



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 362 027**

(51) Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **09008139 .9**

(96) Fecha de presentación : **08.07.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2106807**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

(54) Título: **Composiciones y kits para mejorar la administración de agentes terapéuticos a células.**

(30) Prioridad: **08.07.1997 US 889355**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2011

(73) Titular/es: **CANJI, Inc.**
901 California Avenue
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es: **Engler, Heidrun;**
Nagabhushan, Tattanahalli L. y
Youngster, Stephen Kenneth

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 027 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

Composiciones y kits para mejorar la administración de agentes terapéuticos a células

Descripción

Antecedentes de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la administración terapéutica y de otros agentes a las células. Genes, polipéptidos, y otras moléculas están entre los agentes que se pueden administrar usando los compuestos y procedimientos de la invención. Las células pueden estar presentes individualmente o como un tejido u órgano biológico.

10 La administración de un compuesto a una célula es una primera etapa crítica de muchos procedimientos diagnósticos y terapéuticos. La terapia génica, por ejemplo, es una herramienta muy prometedora para la terapéutica y otros usos que requieren la administración de un ácido nucleico a una célula. Se han desarrollado, por ejemplo, distintos enfoques para tratar neoplasmas basándose en procedimientos de transferencia génica. Se han desarrollado procedimientos para corregir lesiones específicas en loci genéticos definidos que proporcionan un incremento de la transformación y progresión neoplásicas (Spandidos y col., *Anticancer Res.* 10: 1543-1554 (1990); Banerjee y col., *Cancer Res.* 52: 6297-6304 (1992)). Se puede resolver el exceso en la expresión de oncogenes dominantes usando técnicas para inhibir la transformación del gen o del producto génico. Se puede resolver la pérdida de función génica supresora tumoral usando procedimientos para reconstituir la función génica supresora tumoral natural (Goodrich y col., *Cancer Res.* 52: 1968-1973 (1992)). Además de estos procedimientos para conseguir la compensación de la mutación, se han desarrollado técnicas genéticas para erradicar específica y selectivamente las células tumorales. Estos enfoques de quimioterapia molecular se basan en la expresión específica de genes de toxinas en células neoplásicas (Abe y col., *Proc Soc Exp Biol Med.* 203: 354-359 (1993)). Finalmente, se han usado procedimientos de transferencia génica para conseguir inmunización antitumoral. Estos procedimientos de inmunopotenciación genética usan técnicas de inmunorregulación genética para potenciar el inmunorreconocimiento de tumores. Posteriormente, se ha desarrollado una variedad de distintos enfoques para llevar a cabo la terapia génica del cáncer.

25 Se ha observado una elevada incidencia de mutaciones en genes supresores tumorales, tales como p53 y RB, en el caso del carcinoma de vejiga (Fujimoto y col., *Cancer Res.* 52: 1393-1398 (1992); Cairns y col., *Oncogene* 6: 2305-2309 (1991)). Para dichas lesiones genéticas en genes supresores tumorales, se puede demostrar la reversión del fenotipo neoplásico con la sustitución del correspondiente gen supresor tumoral natural (Spandidos, *Id.*; Banerjee, *Id.*).

30 El carcinoma de vejiga representa una fuente significativa de morbilidad y mortalidad. El cáncer de vejiga se encuentra en el décimo lugar entre los varones y en el duodécimo lugar entre las mujeres en la mortalidad relacionada con el cáncer (Cancer Facts and Figures, Amer. Can. Soc. 5: 11 (1995)). Las terapias disponibles para el tratamiento del cáncer de vejiga incluyen la quimioterapia o inmunoterapia adyuvante, la resección transuretral de la enfermedad superficial, la cistectomía o radioterapia radical que se combina a menudo con la quimioterapia sistémica. A pesar de estas opciones terapéuticas, la supervivencia global no ha cambiado apreciablemente. (*Id.*) De esta manera, deben desarrollarse nuevas modalidades terapéuticas para el tratamiento del cáncer de vejiga.

35 Se han desarrollado estrategias de terapia génica como un enfoque terapéutico alternativo (Véanse por ejemplo, Brewster y col., *Eur Urol* 25: 177-182 (1994); Takahashi y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5257-5261 (1991); Rosenberg, SA, *J. Clin Oncol.* 10: 180-199 (1992)). El tratamiento satisfactorio del cáncer y de otras dolencias en un ser humano u otro animal puede depender de que penetre en las células una cantidad adecuada de un agente terapéutico, y de una proporción suficientemente grande de células diana capturen el agente terapéutico.

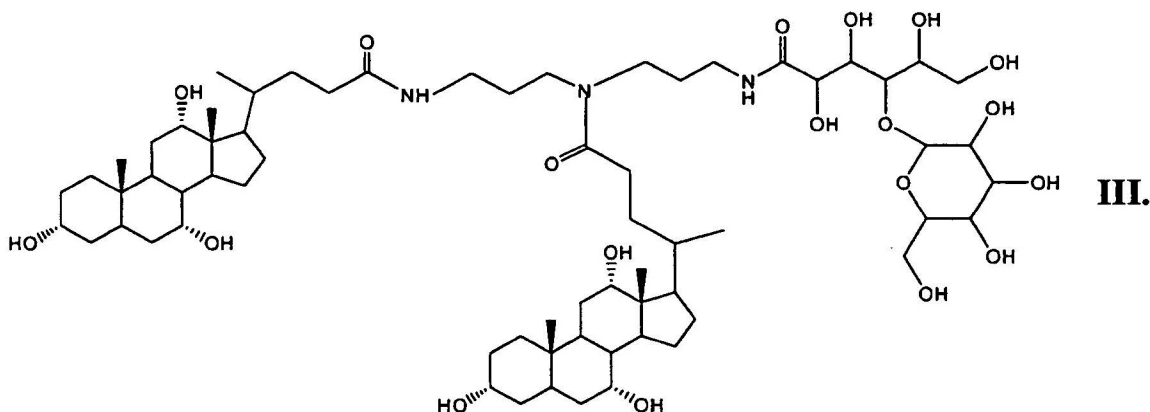
40 El documento WO 96/10038 da a conocer el uso de cationes de poliamina para transferir moléculas de ácido nucleico a las células diana; sin embargo, las moléculas dadas a conocer en el anterior son estructuralmente diferentes del compuesto potenciador de la administración de la presente invención.

45 Otros muchos agentes terapéuticos y otros agentes moduladores son polipéptidos o, por ejemplo, moléculas pequeñas. De nuevo, la cantidad del agente que alcanza una población de células diana puede tener un gran impacto sobre la eficacia del tratamiento. Por tanto, existe una necesidad de compuestos y procedimientos que puedan potenciar la cantidad de un agente que se administra a una célula o a una población de células.

50 La presente invención cumple esta y otras necesidades.

Resumen de la invención

55 La invención proporciona una composición para administrar un agente a una célula, en la que un compuesto potenciador de la administración y el agente se proporcionan separadamente antes de que se mezclen de manera previa a la administración a un paciente y el compuesto potenciador de la administración es un compuesto de fórmula III, que tiene la siguiente estructura:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El compuesto potenciador de la administración y el agente se pueden mezclar antes de la administración al paciente. Se puede formular la composición para la administración intravesical a la vejiga. La concentración del compuesto potenciador de la administración puede estar entre 0,002 y 2 mg/ml.

El agente es preferiblemente un agente terapéutico, en particular un modulador de un proceso biológico en una célula cuando el agente está presente en la célula, en el que el proceso biológico se selecciona entre el grupo constituido por crecimiento celular, diferenciación, proliferación, una ruta metabólica o biosintética, expresión génica, un proceso asociado a enfermedad, y una respuesta inmune. En una forma de realización preferida, la proliferación es cáncer. El agente puede ser un gen que codifica un polipéptido, en particular una citocina, tal como un interferón alfa. Se puede incorporar el gen a un vector. El vector puede ser un vector vírico recombinante. Se puede seleccionar el vector vírico recombinante entre el grupo constituido por un vector del virus del herpes, un vector retrovítico, un vector del virus vaccinia, un vector de un virus adenoasociado y un vector adenovítico. Se puede formular el vector vírico como una suspensión que contiene entre 1×10^8 partículas/ml a 5×10^{11} partículas/ml del vector vírico. La composición es preferiblemente para tratar el cáncer y lo más preferible para tratar el carcinoma de vejiga.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa gráficamente la influencia de la formulación de la transferencia y de la expresión génica mediada por adenovirus en el epitelio de la vejiga de rata tras la administración intravesical,

La Fig. 2 representa gráficamente la expresión transgénica de un adenovirus en células epiteliales de la vejiga tras la administración intravesical,

La Fig. 3 representa gráficamente la expresión transgénica de un adenovirus dependiente de la dosis en la vejiga de rata tras la administración intravesical,

La Fig. 4 representa gráficamente un análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de la expresión transgénica de un adenovirus recombinante en la vejiga de ratón tras la administración intravesical,

La Fig. 5 representa gráficamente un curso de tiempo de la expresión transgénica de un adenovirus recombinante en tejido de vejiga, riñón, e hígado tras la administración intravesical del virus,

La Fig. 6 representa gráficamente el ADN transgénico de un adenovirus recombinante en homogenados de vejiga y riñón tras la administración intravesical,

La Fig. 7 representa gráficamente la mejora de la transferencia génica al epitelio de vejiga usando una formulación Big CHAP (N, N, bis-(3-D-gluconamidopropil)-colamida (CALBIOCHEM7 Biochemicals, San Diego, California),

La Fig. 8 representa gráficamente la mejora de la transferencia génica al epitelio de vejiga usando diferentes concentraciones de adenovirus recombinante en una formulación Big CHAP 7 mM.

La Fig. 9 representa gráficamente la potenciación de la expresión transgénica de un adenovirus recombinante en tejido de vejiga usando una formulación de etanol (ETOH) o Big CHAP.

La Fig. 10 representa gráficamente la transferencia génica a tumores usando una formulación Big CHAP 4 mM.

La Fig. 11 representa gráficamente la transferencia transgénica a un epitelio de vejiga de cerdo.

La Fig. 12 representa gráficamente la expresión de p53 en tejido tumoral.

La Fig. 13 representa gráficamente la transferencia génica a la mucosa del íleo de rata.

La Fig. 14 es una fotografía de secciones de vejiga de ratas, en las que se comparó la capacidad de Big CHAP procedente de dos fuentes para potenciar la transferencia génica. La tinción Xgal más intensa en la hilera inferior en comparación con la hilera superior demostró una mayor potenciación de la transferencia génica por Big CHAP de CALBIOCHEM7 en comparación con Big Chap de Sigma (Sigma Chemical Company, San Luis, Missouri).

La Fig. 15A y B representa gráficamente la cromatografía en capa fina (TLC) de Big CHAP de CALBIOCHEM7 y Sigma. Se desarrolló una única banda distinta procedente de la muestra de BC – Sigma (Fig. 15B), aunque llegaron a ser evidentes tres bandas adicionales en la muestra de BC-CALBIOCHEM7 (Fig 15A).

La Fig. 16 representa gráficamente la TLC de las impurezas de Big CHAP. Las bandas están marcadas como sigue: Banda 1: Big CHAP (CALBIOCHEM7); banda 2: Impureza I; Banda 3: Impureza II; Banda 4: Mezcla de Impureza II y III, Banda 5: Impureza III; Banda 6: Big CHAP (CALBIOCHEM7); Banda 7: Big CHAP (CALBIOCHEM7).

