fue obstruida.

- 35 Ejemplo 2. Copolimerización de anhídrido maleico con alquil vinil éteres VEMA: anhídrido maleico (1 eq molar) y azobisisobutironitrilo (0,01 a 0,1 eq molar) se disuelven en tolueno anhidro desgaseado en un vial de 30 ml. con cierre de rosca. Se agrega a este alquil vinil éter(1,5 eq molar) y el vial se lava con nitrógeno y se coloca en un baño

de arena a 50° C de 6 a 24 horas. Después de que se ha completado el tiempo de polimerización el contenido del vial se vierte en éter de petróleo (150° C punto de ebullición) y se recupera por filtración, se lava con metanol seco y se seca a alto vacío. Los alquil vinil éteres que se pueden utilizar son C2-C18. En particular, puede utilizarse el butil vinil éter.

5 Ejemplo 3. Síntesis de ésteres del copolímero vinil éter - anhídrido maleico (VEMA): a una solución de VEMA en THF anhídrido se agrega 100 eq de alcohol (en relación con el grupo funcional de anhídrido de VEMA). A esta solución se agrega 1 mol % HCl o H₂SO₄. La solución se agita durante la noche. A esta solución se agrega agua y el polímero precipitado se aísla. El polímero, a continuación, se disuelve en agua al llevar el pH a 7,5 por adición de NaHCO₃. El polímero se precipita después de la solución por acidificación con HCl hasta llevar el pH a 2. Entonces, el polímero se disuelve nuevamente en agua a pH 7,5 con NaHCO₃. Una variedad de alcoholes pueden utilizarse para sintetizar los ésteres. En particular, pueden utilizarse los alcoholes metílico, etílico, propílico y alcoholes de butilo.

10 Ejemplo 4. Síntesis de amidas del copolímero viniléter - anhídrido maleico (VEMA): a una solución de amina en agua, se agrega 1 eq mol % de VEMA (en relación con el grupo funcional de anhídrido de VEMA). La solución se agita durante la noche. El polímero se precipita después de la solución por acidificación con HCl para llevar el pH a 2. El polímero, a continuación, se aísla y se disuelve de nuevo en agua a pH 7,5 con NaHCO₃. Una variedad de aminas pueden utilizarse para sintetizar las amidas. En particular, podrán utilizarse metilamina, etilamina, propilamina y butilamina.

Ejemplo 5. Síntesis de derivados del copolímero de estireno - anhídrido maleico (SMA): un polímero de SMA que contenía estireno al 50% y anhídrido maleico al 50% Pm 1.400 fue comprado a Polyscience Inc (Warrington, PA).

20 Diácido de SMA: 100 mg de polímero de SMA se hizo reaccionar con 100 mg de hidróxido de sodio en 50 ml de agua durante 16 horas. La solución acuosa fue colocada después en tubos de diálisis límite de 14.000 de Pm, y dializados con 80 l de agua durante 72 horas. La solución de polímero, a continuación, fue obtenida de los tubos de diálisis y precipitada por adición de HCl hasta llevar el pH a 2. Se formó a continuación una solución madre de diácido-SMA disolviéndolo en agua e hidróxido de sodio hasta llevar a pH 6.

25 Éster de butilo de SMA, 100 mg de polímero de SMA se hizo reaccionar con 0,5 ml de alcohol butílico en 15 ml de tetrahidrofurano (THF) anhídrido durante 16 horas. El THF se separó por evaporación en rota vapor y el polímero fue disuelto en agua e hidróxido de sodio. La solución acuosa fue colocada en tubos de diálisis límite de 14.000 de PM y se dializó con 80 l de agua durante 72 horas. La solución de polímero, a continuación, fue extraída de la tubería de diálisis y se precipitó por adición de HCl hasta un pH de 2. La solución madre del éster butílico de SMA, se formó a continuación, disolviéndolo en agua e hidróxido de sodio hasta llevar el pH a 6.

30 Propil amida de SMA; 100 mg de polímero de SMA se hicieron reaccionar con 0,5 ml de propilamina en 15 ml de metanol durante 16 horas. El metanol fue eliminado en rota vapor y el polímero fue disuelto en agua e hidróxido de sodio. La solución acuosa se colocó después en tubos de diálisis límite de Pm de 14.000 y se dializó con 80 l de agua durante 72 horas. La solución de polímero, a continuación, fue extraída de los tubos de diálisis y se precipitó por adición de HCl hasta llevar el pH a 2. La solución madre del éster de butilo de SMA, se formó a continuación, disolviéndolo en agua e hidróxido de sodio hasta llevar el pH a 6.