La Fig. 17 es una fotografía de secciones de vejiga de ratas, en las que se comparó la capacidad de aumentar las concentraciones de Big CHAP (Sigma) de potenciar la transferencia génica con una BIG CHAP (CALBIOCHEM7) patrón. La tinción Xgal más intensa indicó la transferencia génica potenciada a concentraciones más elevadas de Big CHAP (Sigma).

La Fig. 18 es una fotografía de secciones de vejiga de ratas, en las que se evaluó la capacidad de Big CHAP (CALBIOCHEM7) y la Big CHAP (Sigma) tras la purificación, de potenciar la transferencia génica y se comparó con la Big CHAP no purificada procedente de aquellas fuentes como control. La intensidad de la tinción de Xgal indicó una reducida capacidad de potenciar la transferencia génica después que se ha purificado la Big CHAP procedente de cualquier fuente mediante la cromatografía en columna.

La Fig. 19 es una fotografía de secciones de vejiga de ratas, en las que se evaluó la capacidad de la Big CHAP (CALBIOCHEM7) y la Big CHAP (Sigma) tras la purificación, de potenciar la transferencia génica y se comparó con la Big CHAP no purificada procedente de aquellas fuentes y con las impurezas I y una combinación de impureza II e impureza II. La intensidad de la tinción de Xgal demostró una potenciación de la transferencia génica con 6 mg/ml de la combinación de la Impureza II y la Impureza III.

La Fig. 20 es una fotografía de secciones de vejiga de ratas, en las que se evaluó la capacidad de Big CHAP (Sigma) tras la purificación, de potenciar la transferencia génica y se comparó con la Big CHAP purificada (Sigma) reconstituida con Impureza II, Impureza III, o un análogo sintético de la Impureza II. La intensidad de la tinción de Xgal demostró una potenciación de la transferencia génica cuando se reconstituyó la Big CHAP (Sigma) purificada. Se incluyó la Big CHAP (CALBIOCHEM7) como control.

La Fig. 21 muestra las estructuras de Syn3 y dos análogos de Syn-3 solubles en agua. Se indica como "A" el dominio de Syn3 que se conservó en los dos análogos. Los análogos A-TMA y A-HCl fueron el resultado de la sustitución de cloruro de trimetilamonio (A-TMA) o clorhidrato (A-HCl) del resto lactosa de Syn3.

La Fig. 22 muestra la estructura, MALDI-EM, y RMN-¹H de la Impureza 1.

La Fig. 23 muestra la estructura, MALDI-EM, y RMN-¹H de la Impureza 2.

La Fig. 24 muestra la estructura, MALDI-EM, y RMN-¹H de la Impureza 3.

La Fig. 25 muestra una ruta para la síntesis de la Impureza 2.

La Fig. 26 muestra una ruta para la síntesis de Syn3. En la Fig. 34 se muestra una ruta alternativa para la síntesis de Syn3.

La Fig. 27A-27C demuestra que I3A (Syn3) potencia la expresión del β-galactósido mediada por adenovirus. Se obtuvieron elevados niveles de transferencia génica cuando se usó I3A a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM (Fig. 27A). Se muestran los controles para comparación:

Sin I3A (Fig. 27B) y como control positivo, Big CHAP 7,8 mM Calbiochem Lote nº 679693 (Fig. 27C)

La Fig. 28A y la Fig. 28B muestran los resultados de una valoración de la actividad de potenciación de la transferencia génica de I3A (Syn3). La reducción de I3A a 0,25 mg/ml en Big CHAP 3,9 mM (Fig. 28A) dio como resultado aún elevados niveles de transferencia génica en comparación con la actividad de transferencia génica obtenida cuando se usó I3A a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM (Fig. 28B). En el momento de la fijación, las vejigas tratadas con 0,25 mg/ml de I3A parecieron tener menos inflamación que las tratadas con 0,5 mg/ml de I3A.

La Fig. 29A-Fig. 29B muestra una comparación de la actividad de transferencia génica de I3A y Syn3. Se obtuvieron elevados niveles de actividad de β-galactósido usando I3A a 1 mg/ml en Tween 80 al 0,1% (Fig. 29A). Se obtuvieron

niveles de transferencia génica aproximadamente iguales usando Syn3 a 1 mg/ml en Tween 80 al 0,1% (Fig. 29B).

La Fig. 30A-Fig. 30D muestra una comparación de la actividad de transferencia génica de Syn3 en Tween 80 al 0,1% frente a Big CHAP 7,8 mM. Usar Syn3 a 1 mg/ml en Tween 80 al 0,1% (Fig. 30A) dio como resultado niveles de transferencia génica que fueron comparables a los obtenidos cuando se usó Syn3 a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM (Fig. 30C). Se muestran también controles negativos (sin Syn3) cuando se usan cualquiera de Tween 80 al 0,1% (Fig. 30B) o Big CHAP 7,8 mM (Fig. 30D).

La Fig. 31A-Fig.31D muestra una comparación de la actividad de transferencia génica de Syn3 a concentraciones iguales en detergentes Big CHAP y Tween 80. Cuando se disolvió Syn3 a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM (Fig. 31 A), se obtuvieron niveles muy elevados de transferencia génica. En comparación, la actividad de transferencia génica de Syn3 en Tween 80 al 0,05% (Fig. 31C) fue ligeramente reducida, con más regiones desprovistas de actividad de la β -galactosidasa. Se muestran también controles negativos para Big CHAP 7,8 mM (Fig. 31 B) y Tween 80 al 0,05% (Fig. 31 D).

La Fig. 32A-Fig. 32F muestra una comparación de la infiltración que sigue tras la administración de Syn3. A dosis más bajas de Syn3, se observó una infiltración proporcionalmente menor en la vejiga. Se usaron concentraciones decrecientes de Syn3 para la infección de rAd de las vejigas cuando se usó cualquiera de Big CHAP (Fig. 32A, B) o Tween 80 (Fig. 32D, E). Se muestran también las vejigas tratadas únicamente con detergente (sin Syn3) tanto con Big CHAP (Fig. 32C) como con Tween 80 (Fig 32F).

La Fig. 33A-Fig. 33D muestra que la administración de Syn3 da como resultado la inducción de infiltrados celulares. Cuando se comparó el nivel de infiltración resultante de la administración de virus y Syn3 (Fig. 33A) con el nivel obtenido solo de Syn3 (Fig. 33B), se encontró que la administración de Syn3 dio como resultado una significativa inducción de infiltrados. Se muestran también vejigas de animales tratados únicamente con virus (Fig. 33C) o un control sin virus/sin Syn3 (Fig. 33D).

La Fig. 34 muestra una ruta de síntesis de Syn3. Después que se llevó a cabo la Reacción 3 en DMF durante 24 horas, se evaporó el producto hasta sequedad, y se purificó en SiO_2 con DCM/MeOH/ H_2O (60:35:5).

La Fig. 35 muestra un protocolo que se usó para sintetizar A-tma y A-HCl, que son análogos de Syn3 que presentan un aumento de la solubilidad en disolución acuosa.

Descripción detallada

La presente invención proporciona una composición para el transporte potenciado de agentes al interior de las células, presentes dichas células en tejidos epiteliales. La composición de la invención comprende un compuesto de fórmula III. El compuesto aumenta la cantidad de un agente, pudiendo un agente de ese tipo modular un proceso celular asociado con, por ejemplo, la proliferación o un estado de enfermedad, que penetra en una célula y/o aumenta la proporción de células e un tejido u órgano que captura el agente.

El compuesto potenciador de la administración es útil para muchas aplicaciones que requieren la administración de una molécula a una célula. Por ejemplo, el diagnóstico y/o el tratamiento de muchos estados de enfermedad requieren a menudo la entrada de un agente en una célula que está implicada en el proceso de la enfermedad. Otro ejemplo es el uso de tecnología de ADN recombinante para producir proteínas de interés, tanto en cultivo celular como en un organismo recombinante. Los expertos en la materia conocen muchos ejemplos adicionales de situaciones en las que es deseable introducir un compuesto en una célula. El compuesto potenciador de la administración puede mejorar la eficacia de cada una de estas aplicaciones debido a la administración aumentada de un agente de interés a una célula o tejido diana.

A. Compuestos potenciadores de la administración

La invención proporciona una composición que comprende un compuesto potenciador de la administración de Fórmula III. El compuesto potenciador de la administración, cuando se formula con un agente de interés, potencia la administración el agente a una célula. En algunas formas de realización, las células están presentes en un tejido u órgano. "Un compuesto potenciador de la administración" se refiere a cualquier compuesto que potencia la administración de un agente a una célula, tejido u órgano. Aunque una comprensión del mecanismo por el cual se produce la administración potenciada no es esencial para practicar la invención, se señala que se puede producir la administración potenciada mediante cualquiera de diversos mecanismos. Uno de dichos mecanismos puede implicar la perturbación de la capa de glucosaminoglicano (GAG) protectora situada sobre el epitelio superficial del tejido u órgano mediante el compuesto potenciador de la administración.

La administración de un agente a células en una formulación que incluye un compuesto potenciador de la administración da como resultado un aumento en la cantidad de agente que se administra a las células, con respecto a la cantidad de agente administrado a las células cuando se administra en ausencia de compuesto potenciador de la administración. "Administración potenciada" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera o a ambos de un incremento en el número de copias de un agente que penetra en cada célula o a un incremento en la producción de células en, por ejemplo, u tejido u órgano, que captura el agente. En las formas de

realización preferidas, el compuesto potenciador de la administración da como resultado al menos aproximadamente un 20% de aumento, más preferiblemente al menos aproximadamente un 50% de aumento, y lo más preferible al menos aproximadamente un 100% de aumento en la administración de un agente a una célula o una población de células en comparación con la cantidad del agente administrado cuando se administra a células en ausencia del compuesto potenciador de la administración.

Se puede medir si un compuesto o formulación particular es eficaz en la potenciación de la administración de un agente, tal como un agente terapéutico o diagnóstico, a células mediante diversos medios conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede incluir un reactivo de detección en una formulación potenciadora de la administración que se administra a las células diana. La cantidad de reactivo de detección presente en las células que se tratan con la formulación potenciadora de la administración se compara con la detectada en células tratadas con una formulación que no incluye un gen, se puede incluir en la formulación un gen indicador para el cual la expresión es fácilmente detectable. Cuando el agente modulador es un polipéptido, se pueden probar los compuestos potenciadores de la administración, uniendo, por ejemplo, una marca al polipéptido que está presente en la formulación potenciadora de la administración y detectando la presencia y la cantidad de la marca que se encuentra en las células diana tras la administración de la formulación. Similarmente, cuando se van a usar diferentes moléculas de polipéptidos y polinucleótidos como agente modulador, se pueden marcar las moléculas y detectar la cantidad de marca que penetra en la población de células diana.

Los ejemplos de compuestos potenciadores de la administración incluyen, pero no se limitan a, detergentes, alcoholes, glicoles, tensioactivos, sales biliares, antagonistas de la heparina, inhibidores de la ciclooxigenasa, disoluciones salinas hipertónicas, y acetatos. Los alcoholes incluyen, por ejemplo, alcoholes alifáticos tales como etanol, N-propanol, isopropanol, alcohol butílico, alcohol acetílico. Los glicoles incluyen, por ejemplo, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol y otros glicoles de bajo peso molecular tales como glicerol y tioglicerol. Acetatos tales como ácido acético, ácido glucónico, y acetato de sodio son ejemplos adicionales de compuestos potenciadores de la administración. Disoluciones salinas hipertónicas tales como NaCl 1 M son también ejemplo de compuestos potenciadores de la administración. Los ejemplos de tensioactivos incluyen dodecil sulfato de sodio (SDS) y lisolecitina, polisorbato 80, nonilfenoxi-polioxietileno, lisofosfatidilcolina, polietilenglicol 400, polisorbato 80, éteres de polioxietileno, tensioactivos de éteres de poliglicol y DMSO. Se pueden usar también sales biliares tales como taurocolato, taurodesoxicolato de sodio, desoxicolato, quenodesoxicolato, ácido glicocólico, ácido glucoquenodesoxicólico y otros astringentes similares a nitrato de plata, tales como antagonistas de la heparina de tipo aminas cuaternarias tales como sulfato de protamina. Son también adecuados inhibidores de la ciclooxigenasa tales como, por ejemplo, salicilato de sodio, ácido salicílico, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como indometacina, naproxeno, y diclofenaco.

Los detergentes que pueden actuar como compuestos potenciadores de la administración incluyen, por ejemplo, detergentes aniónicos, catiónicos, de ión híbrido, y no iónicos. Los detergentes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, taurocolato, desoxicolato, taurodesoxicolato, cetilpiridio, cloruro de benzalconio, detergente ZWITTERGENT73-14, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato, Aldrich), Big CHAP, Desoxi Big CHAP, detergente TRITON-X-100, C12E8, Octil-B-D-Glucopiranosido, detergente PLURONIC7-F68, detergente TWEEN7 20, y detergente TWEEN7 80 (CALBIOCHEM7 Biochemicals)

Un ejemplo de un compuesto potenciador de la administración para formulaciones en las cuales el agente es, por ejemplo, un ácido nucleico, es Big CHAP, que es un derivado de colato (*véase, por ejemplo*, Helenius y col. (1979) "Properties of Detergents" En: Methods in Enzymology, Vol.66, 734-749. Con el fin de facilitar la transferencia génica mejorada de las formulaciones de ácido nucleico que comprenden preparaciones de Big-CHAP comerciales, la concentración de Big CHAP variará en función de su fuente comercial. Cuando el Big CHAP procede de CALBIOCHEM7, se prefiere que la concentración esté en un intervalo de 2 a 10 milimolar. Más preferido es de 4 a 8 milimolar. Lo más preferido es aproximadamente 7 milimolar. Cuando el Big CHAP procede de Sigma, se prefiere que la concentración de Big CHAP esté en un intervalo de 15 a 35 milimolar. Más preferido es de 20 a 30 milimolar. Lo más preferido es aproximadamente 25 milimolar.

El compuesto potenciador de la administración de la invención es Syn3, que tiene la Fórmula III que se muestra en la Fig. 21. Syn3 es un análogo sintético de una impureza que se encuentra en las preparaciones comerciales de Big CHAP (*véanse los Ejemplos*). Las impurezas 2 y 3 de Big CHAP son también adecuadas para el uso como compuestos potenciadores de la administración, particularmente cuando se formulan en un tampón de solubilización que contiene, por ejemplo, un detergente tal como Big CHAP.

Para algunas aplicaciones, es deseable usar compuestos potenciadores de la administración que presentan una solubilidad en agua y/o actividad potenciadora de la administración aumentada en comparación con otros compuestos. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen A-tma (Fórmula IV) y A-HCl (Fórmula V) tal como se muestra en la Fig. 21.

La invención proporciona una composición que contiene un agente que se va a administrar a una célula y un compuesto potenciador de la administración, en el que ambos se proporcionan por separado antes de que se mezclen previamente a la administración a un paciente. La concentración del compuesto potenciador de la administración en una formulación dependerá de numerosos factores tales como el compuesto potenciador de la

administración particular que se está usando, el tampón, el pH, el tejido u órgano y el modo de administración. La concentración del compuesto potenciador de la administración estará a menudo en el intervalo de 1% a 50% (v/v), preferiblemente de 10% a 40% (v/v) y lo más preferible de 15% a 30% (v/v). El compuesto potenciador de la administración se usa preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,002 a 2 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,02 a 2 mg/ml, lo más preferible de aproximadamente 0,1 a 1 mg/ml en la composición de la invención.

Los compuestos potenciadores de la administración se formulan normalmente en un disolvente en el que el compuesto sea soluble, aunque son también adecuadas las formulaciones en las cuales el compuesto está solo parcialmente solubilizado. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) es un ejemplo de un agente de solubilización adecuado de estos compuestos, y los expertos en la materia conocen otros. Se reconocerá que pueden ser adecuados algunos excipientes y aditivos adicionales para conseguir las características de solubilidad de estos agentes para diversas formulaciones farmacéuticas. Se pueden añadir, por ejemplo, agentes de solubilización bien conocidos tales como detergentes, ésteres de ácidos grasos, tensioactivos, en concentraciones apropiadas con el fin de facilitar la solubilización de los compuestos en los diversos disolventes que se van a emplear. Cuando la formulación incluye un detergente, la concentración de detergente en la formulación final administrada a un paciente es preferiblemente de aproximadamente 0,5 – 2X la concentración de micelización crítica. Los detergentes adecuados incluyen los relacionados anteriormente. Se pueden determinar la identificación de los detergentes adecuados y las concentraciones apropiadas para su uso tal como se describe en el presente documento.

Un ejemplo de agente de solubilización preferido para el compuesto mencionado como Syn3 y los compuestos relacionados es Tween 80 a una concentración de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,3%, más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,15%. Big CHAP es también un agente de solubilización preferido de Syn3 y los compuestos relacionados.

B. Agentes moduladores

El compuesto potenciador de la administración en la composición de la invención es útil para potenciar la administración de agentes, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, ARN de sentido contrario, pequeñas moléculas, y similares, a células. Por ejemplo, el compuesto potenciador de la administración es útil para administrar agentes a células que son parte de cualquier tejido u órgano, incluyendo aquellos que tienen una membrana epitelial.

Entre estos agentes que son adecuados para administrar usando el compuesto potenciador de la administración están los “agentes moduladores”, que, tal como se usa en el presente documento, se refieren a agentes que pueden modular procesos biológicos. Dichos procesos incluyen, por ejemplo, crecimiento celular, diferenciación, proliferación (que incluye trastornos neoplásicos tales como cáncer), regulación, rutas metabólicas o biosintéticas, expresión génica, y similares. Los agentes moduladores pueden también influenciar, por ejemplo, respuestas inmunes (que incluyen trastornos autoinmunes), infección por patógenos bacterianos y fúngicos, y cualquier otro proceso biológico que sea regulable mediante la introducción de un agente modulador.

Los agentes terapéuticos son un ejemplo de agentes moduladores que se pueden administrar usando agentes potenciadores de la administración. Dichos agentes son útiles para modular procesos celulares que se asocian con enfermedad. El término “agente terapéutico”, tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a proteínas terapéuticas, genes terapéuticos, vectores (vectores plásmidos o víricos) que contienen un gen terapéutico, ácidos nucleicos de sentido contrario, u otras secuencias de ácidos nucleicos terapéuticos (*por ejemplo*, ácidos nucleicos tripletes). Para los objetivos de la presente invención, el término “gen terapéutico”, se refiere a una secuencia de ácido nucleico introducida en una célula para conseguir un efecto terapéutico. Ejemplos de dichos genes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, genes supresores de tumores, genes suicidas, moléculas de ácido nucleico de sentido contrario, moléculas de ácido nucleico que forman tripletes, genes que codifican citocinas (tales como, pero sin limitarse a los interferones α , β , δ , y γ), genes que codifican interleucinas (*por ejemplo*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 e IL-10), y factores estimuladores de colonias tales como GM-CSF. En algunos ejemplos, el gen terapéutico puede estar presente en un virus que se produce naturalmente modificado de manera recombinante.

Un gen suicida es una secuencia de ácido nucleico, la expresión de la cual vuelve a la célula susceptible a morir por factores externos o produce un estado tóxico en la célula. Un ejemplo bien conocido de un gen suicida es el gen de la timidina quinasa (TK) (*véanse, por ejemplo*, Woo y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.631.236, otorgada el 20 de mayo de 1997; Freeman y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.601.818, otorgada el 11 de febrero de 1997) en el cual, las células que expresan el producto del gen TK son susceptibles de morir selectivamente mediante la administración de ganciclovir.

Las moléculas de ácido nucleico de sentido contrario son oligonucleótidos complementarios de cadenas de ácidos nucleicos diseñados para unirse a una secuencia específica de nucleótidos para inhibir la producción de proteínas, incluyendo proteínas que producen enfermedades. Las moléculas de sentido contrario que se unen a oncogenes específicos se usan frecuentemente para inhibir la transcripción de estos agentes que producen cáncer. Se pueden usar estos agentes solos o en combinación con otros genes terapéuticos.

Los ácidos nucleicos que forman tripletes son moléculas diseñadas para inhibir la transcripción de genes,

incluyendo, por ejemplo, genes que producen enfermedades. Generalmente, se consigue esto mediante la unión del ácido nucleico formador de tripletes a la secuencia control de la transcripción del gen diana y evitando la transcripción del gen diana. Los oligonucleótidos formadores de tripletes reconocen y se unen a la hendidura principal del ADN bicatenario en virtud del enlace de hidrógeno de Hoogsteen. Los ejemplos del uso en tecnología de los tripletes incluyen el direccionamiento de los genes del receptor andrógeno o del factor de crecimiento tipo insulina con tecnología de tripletes a células de cáncer de próstata. Bouliskas, T., Anticancer Res. 17(3A): 1471-1505 (1997). Se ha demostrado en algunos ejemplos que los ácidos nucleicos tripletes son mutagénicos y se pueden usar dichas moléculas para inducir respuestas de mecanismos de reparación del ADN endógeno que conducen a una inducción de genes supresores de tumores de una manera terapéutica y pueden contribuir a inestabilidad genómica que induce la apoptosis en la célula diana. Están actualmente bajo investigación una variedad de compuestos nucleicos tripletes y están bien documentados en la bibliografía científica.

“Gen supresor del tumor” se refiere a un gen que codifica un polipéptido que suprime la formación de tumores. Los genes supresores de tumores son genes que se producen naturalmente en células de mamíferos en las que la delección o inactivación de los mismos se cree que es un prerequisite necesario para el desarrollo del tumor. La terapia génica supresora de tumores intenta generalmente reintroducir el gen supresor del tumor en células en las que el gen está ausente o inactivo. Los ejemplos de genes supresores de tumores útiles en la práctica de la presente invención incluyen p53, p110Rb, miembros de la familia INK4 de genes supresores de tumores que incluyen p16 y p21 y sus fragmentos terapéuticamente eficaces tales como p56Rb, p94Tb, etc. En la práctica preferida de la invención, el gen supresor del tumor se selecciona entre el gen Rb y el gen p53 y las secuencias de ácido nucleico que codifican sus variantes funcionales, tales como Rb56. En la práctica más preferida de la invención, el gen supresor del tumor es p53.

En algunas formas de realización, la composición de la invención comprende una cantidad “terapéuticamente eficaz” de un agente terapéutico. “Terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento se refiere a la prevención de, reducción de, o curación de los síntomas asociados con un estado de enfermedad.

Se puede usar también el compuesto potenciador de la administración para facilitar la administración de genes de interés a células, en particular células de órganos y tejidos. Estos genes pueden codificar, por ejemplo, proteínas que son de interés para objetivos comerciales. Como ejemplo, se pueden usar los agentes y formulaciones para administrar a un tejido mamario de un mamífero un gen que codifica una proteína nutricionalmente importante que se secreta a continuación en la leche producida por el mamífero. Otros usos de dichos agentes y formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

El compuesto potenciador de la administración es también útil para administrar agentes diagnósticos a células, órganos y tejidos. Los ejemplos de agentes diagnósticos incluyen genes marcadores que codifican proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula (incluyendo, pero sin limitarse a, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, y similares) y sondas de ácido nucleico marcadas (por ejemplo, sondas radiomarcadas).