35 Ejemplo 6: Síntesis del ácido polipropilacrílico: el ácido propilacrílico fue sintetizado según Borszeky et al [Borszeky et al. 1997]. El ácido propilacrílico fue polimerizado según Lackey et al [Lackey et al. 1999]. El ácido propilacrílico se mezcló con 1 mol % de azobisisobutironitrilo y se calentó a 60° C durante 16 horas. Se añadió éter a la mezcla de reacción y el precipitado de polímero se aisló.

40 Ejemplo 7: Ensayo de hemólisis; la actividad sobre la membrana de polímeros y péptidos se midió con un ensayo de hemólisis de glóbulos rojos (RBC). Sangre porcina entera fue aislada en vacutainers heparinizados. Los RBCs se aislaron por centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos. Se lavaron tres veces con fosfato dibásico de sodio 100 mM al pH deseado y se resuspendieron al volumen inicial. El tampón de fosfato de pH deseado se obtuvo por la acidificación de una solución stock de fosfato dibásico de sodio. Los intentos de llegar al pH ácido deseado con fosfato monobásico produjo la hemólisis. Se añadieron 20 µl de la suspensión de RBCs lavada, que era de aproximadamente 10⁸ células [Lackey et al 1999] en 500 µl de tampón de fosfatos. A esta solución se añadieron 20 µg de polímero. Las muestras se incubaron durante una hora y media en una incubadora a 37° C. A continuación fueron centrifugadas durante 1 min a 14.000 rpm. La lisis se determinó por la medición de la absorbancia del sobrenadante a 541 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó suponiendo que el 100% de lisis era la absorbancia de la hemoglobina liberada por la adición de agua desionizada, todas las absorbancias de las muestras tenía la absorbancia del tampón solo sustraído.

45 Ejemplo 8. Ensayo del transporte de morfolino; células HeLa Tet-Off (laboratorios Clontech, Palo Alto, CA) fueron cultivados en medio de Eagle modificado de Delbecco (DMEM, Cellgro, Herndon, VA), que contenía 10% de suero bovino fetal (BFS) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah) en una incubadora humidificada a 37° C con atmósfera de CO₂ al 5%. Las células fueron dispuestas en placas de cultivo de 24 pocillos con una densidad de 3 x 10⁶ células/pocillo e incubadas durante 24 horas. El medio fue reemplazado con 0,5 ml DMEM, con o sin 10% de EFB, que contenía morfolino 0,5 µmoles (CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A, número de identificación de

secuencia 10, Gene Tools, Philomath, OR) y que contenía o no 20 µg de diversos polianiones. Las células se incubaron durante 4 horas en una incubadora humidificada con 5% de CO₂, a 37° C. Los medios fueron después reemplazados por medios de Eagle modificados de Dubelco que contenían 10% de suero bovino fetal. Las células, a continuación, se incubaron durante 48 horas. Después, las células fueron cosechadas y el lisado, a continuación, se ensayó para expresión de luciferasa como se describió anteriormente [Wolff et al. 1990]. Se utilizó un luminómetro Lumat LB 9507 (EG & G de Berthold, Bad Wildbad, Alemania). La cantidad de luciferasa producida en la presencia de morfolino y polianión se normalizó para la cantidad producida en ausencia del polianión y como se comunica en la Tabla 1.

Ejemplo 9. Síntesis de la butilamida del copolímero de diviniléter - anhídrido maleico que contiene disulfuro (DBVEMA): a una solución de n-butilamina y cistamina (en una proporción molar de 50 a 1) en agua, se añade 1 eq mol % (grupo funcional de anhídrido de VEMA relativo a los grupos amina) de VEMA. La solución se agita durante la noche. El polímero se precipita luego de la solución por acidificación con HCl hasta llevar el pH a 2. El polímero, a continuación, se aísla y de nuevo se disuelve en agua a pH 7,5 con NaHCO₃ en presencia de 10 equivalentes molares de ditiotreitól (con relación a la cistamina de partida). Después de 4 horas, el polímero se precipita luego de la solución por acidificación con HCl hasta llevar el pH a 2. El polímero, a continuación, se aísla y de nuevo se disuelve en agua a pH 7,5 con NaHCO₃ en presencia de 10 equivalentes molares de 2,2'-ditiodipiridina (con relación a la cistamina de partida). Después de 4 horas, el polímero se precipita después de la solución por acidificación con HCl hasta llevar el pH a 2. El polímero, a continuación, se aísla y se disuelve en agua. Se confirma la presencia de la tiopiridina por la medición de la absorbancia del polímero a 280 nm. La tiopiridina puede utilizarse para conjugar cualquier molécula que contenga tiol. Una variedad de aminas pueden utilizarse para sintetizar las amidas. En particular, pueden utilizarse aminas de metilo, etilo, propilo y butilo.