C. Vectores para administración génica

En la situación en la que un agente que se va a administrar a una célula es un gen, se puede incorporar el gen a un vector. Los ejemplos de vectores usados para dichos objetivos incluyen plásmidos de expresión capaces de dirigir la expresión del gen de interés en la célula diana. En otros ejemplos, el vector es un sistema de vector vírico en el que el gen de interés se incorpora a un genoma vírico capaz de transfectar la célula diana. Cuando el gen de interés se diseña para la expresión en una célula diana, el gen se puede unir de manera operable a las secuencias de expresión y control que pueden dirigir la expresión del gen en las células hospedadoras dianas deseadas. De esta manera, se puede conseguir la expresión del gen en condiciones apropiadas en la célula diana.

Los sistemas de vectores víricos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, los sistemas de vectores víricos recombinantes o que se producen naturalmente. Dependiendo de la aplicación particular, los vectores víricos adecuados incluyen la replicación competente, la replicación deficiente, y los vectores víricos que se replican condicionalmente. Por ejemplo, se pueden derivar vectores víricos del genoma de adenovirus humanos y bovinos, virus vaccinia, virus del herpes, virus adenoasociados, virus diminuto de ratones (MVM), VIH, virus sindbis, y retrovirus (incluyendo, pero sin limitarse a virus del sarcoma de Rous), y MoMLV. Normalmente, los genes de interés se insertan en dichos vectores para permitir el empaquetamiento de la construcción génica, normalmente con el ADN vírico acompañante, la infección de una célula hospedadora sensible, y la expresión del gen de interés. Un vector vírico recombinante preferido es el sistema de administración del vector adenovírico que tiene una delección del gen de la proteína IX (véase, Solicitud de Patente Internacional WO 95/11984).

“Recombinante” tal como se usa en el presente documento se refiere a los ácidos nucleicos y las proteínas codificadas por ellos en el que los ácidos nucleicos se construyen mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante, denominada también “genomanipulación”.

Se administrarán cantidades terapéuticamente eficaces de la composición farmacéutica que comprende un gen modulador, tal como un gen p53 o un gen supresor del tumor de retinoblastoma, en un sistema de administración de

vector vírico recombinante, de acuerdo con la enseñanza de esta invención. Por ejemplo, las cantidades terapéuticamente eficaces de un gen terapéutico en el sistema de administración de vector adenovírico recombinante formulado en un tampón que contiene un agente potenciador de la administración están en el intervalo de aproximadamente 1×10^8 partículas/ml a 1×10^{12} partículas/ml, más normalmente de aproximadamente 1×10^8 partículas/ml a 5×10^{11} partículas/ml, lo más normalmente de 1×10^9 partículas/ml a 1×10^{11} partículas/ml (PN/ml).

D. Sistemas de administración génica

Tal como se usa en el presente documento, "sistema de administración génica" se refiere a cualquier medio para la administración de un agente a una célula diana. El agente puede estar asociado a un sistema de administración génica que se administra a continuación a la célula usando una formulación que contiene un compuesto potenciador de la administración.

En algunas formas de realización de la invención, se conjugan construcciones génicas u otros agentes a un ligando receptor de una célula para facilitar la captación (por ejemplo, invaginación de depresiones revestidas e internalización del endosoma) a través de un resto enlazante apropiado, tal como un resto enlazante de ADN (Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621-14624 (1988); WO 92/06180). Por ejemplo, se pueden vincular las construcciones génicas a través de un resto polilisina con asialo- α -mucócido, que es un ligando del receptor de la asialoglucoproteína de los hepatocitos.

Similarmente, se pueden modificar las envolturas víricas usadas para empaquetar las construcciones génicas mediante la adición de los ligandos receptores o anticuerpos específicos de un receptor para permitir la endocitosis mediada por receptor en células específicas (véanse, por ejemplo, documentos WO 93/20221, WO 93/14188, WO 94/06923). Las construcciones de ADN de la invención se pueden unir a proteínas víricas, tales como partículas de adenovirus, para facilitar la endocitosis (Curiel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 8850-8854 (1991)). En otras formas de realización, los conjugados moleculares de la presente invención pueden incluir inhibidores de los microtúbulos (documento WO/9406922); péptidos sintéticos que imitan la hemaglutinina del virus de la gripe (Plank y col., J. Biol. Chem. 269: 12918-12924 (1994)); y señales de localización nuclear tales como el antígeno T de SV40 (documento WO93/19768).

El agente modulador puede ser un ácido nucleico de sentido contrario. Se puede proporcionar el ácido nucleico de sentido contrario en forma de un oligonucleótido de sentido contrario (véase, por ejemplo Murayama y col., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:109-114 (1997)). Se pueden proporcionar también los genes que codifica un ácido nucleico de sentido contrario; se pueden formular dichos genes con un compuesto potenciador de la administración e introducir en células mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede introducir un gen que codifica un ácido nucleico de sentido contrario en un vector vírico tal como, por ejemplo, en el virus de la hepatitis B (véase, por ejemplo, Ji y col., J. Viral Hepat. 4: 167-173 (1997)); en el virus adenoasociado (véase, por ejemplo, Xiao y col., Brain Res. 756: 76-83 (1997)); o en otros sistemas que incluyen, pero no se limitan a, un sistema de administración génica liposoma-HVJ (virus Sendai) (véase, por ejemplo, Kaneda y col., Ann. N. Y Acad. Sci. 811: 299-308 (1997)); un "vector peptídico" (véase, por ejemplo, Vidal y col., CR Acad. Sci III 32: 279-287 (1997)); como un gen en un vector episómico o plásmido (véase, por ejemplo, Cooper y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 6450-6455 (1997), Yew y col. Hum Gene Ther. 8: 575-584 (1997)); como un gen en un agregado de péptido-ADN (véase, por ejemplo, Niidome y col., J. Biol. Chem. 272: 15307-15312 (1997)); como "ADN puro" (véanse, por ejemplo, documento U.S. 5.580.859 y documento U.S. 5.589.466); en sistemas de vectores lipídicos (véase por ejemplo, Lee y col., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 14: 173-206 (1997)); liposomas recubiertos de polímeros (Marin y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.213.804, otorgada el 25 de mayo de 1993; Woodle y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.013.556, otorgada el 7 de mayo de 1991); liposomas catiónicos (Epand y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.283.185, otorgada el 1 de febrero de 1994; Jessee, J.A., Patente de los Estados Unidos Nº 5.578.475, otorgada el 26 de noviembre de 1996; Rose y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.279.833, otorgada el 18 de enero de 1994; Gebeyehu y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.334.761, otorgada el 2 de agosto de 1994); microesferas rellenas de gas (Unger y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.542.935, otorgada el 6 de agosto de 1996), macromoléculas encapsuladas dirigidas a ligando (Low y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.108.921, otorgada el 28 de abril de 1992; Curiel y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.521.291, otorgada el 28 de mayo de 1996; Groman y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.554.386, otorgada el 10 de septiembre de 1996; Wu y col., patente de los Estados Unidos Nº 5.166.320, otorgada el 24 de noviembre de 1992).

E. Formulaciones farmacéuticas

Cuando se usa para objetivos farmacéuticos, esta composición de la invención incluye un tampón. El tampón puede ser cualquier tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato o fosfato de sodio/sulfato de sodio, tampón Tris, tampón glicina, agua estéril, y otros tampones conocidos del técnico normalmente experto en la materia tales como los descritos por Good y col. (1966) Biochemistry 5: 467. El pH del tampón en la composición farmacéutica que comprende un gen modulador contenido en un sistema de administración de vector adenovírico, por ejemplo, está normalmente en el intervalo de 6,4 a 8,4, preferiblemente de

7 a 7,5, y lo más preferible de 7,2 a 7,4.

La composición de esta invención puede incluir adicionalmente un estabilizador, potenciador u otros vehículos o portadores farmacéuticamente aceptables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, para estabilizar el sistema de administración de vector adenovírico recombinante que comprende el gen supresor del tumor. Un compuesto fisiológicamente aceptable puede incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsificantes, agentes dispersantes o conservantes, que son particularmente útiles para evitar el crecimiento o la acción de microorganismos. Se conocen bien diversos conservantes e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la técnica sabría que la elección del vehículo farmacéuticamente aceptable depende de la ruta de administración y de las características fisicoquímicas particulares del sistema de administración de vector adenovírico recombinante, y del gen supresor del tumor particular contenido en el anterior. Se pueden encontrar ejemplos de vehículos, estabilizantes o adyuvantes en Martin, Remington's Pharm. Sci., 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton, PA 1975).

F. Administración de formulaciones

De acuerdo con la invención, el compuesto potenciador de la administración y el agente modulador se proporcionan por separado antes de que se mezclen previamente a la administración a un paciente. Se puede administrar el compuesto potenciador de la administración antes que el agente modulador o de manera simultánea con el agente modulador. En algunas formas de realización, la formulación del compuesto potenciador de la administración se puede mezclar con el agente modulador exactamente antes de la administración al paciente.

Se puede administrar el compuesto potenciador de la administración previamente a la administración del sistema de administración de vector adenovírico recombinante que contiene el gen supresor del tumor. La administración previa del compuesto potenciador de la administración puede estar en el intervalo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora, preferiblemente de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos, y lo más preferible de aproximadamente 1 minuto a 5 minutos antes de la administración del sistema de administración del vector adenovírico que contiene el gen supresor del tumor.

El agente modulador formulado en un tampón se puede administrar a cualquier tejido u órgano, incluyendo tejidos neoplásicos tales como tejido canceroso, usando cualquier procedimiento de administración conocido por el técnico normalmente experto, por ejemplo, la administración intratumoral o intravesical. Los tejidos y órganos incluyen cualquier tejido u órgano que tenga una membrana epitelial tal como el tracto gastrointestinal, la vejiga, el tracto respiratorio, y el pulmón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de vejiga y tracto respiratorio superior, de vulva, de cuello del útero, de vagina o de bronquios; tumores metastásicos locales del peritoneo; carcinoma bronquioalveolar; carcinoma metastásico pleural; carcinoma de la boca y de las amígdalas; carcinoma de la nasofaringe, de nariz, de laringe, de esófago, de estómago, de colon y recto, de la vesícula biliar, o de la piel; o melanoma.

En algunas formas de realización de la invención, se formula el agente terapéutico en formulaciones mucosales, tópicas, y/o bucales, particularmente, formulaciones de gel mucoadhesivo y gel tópico. Se dan a conocer composiciones potenciadoras de la permeación a modo de ejemplo, matrices poliméricas, y preparaciones de geles mucoadhesivos para la administración transdérmica en el documento US 5.346.701. Dichas formulaciones son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres de la boca, cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres del epitelio traqueobronquial), cánceres de piel (por ejemplo, melanoma, carcinomas de células basales y escamosas), cánceres de la mucosa intestinal, mucosa vaginal, y cáncer cervical.

En algunas formas de realización de la invención, se formula un agente terapéutico en formulaciones oftálmicas para la administración al ojo. Dichas formulaciones son útiles en la administración del gen del retinoblastoma (RB) al ojo, opcionalmente, en conjunción con la administración de p53.

G. Procedimientos de tratamiento

Las formulaciones de la invención se administran normalmente para potenciar la transferencia de un agente a una célula. Se puede proporcionar la célula como parte de un tejido, tal como una membrana epitelial, o como una célula aislada, tal como en cultivo de tejido. Se puede proporcionar la célula *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

Las formulaciones que contienen los compuestos potenciadores de la administración y los agentes moduladores se pueden introducir en el tejido de interés *in vivo* o *ex vivo* mediante una variedad de procedimientos. Se puede introducir el agente modulador a las células mediante dichos procedimientos como microinyección, precipitación con fosfato de calcio, fusión de liposomas, o biolísticos. El agente terapéutico puede capturarse directamente por el tejido de interés.

Se pueden administrar las composiciones de la invención *ex vivo* a células o tejidos explantados de un paciente, y a continuación devueltos al paciente. Ejemplos de administración *ex vivo* de construcciones génicas terapéuticas

incluyen Arteaga y col., Cancer Research 56(5): 1098-1103 (1996); Nolte y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA 93(6): 2414-9 (1996); Koc y col., Seminars in Oncology 23 (1): 46-65 (1996); Raper y col., Annals of Surgery 223(2): 116-26 (1996); Dalesandro y col., J Thorac. Cardi. Surg., 11(2): 416-22 (1996); y Makarov y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1): 402-6 (1996).

5 **EJEMPLOS**

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención. Algunos de los ejemplos se proporcionan a efectos comparativos. En siguientes ejemplos, "g" significa gramos, "ml" significa mililitros, "mol" significa moles, "°C" significa grados centígrados, "min." significa minutos, "DMF" es dimetilformamida, y "PN" indica número de partículas. Todas las temperaturas están en grados centígrados, salvo que se indique otra cosa.

10 **Ejemplo 1**

El etanol potencia la transferencia de genes en la vejiga

Los experimentos iniciales habían mostrado que algunos factores incluyendo la concentración de virus, hora de administración, y volumen de dosificación pueden afectar la transferencia de genes en el epitelio de la vejiga tras dosificación intravesical a ratas. Puesto que se puede conseguir una penetración incrementada de los colorantes mediante dosificación intravesical en diferentes disolventes, también se investigó la modificación de la formulación de adenovirus como estrategia alternativa para aumentar la expresión transgénica del adenovirus en la vejiga (Monson y col., Urology 145:842-845 (1991)). Los experimentos presentes se centran en el uso del etanol para aumentar la expresión transgénica del adenovirus en la vejiga.

Nueve hembras de ratas búfalo (Harlan Sprague Dawley) se anestesiaron con isoflurano y recibieron una sola administración intravesical de un adenovirus recombinante humano que codificaba el gen *lacZ* (rAd-βgal). El vector adenovirico recombinante humano que comprendía el gen *lacZ* (rAd-βgal) se ha descrito en Wills y col., Human Gene Therapy 5: 1079-1088 (1994). Antes de la instilación, las vejigas se lavaron con PBS y se vaciaron. A continuación se diluyó rAd-βgal para alcanzar una concentración final de $1,7 \times 10^{11}$ PN/ml en 1) VPBS (2 % (p/v) de sacarosa y MgCl 2 mM, en PBS), 2) 30 % (v/v) de etanol, o 3) 50 % (v/v) de DMSO, y se instiló en un volumen de 250 µl (N=3 animales/grupo). El material administrado fue retenido en la vejiga durante 45 minutos. A continuación la vejiga se lavó con PBS, y se permitió que los animales se recuperaran del procedimiento. Dos días tras la administración, las ratas se sacrificaron, se cosecharon las vejigas, se fijaron, y los órganos completos se tiñeron con una disolución de Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) para evaluar la transferencia de gen indicador. Los tejidos teñidos con Xgal seguidamente se incluyeron en parafina se recortaron, y se contratiñeron con hematoxilina y eosina. La hidrólisis de Xgal por la β-galactosidasa dio como resultado un color azul localizado en el epitelio superficial luminal de la vejiga.

La expresión del transgén, posterior a la administración con el vector adenovirico, se detectó en las vejigas procedentes de todos los animales tratados con rAd-βgal pero no en el control sin tratamiento. La expresión transgénica fue similar a los resultados anteriormente publicados usando la formulación de PBS/sacarosa (Bass y col., Cancer Gene Therapy 2:2:97-104 (1995)). En fuerte contraste, la expresión de la β- galactosidasa en la superficie luminal epitelial resultó fuertemente potenciada en los animales que recibieron rAd-βgal diluido en etanol al 30% (Figura 1). Los especímenes de vejiga descritos en la Figura 1 se incluyeron, se recortaron, y se contratiñeron con hematoxilina y eosina. La evaluación histológica del tejido de la vejiga demostró un aumento en la expresión de β-galactosidasa en el epitelio transicional de la vejiga al añadir el etanol a la formulación de adenovirus (Figura 2). La interacción del etanol con la capa protectora de glicosaminoglicano (GAG) de la superficie del epitelio proporciona un mecanismo para el aumento observado de la expresión transgénica. La perturbación de esta capa puede facilitar la interacción virus-célula en la superficie y posiblemente potenciar la penetración en la submucosa.

Ejemplo 2

Expresión transgénica dependiente de la dosis en la vejiga de rata

En otro experimento, 18 hembras de rata Sprague-Dawley se anestesiaron con isoflurano y recibieron un único bolo intravesical de 0,5 ml de rAd-βgal a concentraciones de 2×10^7 , 2×10^8 , 2×10^9 , 2×10^{10} , y 2×10^{11} PN/ml en un formulación de etanol al 22,5% (v/v). Tras una incubación de 45 minutos, las vejigas se lavaron con PBS, y se permitió que los animales se recuperaran de la anestesia. Dos días después, los animales se sacrificaron, y se cosecharon las vejigas, se fijaron, y los órganos completos se tiñeron con disolución de Xgal para evaluar la expresión transgénica del adenovirus. La expresión de β-galactosidasa en el epitelio luminal de la vejiga se correlacionó con la concentración del adenovirus recombinante administrado (Figura 3). No se observaron diferencias importantes entre los animales que recibieron 2×10^{10} o 2×10^{11} PN/ml, sugiriendo una saturación de la expresión transgénica en este modelo. El análisis del volumen vaciado tras la instilación indicó solo una mínima reducción en los títulos infecciosos del material de dosificación a estas dosis elevadas. La expresión de β-galactosidasa disminuyó a las concentraciones inferiores. No se detectaron evidencias de expresión de β-galactosidasa en los animales dosificados con una concentración de 1×10^7 PN/ml o en un animal de control no tratado.

Ejemplo 3**Transferencia del gen ACNRB en la vejiga de ratón**

Se llevó a cabo un estudio piloto para evaluar específicamente la expresión del transgén RB mediante un ensayo RT-PCR.

5 El adenovirus recombinante utilizado en este estudio estaba basado en el adenovirus humano tipo 5 del que se había borrado la región vírica temprana 1 que codifica las proteínas E1a, E1b, y pIX. Este adenovirus está limitado a la propagación en células 293 que producen los productos génicos Ad5 de E1 necesarios para la replicación. Los plásmidos transferidos que codifican el Rb tanto de longitud completa como truncados se generaron a partir de pACN (Wills y col., Cancer Gene Therapy 2:191-197 (1995)) y, a su vez, se usaron para construir los adenovirus recombinantes. Se utilizó tanto un ADNc de RB de longitud completa (1-928 aminoácidos), subclonado como un fragmento Xba I - Bam HI de 2,8 Kb Xba procedentes de los plásmidos pETRbc (Huang y col., Nature 350:160-162 (1991) o un fragmento truncado (aminoácidos 381-928), subclonado como un fragmento Xba I - Bam HI de 1,7 KB de un ADNc, se ubicó en dirección 3' del promotor/potenciador CMV y el ADNc del líder tripartito Ad 2 del plásmido pACN. Estos plásmidos se linealizaron posteriormente con Eco RI y se transfectaron simultáneamente (CaPO₄, Stratagene) bien con el fragmento digerido grande de Cla I aislado de H5ilE4 (Hemstrom y col., J. Virol. 62:3258-3264 (1988)), para preparar el Ad-RB56 (ACN56) que contenía la delección parcial de E4, o con el fragmento grande procedente de un virus híbrido de d1327 (Ginsberg y col. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3823-3827 (1989)) y de H5ilE4 para crear Ad-Rb110 (ACNRB) que contiene delecciones en ambas regiones E3 y E4 del vector.

20 Ocho ratones hembra ICR (Charles River Laboratories) se anestesiaron con avertine y recibieron cada uno una única administración intravesical de 80 µl de ACNRB. El ACNRB (4x10¹¹ PN/ml) se diluyó y preparó en una disolución de PBS o una disolución de etanol al 30% (v/v). Una vez el virus quedó retenido en la vejiga durante 45 minutos, se permitió que los animales se recuperaran y se vaciaron. Los ratones se sacrificaron de 2 a 14 días tras la administración de ACNRB, y las vejigas, hígados, y riñones de cada animal se cosecharon, se homogenizaron, y procesaron para análisis (N=2 animales/grupo). Se determinó la expresión transgénica mediante RT-PCR con un cebador específico de ACNRB. Más específicamente, se generaron cebadores para identificar el ACNRB y amplificar la región del extremo 3' de la secuencia del CMV y del extremo 5' de la secuencia de RB. Tras la amplificación (30 ciclos) los productos de la RT-PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron. Se determinó el aumento en la expresión de ACNRB tras el tratamiento con ACNRB en etanol al 30% (v/v) en comparación con la muy baja expresión tras el tratamiento con ACNRB en VPBS. Los controles positivos del ensayo incluyeron muestras de células 5637 de cáncer de vejiga infectadas con ACNRB (CONTROL). Las muestras de ARN de las vejigas procedentes de animales infectados con ACNRB que se amplificaron con cebadores específicos de la beta-actina proporcionaron un control interno de la calidad del ARN. Las muestras no tratadas y las muestras de vejiga sin la transcriptasa inversa (RT) proporcionaron los controles del ADN contaminante. Dos días tras la administración, se detectaron niveles de la expresión de ACNRB en los homogenados de vejiga procedentes de animales que recibieron ACNRB preparado en etanol al 30% (Figura 4). No se detectó evidencia de expresión en tejido no de vejiga ni en ninguna muestra recogida 14 días tras la administración.

Ejemplo 4**Cinética de biodistribución y expresión de ACNRB tras administración intravesical a ratones**

40 Para investigar el curso temporal de la expresión tras la administración intravesical, 40 ratones hembra (Charles River Laboratories) se anestesiaron con avertine y recibieron un único bolo de 80 µl de ACNRB (4x10¹⁰ PN/ml en etanol al 22% (v/v). El material instilado fue retenido en la vejiga durante aproximadamente 45 minutos, y se permitió que los animales se recuperaran del procedimiento. Los ratones se sacrificaron en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 14 tras la administración (N=4/vez) para su análisis. Las vejigas, hígados, y riñones se cosecharon y se congelaron en nitrógeno líquido para análisis posterior. Para la detección de la expresión de ACNRB, las muestras de tejidos se homogenizaron, y se extrajo el ARN total mediante TRI-Reagent⁷. Se amplificó una alícuota de ARN total en un ensayo RT-PCR utilizando cebadores específicos de ACNRB para distinguir entre la expresión transgénica de la expresión endógena de RB. Para la detección del ADN de ACNRB, se utilizó un kit de extracción de ADN (Stratagene) sobre los homogenados de tejidos. Se llevó a cabo la PCR con los cebadores específicos de ACNRB, como se ha descrito anteriormente para el análisis mediante RT-PCR.