Ejemplo 10. Conjugación del oligonucleótido de morfolino y la butilamida del copolímero de diviniléter- anhídrido maleico que contiene disulfuro (DBVEMA): el terminal amino del oligonucleótido de morfolino fue modificado con N-Succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, Pierce Biotechnology Inc) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se eliminó el grupo acetilo de SATA de acuerdo con el protocolo del fabricante para producir el oligonucleótido de morfolino modificado de tiol, que se conjugó a DBVEMA. Se agregaron 50 pmoles a 500 µg de DBVEMA en 25 ml de 5 mM de HEPES a pH 7,8. La actividad del oligonucleótido de morfolino se ensayó como anteriormente.

Muestra	Unidades relativas de luz
Conjugado de morfolino-DBVEMA	41710
Morfolino solo	5780

Lo anterior se consideró solamente como ilustrativo de los principios de la invención. Además, ya que numerosas modificaciones y cambios se le ocurrirán fácilmente a aquellos expertos en la técnica, no se desea limitar la invención a la construcción exacta y la operación mostrada y descrita. Por tanto, todas las modificaciones adecuadas y equivalentes caen dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para transportar un compuesto biológicamente activo al citoplasma de una célula que comprende poner en contacto dicha célula con dicho compuesto biológicamente activo y un polianión con actividad sobre la membrana que comprende un copolímero alterno basado en éter vinílico – anhídrido maleico, dicho polianión es capaz de endosomolisis que se determina usando un ensayo de hemólisis, tal que el polianión con actividad sobre la membrana y el compuesto biológicamente activo sufren endocitosis por la célula.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el compuesto biológicamente activo está asociado de forma no covalente al polianión con actividad sobre la membrana.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el compuesto biológicamente activo está asociado de forma covalente al polianión con actividad sobre la membrana.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el éter vinílico se selecciona del grupo que comprende alquil vinil éter y aril vinil éter.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en donde el alquil vinil éter se selecciona del grupo que consiste en: propil vinil éter y butil vinil éter.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde un grupo hidrófobo se une de forma covalente al monómero anhídrido en el polianión con actividad sobre la membrana.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en donde los grupos hidrófobos se seleccionan del grupo que consiste en: ésteres hidrófobos y amidas hidrófobas.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde un grupo funcional se une de forma covalente a un monómero anhídrido en el polianión con actividad sobre la membrana.
9. Un compuesto biológicamente activo y un polianión con actividad sobre la membrana, en donde el polianión es capaz de endosomolisis que se determina usando un ensayo de hemólisis, que comprende un copolímero alterno basado en éter vinílico – anhídrido maleico para uso en la terapia génica, en donde la terapia génica comprende el transporte del compuesto biológicamente activo al citoplasma de una célula poniendo en contacto dicha célula con el compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad en la membrana, de manera que el polianión y el compuesto biológicamente activo sufren endocitosis por la célula.
10. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 9, en donde el compuesto biológicamente activo está asociado de forma no covalente al polianión con actividad sobre la membrana.
11. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 9, en donde el compuesto biológicamente activo está asociado de forma covalente al polianión con actividad sobre la membrana.
12. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 9, en donde el éter vinílico se selecciona del grupo que comprende alquil vinil éter y aril vinil éter.
13. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 12, en donde el alquil vinil éter se selecciona del grupo que consiste en: propil vinil éter y butil vinil éter.
14. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 9, en donde un grupo hidrófobo se une de forma covalente a un monómero anhídrido en el polianión con actividad sobre la membrana.
15. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 14, en donde los grupos hidrófobos se seleccionan del grupo que consiste en: ésteres hidrófobos y amidas hidrófobas.
16. El compuesto biológicamente activo y el polianión con actividad sobre la membrana de la reivindicación 9, en donde un grupo funcional está unido de forma covalente a un monómero anhídrido en el polianión con actividad sobre la membrana.