La expresión transgénica de ACNRB en los homogenados de vejiga se detectó solamente en las muestras recogidas en los días 1-6, observándose que la expresión relativa al p53 endógeno disminuía con el tiempo (Figura 5, panel superior). No se detectó expresión en las muestras recogidas 7 y 14 días tras la administración. De forma interesante, se detectó algo de expresión de ACNRB en los riñones en los días 1, 2 y 3, pero no se observó expresión en el hígado (Figura 5, paneles inferiores).

Se detectó el ADN de ACNRB en tejido de la vejiga de todos los animales dosificados con ACNRB, incluyendo los cosechados 14 días después de la administración (Figura 6, (panel izquierdo)). También se recuperó ADN de los homogenados de riñón, consistente con la expresión de ACNRB detectada en este tejido (Figura 6, panel derecho).

No se detectó evidencia del ADN de ACNRB en muestras de hígado cosechadas durante el estudio (no se muestran los datos). Las muestras procedentes del ADN de ACNRB de un animal no tratado (U) y purificado (PC) se utilizaron como control negativo y 25 controles positivos, respectivamente.

Debido a que la administración sistémica de adenovirus recombinante produjo en primer lugar la expresión transgénica en el hígado (Li y col., Human Gene Therapy 4:403-409 (1993)), la ausencia de ADN de ACNRB y la expresión en muestras de hígado (Figura 5 y Figura 6) sugiere una exposición sistémica despreciable del ACNRB tras administración intravesical. El flujo retrógrado desde los uréteres puede haber contribuido a la detección de ACNRB en el riñón.

Los datos anteriormente presentados demuestran expresión transgénica en la vejiga de roedores tras administración intravesical de ACNRB. Estos estudios indican además que la transferencia de genes mediada por adenovirus en el epitelio de la vejiga se puede potenciar por la presencia de un agente potenciador de la administración, tal como etanol, en la formulación. Un mecanismo del aumento de la transferencia de genes puede ser la perturbación de la capa protectora de glicosaminoglicano en la superficie epitelial de la vejiga. Una única administración intravesical de ACNRB en una formulación de etanol 20-30% (v/v) da como resultado una expresión transgénica en la vejiga que dura aproximadamente una semana. El flujo retrógrado desde los uréteres proporciona una probable explicación de la expresión transitoria de ACNRB detectada en el riñón. La ausencia de expresión de ACNRB y de ADN de ACNRB en el hígado indica la exposición sistémica despreciable del ACNRB tras administración intravesical.

Ejemplo 5

Uso de formulaciones detergentes

Se estudiaron otros excipientes con vistas a minimizar los efectos secundarios sin perder eficacia en la transferencia de genes. Se sabe que los detergentes interactúan con las membranas celulares y forman grandes poros sin dañar adicionalmente las células. Se estudió la eficacia de los adenovirus recombinantes formulados en los detergentes menos tóxicos en modelos de transferencia de genes en ratas y ratones.

Se formuló rAd-βgal en diferentes detergentes a su concentración de micelación crítica para evaluar la eficacia de la transferencia de genes en el epitelio de la vejiga. Ratas hembra (de aproximadamente 200g b/w, Harlan Sprague Dawley) se anestesiaron con isoflurano y recibieron una sola administración intravesical de rAd-βgal (1×10^{11} PN/ml) en distintas formulaciones de detergentes (ver la Tabla I). Antes de la instilación, las vejigas se lavaron con PBS y se vaciaron después. A continuación se instiló rAd-βgal en un volumen de 0,5ml. La disolución instilada fue retenida en la vejiga durante 45 minutos. A continuación las vejigas se lavaron con PBS, y se permitió que los animales se recuperaran del procedimiento. 48 horas después de la administración, las ratas se sacrificaron, se cosecharon las vejigas, y se fijaron en formol. Tras la fijación, las vejigas se abrieron longitudinalmente de forma que se expuso el urotelio al cromógeno (Xgal), que se convirtió en color azul, si está presente la expresión del gen de la β-galactosidasa. La superficie epitelial luminal de toda la vejiga se fotografió y se puntuó la tinción de color azul: + (tinción mínima), ++ (tinción moderada), +++ tinción intensa que cubría la totalidad de la superficie epitelial de la vejiga. Los resultados se muestran en la Tabla I. Algunos de los detergentes aniónicos (taurodesoxicolato), detergentes de ión híbrido (CHAPS, ZWITTERGENT7, y detergentes no iónicos (Big CHAP (CALBIOCHEM7), TRITON7 X -100) potenciaron enormemente la transferencia de gen. Los detergentes catiónicos y algunos detergentes no iónicos (PLURONIC7 F68, TWEEN7), no tuvieron efectos similares. Las mejoran en la transferencia de gen a menudo van acompañadas de cistitis. Los detergentes de ión híbrido facilitaron la formación de cálculos vesiculares.

Se evaluaron posibles manifestaciones de cistitis según se observó con etanol en ratones usando una formulación Big CHAP 7 mM (CALBIOCHEM7) (2X CMC) o TRITON7-X-100 (CMC) 0,05 mM. Las formulaciones se administraron intravesicalmente en un volumen de 80ul, y los animales se observaron durante un intervalo de 7 días. Tras el sacrificio, las vejigas se incluyeron en parafina, se recortaron, y se tiñeron con hematoxilina y eosina para examen patológico. Solo se observó una pequeña infiltración de macrófagos en el tejido de la vesícula en los ratones tratados con Big CHAP (CALBIOCHEM7). Los macrófagos se infiltraron de forma más prominente (ligera a suave) mediante el detergente TRITON7-X-100. En fuerte contraste, se detectó una cistitis significativa en los animales tratados con etanol al 22%.

Ejemplo 6

Transferencia del gen de ACNRB

Además de los experimentos con el gen indicador, se llevó a cabo un conjunto de estudios deferente para evaluar específicamente la transferencia génica del ACNRB. Ratones hembra ICR se anestesiaron con avertine y cada ratón recibió una sola administración intravesical de 80 μl de ACNRB. ACNRB (4×10^{10} PN/ml) se formuló en VPBS, 22 % (v/v) de etanol, o Big CHAP 3 mM (CALBIOCHEM7). Una vez el virus quedó retenido en la vejiga durante 45 minutos, se permitió que los animales se recuperaran. Los ratones se sacrificaron 48 horas tras la administración de ACNRB, y las vejigas se congelaron en nitrógeno líquido. Se determinó la expresión transgénica mediante RT-PCR. Los tejidos se lavaron en agua exenta de RNAsa, se homogenizaron, se digirieron con Tri-Reagent (Molecular

Research Center), y se extrajo el ARN celular total. El ACNRB se sondeó con un cebador 5' ubicado en la región CMV del vector ACNRB, y un cebador 3' ubicado en el extremo 5' del genoma de Rb. Se llevó a cabo la RT-PCR en un sistema Perkin Elmer 9600 GeneAmp PCR. Las condiciones de ciclación fueron 10 min a 65°C, 8 min a 50°C, 5 min a 95°C. Se realizaron 32 ciclos de PCR, compuesto cada ciclo por 30 s a 94°C, 30 s a 58°C, y 30 s a 72°C. El 32^o ciclo incluyó una etapa de elongación de 10 min a 72°C para asegurar la extensión completa de los fragmentos incompletos de ADN. Las bandas ACNRB- ARN se tiñeron con bromuro de etidio. Los resultados, expresión potenciada usando una formulación de etanol o Big CHAP (CALBIOCHEM7), se muestran en la Figura 9.

Ejemplo 7

Big CHAP (CALBIOCHEM7) potencia la expresión transgénica con una cistitis mínima.

Como Big CHAP (CALBIOCHEM7) potencia la transferencia génica con una cistitis mínima, se eligió esta formulación para evaluación adicional, incluyendo la concentración y la dependencia de la dosis en estudios similares a los anteriormente descritos. Brevemente, se administró rAd-βgal (1x10¹¹ PN/ml) en vejigas de ratas hembras anestesiadas mediante un catéter intravesical. rAd-βgal se formuló en diferentes concentraciones de Big CHAP (CALBIOCHEM7). Se inyectó un volumen de 0,5 ml y permaneció instilado en la vejiga durante 45 minutos. Los animales se sacrificaron 48 horas después, la vejiga se fijó en formol al 4%/glutaraldehído, se abrieron longitudinalmente, y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa usando el sustrato Xgal. La intensidad de la tinción de color azul se correlaciona con la expresión transgénica βgal-t. La Figura 7 muestra la superficie epitelial de las vejigas teñidas con Xgal. Los resultados indican un aumento dependiente de la concentración de la transferencia génica al epitelio. Las concentraciones de Big CHAP (CALBIOCHEM7) 3,5-7mM mejoraron significativamente la transferencia génica. La formulación sola (Figura 7, panel inferior) no indujo color azul procedente del sustrato Xgal. Una concentración superior (17,5) mM no mejoró notablemente la transferencia o la expresión génica, pero indujo cistitis en algunos de los animales ensayados.

Excipiente	Carga del detergente	Dosis (mM)	Expresión génica en el epitelio de vejiga	Patología, en grueso	Estabilidad
Taurocolato	aniónico	6	+	ninguna	ND
Desoxicolato	aniónico	5	+	Cistitis	ND
Taurodesoxicolato	aniónico	6	+++	Cistitis	+
Cetilpiridinio	catiónico	0,9	+	ninguna	-
Cloruro de benzalconio	catiónico	0,5%	<+	ninguna	-
Zwittergent7 3-14	ión híbrido	4	+++	formación de cálculos	ND
Chaps	ión híbrido	7	+++	formación de cálculos	+
Big CHAP (CALBIOCHEM7)	no iónico	3,5	+++	ninguna	+
Deoxi Big CHAP (CALBIOCHEM7)	no iónico	1,5	+++	Cistitis	ND
Tritón X-100	no iónico	0,05	+++	ninguna	+
C12E8	no iónico	4	++	ninguna	ND
Octil-β-D-Glucopiranosido Pluronic F68	no iónico	10	++	ninguna	ND
Pluronic F68	no iónico	0,04	+	ninguna	+
Tween 20	no iónico	2	+	ninguna	+
Tween 80	no iónico	0,02	+	ninguna	ND
Tween 80	no iónico	2	+	ninguna	+

También se probaron concentraciones más elevadas de adenovirus recombinante. Se administraron a ratas hembra anestesiadas distintas concentraciones de βgal, formuladas en Big CHAP (CALBIOCHEM7) 7 mM, en la vejiga

mediante un catéter intravesical. Los animales se sacrificaron 48 horas después, la vejiga se fijó en formol al 4%/glutaraldehído, se abrieron longitudinalmente y se tiñeron con Xgal. La Figura 8 muestra un aumento dependiente de la concentración de la transferencia génica al epitelio. Una concentración de $1,3 \times 10^{11}$ PN/ml indujo la máxima transferencia génica. Una concentración mayor ($6,5 \times 10^{11}$ PN/ml) no mejoró notablemente la tinción de color azul. A bajas concentraciones de rAd- β gal, $1,3 \times 10^{10}$ PN/ml, o $1,3 \times 10^{10}$ PN/ml, la expresión transgénica se redujo de forma dependiente de la dosis. Cuando se compararon las formulaciones a 3,5 mM y 7 mM, la expresión de β -galactosidasa fue similar, aunque el efecto potenciado apareció de forma más reproducible en los animales tratados con la formulación Big CHAP (CALBIOCHEM7) 7 mM.

Ejemplo 8

Expresión transgénica en tumores con una formulación Big CHAP (CALBIOCHEM7)

Como las investigaciones iniciales se centraron en animales que tenían intacto el epitelio de la vejiga, también se estudió la transferencia de genes mediada por adenovirus en un modelo animal de carcinoma de células transicionales. Se indujeron tumores en ratas Fisher macho por adición de BBN (N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina) al 0,05% en el agua de bebida durante seis meses. rAd- β gal (1×10^{11} PN/ml), formulado en Big CHAP 4 mM (CALBIOCHEM7) o VPBS se instiló en la vejiga durante 45 minutos por inyección directa. La expresión de β -gal se evaluó 48 h después del tratamiento. Consistente con los anteriores experimentos con animales que no tenían tumores, se mejoró la transferencia génica al tejido tumoral con la formulación Big CHAP (CALBIOCHEM7) en comparación con la formulación VPBS (Figura 10).

La transferencia génica del rAd que transportaba el gen p53 (rAd-p53) (Wills et al., Human Gene Therapy 5:1079-1088 (1994)) también se ensayó en este modelo animal de cáncer de vesícula. Brevemente, los tumores de vejiga se indujeron en ratas Fisher (Charles River) hembra por adición de BBN (N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina) al 0,05% en el agua de bebida durante tres meses. Se formuló rAd-p53 (1×10^{11} PN/ml) en Big CHAP 7 mM (CALBIOCHEM7). Bajo anestesia de isoflurano, se insertó un catéter (24G) en la vejiga para la administración. El rAd-p53 se instiló en la vejiga durante 45 minutos. Seguidamente se permitió que los animales se recuperaran de la anestesia. Veinticuatro horas después, los animales se sacrificaron, y la vejiga se fijó en formol. Tras inclusión en parafina y recortado, se ensayó la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica utilizando el kit p53ES (Oncogene) usando AEC (AEC-kit, Vector Labs) como sustrato. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina. La Figura 12 muestra la expresión del gen p53 en el área superficial del epitelio proliferativo (panel izquierdo) y la tinción nuclear de la expresión de p53 a gran aumento (panel derecho). No se detectó tinción en tejido tumoral procedente de animales no tratados.

Ejemplo 9

Big CHAP (CALBIOCHEM7) potencia la expresión transgénica en urotelio de cerdo

Para simular los volúmenes esperados para la investigación clínica, se ensayó la formulación Big CHAP 7 mM (CALBIOCHEM7) en un modelo de adulto crónicamente cateterizado en colaboración con SPRI Drug Safety and Metabolism. Se formuló rAd-p53 (1×10^{11} PN/ml) en VPBS o Big CHAP 7 mM (CALBIOCHEM7). Se inyectó un volumen de 50 ml mediante el catéter insertado en la vejiga de animales conscientes. El material instilado fue retenido durante 2 h. Los animales se sacrificaron 48 h después, y se cosechó la sección central de la vejiga y se tiñó para la expresión de β -galactosidasa. Se observó un aumento en la intensidad de la expresión génica en el cerdo tratado con Big CHAP 7 mM (CALBIOCHEM7) comparado con el cerdo tratado con VPBS (Figura 11). La evaluación histológica demostró transducción de varias capas de epitelio con Big CHAP (CALBIOCHEM7) (panel izquierdo), pero solo transducción superficial con el tampón VPBS (panel derecho).

Ejemplo 10

Transferencia génica en el epitelio intestinal de ratas

Se utilizó una ligera modificación del procedimiento de Sandberg y col. (Human Gene Therapy 5:323-329 (1994)) para preparar segmentos ileales de rata para estudios de transferencia de genes. Brevemente, hembras de rata Sprague-Dawley se anestesiaron con isoflurano. La cavidad abdominal se abrió y se aisló un segmento ileal rostral de última placa de Peyer. El segmento (de aproximadamente 3 cm) se limpió cuidadosamente de restos de alimento y ambos extremos se cerraron con pinzas vasculares atraumáticas. rAd- β gal (1×10^{11} PN/ml), 0,5 ml de volumen, se inyectó directamente en el segmento con una aguja 24 G y se dejó incubar durante 45 minutos. rAd- β gal se formuló en ácido taurodeoxicólico 10 mM (en agua destilada, filtrada a esterilidad) (Grupo de tratamiento 1) o VPBS (Grupo de tratamiento 2). Un tercer grupo de tratamiento comprendía animales tratados con ácido taurodeoxicólico 10 mM. Posteriormente, se retiraron las pinzas y se ancló una sutura suelta de seda en ambos extremos para reconocimiento en el momento de la necropsia. La incisión abdominal se cerró y se permitió que los animales se recuperaran en sus jaulas. Los animales se sacrificaron 48 h después. El segmento infectado y el segmento de control se cosecharon en fijador para tinción completa de los órganos con Xgal.

Los resultados se muestran en la Figura 13. La extensión de la tinción de color azul Xgal demostró evidencia de la expresión transgénica en las secciones ilíacas. La potenciación de la transferencia génica fue evidente en la

formulación de detergente (panel intermedio).

Ejemplo 11

Efecto de las impurezas de BIG CHAP sobre la transferencia génica.

1. Introducción

- 5 Se ensayaron fuentes alternativas comerciales de Big CHAP (BC) para mostrar la capacidad de potenciar la transferencia y expresión génica mediadas por rAd (adenovirus recombinante), esencialmente de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito en el Ejemplo 8. Se determinó que el BC más "puro" BC - Sigma (98% de pureza; Sigma Catalog: Biochemicals and Reagents for Life Science Research, 1997, página 182, nº B 9518) a una concentración de 6 mg/ml no mejoró de forma importante la transferencia génica mediada por rAd (Figura 14, fila superior). Por el contrario, el BC (CALBIOCHEM7; CALBIOCHEM7 Biochemical & Immunochemical Catalog 1996/97, página 43, nº200965, 95% de pureza), potenció sustancialmente la transferencia y expresión génica a la misma concentración (Figura 14, fila inferior).

15 Los BC de CALBIOCHEM7 y Sigma se analizaron posteriormente mediante TLC y se purificaron por cromatografía en columna. Los BC purificados y las impurezas aisladas se ensayaron para determinar su capacidad para potenciar la transferencia y expresión génica mediadas por rAd en el epitelio de la vejiga.

Como se discute a continuación con más detalle, se aislaron tres impurezas de los BC. Dos de las impurezas demostraron la mejora de la transferencia y expresión génica mediadas por rAd. Además del BC comercial, se prefieren ambas impurezas para el tampón de formulación para rAd para potenciar la administración génica local.

2. Análisis de Big CHAP mediante cromatografía en capa fina:

- 20 El BC (Sigma o CALBIOCHEM7) se disolvió en metanol/agua, 3/1, y se llevó a cabo la CCF sobre gel de sílice 60, 0,25 mm (EM Industries); la fase móvil estaba compuesta por:

1-Butanol/agua/ácido acético glacial, 6/2.5/1.5. Los cromatogramas se visualizaron con 0,5g de timol en ácido sulfúrico/etanol, 5/95, y se calentaron. Como se muestra en la Figura 15, solo se desarrolló una banda distintiva desde la muestra de BC - Sigma (B), mientras que aparecieron tres bandas adicionales en la muestra de BC-CALBIOCHEM7 (A).

25 Las impurezas de BC (CALBIOCHEM7) se aislaron adicionalmente mediante cromatografía en columna y se analizaron mediante cromatografía en capa fina (Gel de sílice 60), usando una fase móvil de cloroformo/metanol/agua, 6/5/1. Los resultados se muestran en la Figura 16. (Hilera 1: BC (CALBIOCHEM7); Hilera 2: Impureza I; Hilera 3: Impureza II; Hilera 4: Mezcla de Impureza II e Impureza III; Hilera 5: Impureza III; Hilera 6: BC (CALBIOCHEM7) puro; Hilera 7: BC (CALBIOCHEM7)).

3. Concentraciones crecientes de BC (Sigma) potencian la transferencia génica.

- 35 Para probar las impurezas de BC respecto de la potenciación de la transferencia génica, rAd-βgal (1×10^{11} PN/ml) se formuló en concentraciones crecientes de BC (Sigma) y se ensayó en animales como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 17. A concentración más alta, es decir, 20 mg/ml, del BC de Sigma se mejoró la expresión génica epitelial (panel superior e intermedio). En comparación, se indujo una expresión génica similar por el BC (CALBIOCHEM7) a una concentración inferior (6 mg/ml, Figura 17, panel inferior).

4. BC purificado por cromatografía en columna no potencia la transferencia génica

- 40 rad-βgal se formuló en 30 mg/ml del material purificado mediante cromatografía en columna de ambos BC y se ensayó la transferencia génica al epitelio de la vejiga como anteriormente. A una concentración de 30 mg/ml, la transferencia y expresión génica sólo se potenció ligeramente en la muestra de CALBIOCHEM7 (Figura 18, panel superior, derecha). El BC de Sigma purificado quedó sin ningún efecto (Figura 18, panel inferior, izquierda). La purificación de ambos BC (Sigma o CALBIOCHEM7) dio como resultado una disminución en la transferencia y expresión génica.

5. Una mezcla de impureza II e impureza III potencia la transferencia génica.

- 45 Se detectaron mediante CCF tres impurezas de BC (CALBIOCHEM7) TLC (Figura 15) y se aislaron mediante cromatografía en columna para estudios de transferencia génica. La impureza I y una mezcla de impureza II e impureza III se diluyeron en VPBS (0,6 mg/ml o 6 mg/ml) para ensayar su eficacia en la potenciación de la transferencia génica mediada por rAd al epitelio de vejiga. La impureza I no condujo a un aumento de expresión génica de β-galactosidasa en el epitelio de vejiga, sino que en su lugar produjo cistitis (Figura 19, panel inferior, derecha). En fuerte contraste, la mezcla de impureza II e impureza potenció la transferencia y expresión génica de forma dependiente de la dosis (Figura 19, panel inferior, izquierda). La formulación de control positivo (BC, CALBIOCHEM7, panel superior, izquierda), y las formulaciones de control negativo (BC-CALBIOCHEM7, purificado mediante cromatografía en columna y BC - Sigma) se utilizaron a una concentración de 6 mg/ml (panel superior,

derecha).

6. La reconstitución de impureza en Big CHAP lleva a la potenciación de la transferencia génica.

En este experimento, 10 mg/ml de BC (Sigma, Figure 20 panel superior intermedio) se reconstituyó con la Impureza III (panel superior derecho), impureza II (panel inferior izquierdo), o análogo sintético de impureza III (panel inferior derecho). rad- β gal, 1×10^{11} PN/ml, se preparó en las formulaciones moteadas y se administró intravesicalmente como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 20, se observó una expresión mejorada en el gen indicador de la β -galactosidasa en el epitelio de la vejiga de los animales que habían recibido rAd disuelto en las formulaciones Aspiked \cong BC (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml de Big CHAP (Sigma).

Ejemplo 12

Síntesis de 3-Aminopropil-3'-N-gluconamidopropil-amina

1. 3'-N-gluconamidopropil-3"-N-colamidopropil-N-colamida

Se añadió Glucono- δ -lactona (0,1 mol, 17,8 g) en pequeñas porciones a una disolución de 0,1 mol (13,1) g de iminobispropilamina en 400 ml de metanol absoluto a reflujo. Tras mantenerse a reflujo durante 2 horas, la disolución se dejó enfriar sobre hielo durante 1 hora. El disolvente se evaporó hasta sequedad.