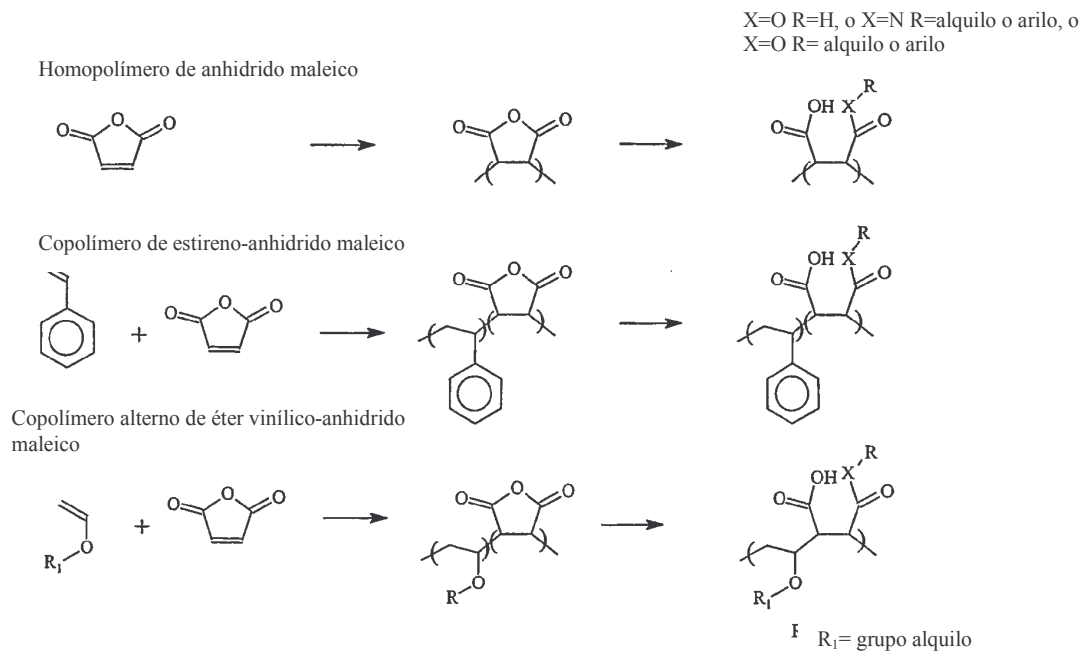


FIG. 1

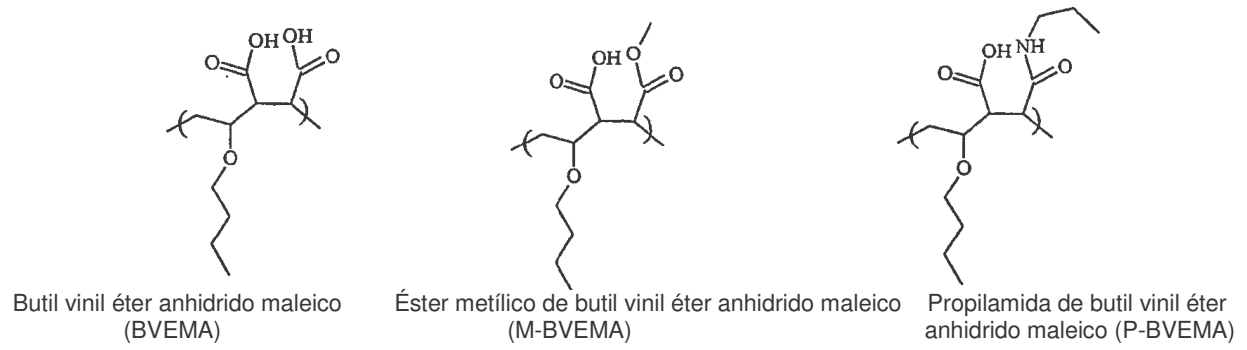


FIG.2

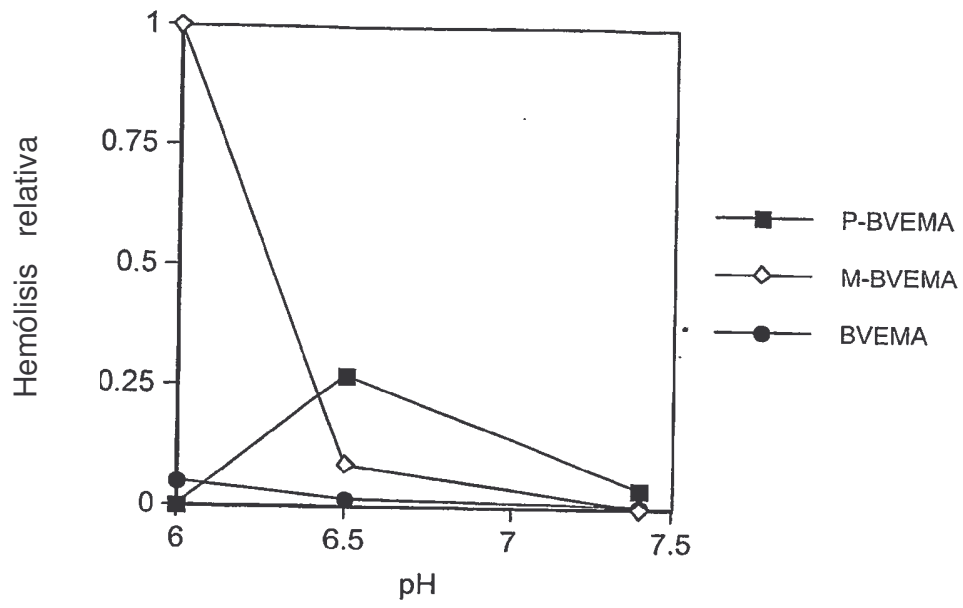


FIG. 3