2. 3-Aminopropil-3'-N-gluconamidopropil-amina

Se añadió trietilamina (0,2 mol, 28 ml) a una disolución de 0,2 mol (81,6 g) de ácido cólico disuelto en 500 ml de DMF seco en un matraz de 1 litro. La disolución se enfrió hasta 0°C en un baño hielo-sal, tras lo cual se añadieron 0,2 mol (20 g) de isobutilcloroforniato. La mezcla se dejó reposar en el baño hielo-sal durante 5 min. tras lo cual fue visible el precipitado de clorhidrato de trietilamina. La reacción produjo un anhídrido mixto intermedio.

En otro matraz de 2 litros, se disolvió 0,1 mol (30,9 g) de 3'-N-gluconamidopropil-3"-N-colamidopropil-N-colamida en 500 ml de DMF con suave calentamiento a 40-60°C. Esta disolución se enfrió rápidamente en el baño hielo-sal hasta que comenzó a enturbiarse, a aproximadamente 10°C. El anhídrido mixto intermedio se filtró en la disolución de 3'-N-gluconamidopropil-3"-N-colamidopropil-N-colamida en DMF. El precipitado de clorhidrato de trietilamina se eliminó por filtración. Posteriormente, la disolución se agitó con enfriamiento durante 24 horas. El DMF se eliminó por evaporación bajo vacío y calor, y la mezcla bruta se sometió a cromatografía en columna con cloroformo/metanol/agua, 65/5/1, como fase móvil. Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó a vacío. La reacción produjo aproximadamente 27 g (25 %) de producto.

El análisis del espectro de masa del producto proporcionó los siguientes picos: 337,2, 394,2, 412,2, 503,8, 682,4, 700,5, 755,1, 801,1, 823,1, 912,3, 1054,8, 1074,7, 1090,6, 1112,4, 1119,3.

Ejemplo 13

Caracterización y síntesis de los componentes potenciadores de la transfección en Big CHAP

Como se demostró en el Ejemplo 11, las impurezas presentes en Big CHAP actúan potenciando la transferencia génica. Este Ejemplo describe la caracterización y síntesis adicional de estos compuestos.

Big CHAP de Calbiochem se fraccionó mediante cromatografía en columna para obtener de forma esencialmente pura las impurezas "1", "2", y "3" tanto para las pruebas biológicas como para su análisis estructural. No se probó la actividad biológica de la impureza I debido a la irritación de la vejiga que se había observado en los experimentos iniciales. Como las impurezas 2 y 3 no eran muy solubles en agua, se mezclaron con 6 mg/ml de Big CHAP de Sigma en niveles de 0,12 y 1,2 mg/ml y se encontró que potenciaban la transferencia génica (Big CHAP de Sigma solo a 6 mg/ml no potencia la transferencia génica).

Las estructuras de las Impurezas 1, 2, y 3 se determinaron mediante análisis MALDI-EM y RMN. La Figura 22 muestra la estructura, MALDI-MS, y espectro RMN ^1H de la Impureza 1. La estructura, MALDI-MS, y espectro RMN ^1H de la Impureza 2 se muestran en la Figura 23, y los de la Impureza 3 se muestran en la Figura 24. La comparación de los espectros con los del Big CHAP demuestra que las impurezas surgen del procedimiento utilizado para sintetizar el Big CHAP, en lugar de ser degradantes del Big CHAP.

Se encontró que el Big CHAP de Sigma bruto potenciaba la transferencia génica cuando se utilizaba en concentración de 26 mg/ml. Para determinar si aparecían niveles traza de impurezas en el Big CHAP de Sigma, se aplicó 1 mg a una placa de gel de sílice. Se observó que una impureza migraba conjuntamente con la Impureza 2 en Big CHAP de Calbiochem. El MALDI-EM y la RMN confirmaron que esta impureza tenía la misma estructura que la Impureza 2 en Big CHAP de Calbiochem. Se fraccionaron algunos gramos de Big CHAP de Sigma, mediante cromatografía instantánea en gel de sílice y las fracciones que contenían impurezas se consolidaron, se concentraron, y se analizaron mediante CCF. Varias impurezas, entre las que se incluían las Impurezas 2 y 3, fueron evidentes en esta fracción enriquecida en impurezas traza.

Síntesis de la Impureza 2

La Impureza 2 se sintetizó de la siguiente forma (ver la Figura 25). En primer lugar, El Compuesto III se sintetizó como se muestra en la Figura 25 disolviendo 1,78 g (10 mmol) de gluconolactona en 200 ml de metanol a reflujo y se añadieron 4,2 ml (30 mmol) de N-3- aminopropil)-1,3-propanodiameno. El reflujo se mantuvo durante 2 horas. A continuación, el metanol se evaporó en un evaporador rotatorio y el aceite resultante se trituró con cloroformo hasta que se formó un sólido blanco. El sólido blanco se filtró, se lavó con cloroformo, y se secó por succión para dar 2,1 g de producto (Compuesto III impuro).

El compuesto IV se sintetizó disolviendo 0,65 g (1,6 mmol) de ácido cólico en 40 ml de N,N-dimetilformamida con calefacción y agitación. A continuación, la disolución se enfrió en un baño hielo-sal manteniendo la agitación. A continuación se añadió trietilamina (0,223 ml (1,6 mmol)), seguido por la adición de 0,208 ml (1,6 mmol) de isobutilcloroforniato. Se formó un precipitado de color blanco cuando la agitación se prolongó durante diez minutos, permaneciendo en disolución el Compuesto IV.

Para sintetizar la Impureza 2 (Compuesto V en la Figura 25), se disolvieron 0,5 g (1,6 mmol) de Compuesto III en 100 ml de dimetilsulfóxido con agitación a 55°C. La suspensión que contenía el Compuesto IV se filtró en esta disolución y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El intento de separar el dimetilsulfóxido del producto (usando la mitad de la mezcla de reacción) por adición de agua y extracción con cloruro de metileno o cloruro de metileno/metanol no tuvo éxito. La otra mitad de la mezcla de reacción se destiló a vacío para eliminar la mayor parte del dimetilsulfóxido. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice usando metanol/cloroformo (40/60) como eluyente. El análisis de las fracciones eluidas de la columna se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil constituida por cloroformo/metanol/agua (6/5/1) y se visualizó mediante pulverización posterior con ácido sulfúrico etanólico. Las fracciones que contenían el producto más puro se consolidaron, se evaporaron a sequedad y se trituraron con hexano para producir un sólido castaño claro que se filtró y se lavó con hexano. Los análisis mediante RMN ¹H y MALDI-espectrometría de masas fueron compatibles con la estructura mostrada.

La evaluación biológica de este compuesto quedó algo impedida por su falta de solubilidad en agua. Sin embargo, incluso aunque el compuesto no se disolvió completamente, la transferencia génica a la vejiga quedó potenciada por el compuesto disuelto de forma incompleta. La formulación de la Impureza 2 en Big CHAP, por ejemplo, dio como resultado una formulación eficaz para potenciar la transferencia génica a las células.

Síntesis de Syn3 (Análogo de la Impureza 3)

Como la Impureza 3 es más polar, y por tanto más soluble en agua, que la Impureza 2, se intentó la síntesis de este compuesto. El Big CHAP purificado se hizo reaccionar con el anhídrido mixto de ácido cólico (formado por reacción entre el ácido cólico y el isobutilcloroforniato). La reacción dio por resultado un rendimiento bajo y muchos productos, por lo que se sintetizó un análogo de la Impureza 3. Este análogo, que tenía una polaridad similar a la de la Impureza 3 se denominó "Syn3".

Parte 1: Síntesis del Compuesto III

El esquema sintético de Syn3 se muestra en la Figura 26. Se sintetizó la lactona del ácido lactobiónico (II) disolviendo un gramo (2,8 mmol) de ácido lactobiónico (I) en 50 ml de metanol, evaporando a sequedad en un evaporador rotatorio, y repitiendo seis veces este procedimiento. Para obtener el Compuesto III, el residuo resultante (II) se disolvió en 50 ml de isopropanol calentando a 50°C. A esta disolución se agregaron 1,2 ml (8,4 mmol) de N-3- aminopropil)-1,3-propanodiameno. La temperatura se aumentó hasta 100°C y la disolución se agitó durante tres horas. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria y el residuo resultante se lavó varias veces con cloroformo para eliminar el N-3- aminopropil)-1,3-propanodiameno en exceso que no había reaccionado. El residuo remanente (III) se utilizó como tal en la siguiente Parte 3.

Parte 2: Síntesis del Compuesto IV

El compuesto IV se sintetizó disolviendo 2,28 g (5,6 mmol) de ácido cólico en 5,6 mmol de N,N-dimetilformamida con calefacción a 60°C. Se añadió trietilamina (0,78 ml (5,6 mmol)) y la disolución se enfrió en un baño de hielo. A continuación se añadió cloroforniato de isobutilo (0,73 ml (5,6 mmol)) y se formó un precipitado de color blanco cuando la agitación se prolongó durante diez minutos.

Parte 3: Síntesis de Syn3 (Compuesto V)

El Compuesto III se disolvió en N,N-dimetilformamida, se enfrió en un baño de hielo, y se agitó. La suspensión resultante de la síntesis del Compuesto IV se filtró en la disolución que contenía el Compuesto III. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria de alto vacío y el residuo se disolvió en 100 ml de cloroformo/metanol (50/50). Veinticinco ml de esta disolución se purificaron mediante cromatografía instantánea en gel de sílice usando metanol/cloroformo (60/40) como eluyente. El análisis de las fracciones eluidas de la columna se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil constituida por cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio concentrado (100/80/10/5). Los compuestos

se visualizaron mediante pulverización posterior con ácido sulfúrico etanólico. Las fracciones que contenían producto se consolidaron y se volvieron a purificar mediante cromatografía instantánea usando como eluyente cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio concentrado (100/80/10/5). Las fracciones que contenían producto se consolidaron y se evaporaron para dar un polvo blanco (300 mg de Compuesto V). Los análisis mediante RMN ^1H y MALDI-espectrometría de masas fueron compatibles con la estructura mostrada.

Syn3 formó un gel al intentar la disolución a 10 mg/ml en agua y parece formar micelas a 1 mg/ml. Sin embargo, a 1 mg/ml en Tween 80 al 0,1% se consiguió una disolución transparente de Syn3. Se encontró que esta formulación potenciaba la transferencia génica. El Tween 80 solo, cuando se probó, no tuvo efectos sobre la transferencia génica.

El Big CHAP purificado dopado con las Impurezas 2 o 3 es un potenciador eficaz de la transferencia génica. La Impureza 2 sintética sola y el análogo sintético de la Impureza 3 (Syn3) solo potencian la transferencia génica. Por tanto, no se necesita una relación sinérgica entre Big CHAP y las impurezas para potenciar la transferencia génica. Big CHAP es muy soluble en agua y es eficaz para solubilizar las impurezas y sus análogos, probablemente como micelas mixtas, actuando por tanto como vehículo para las impurezas y/o análogos activos.

Aunque la Impureza 2 es eficaz para potenciar la transferencia génica, tiene una solubilidad limitada en disoluciones acuosas, aunque es útil cuando se formula en un agente solubilizante adecuado como Big CHAP. A diferencia de la Impureza 2, Syn3 se solubiliza con facilidad en, por ejemplo, 1 mg/ml en Tween 80 al 0,1% y otras disoluciones acuosas como se describe en el presente documento. De esta forma, este compuesto es particularmente útil como agente potenciador de la transferencia génica.

Ejemplo 14

Eficacia del análogo sintético de la Impureza 3 (Syn3) para potenciar la transferencia génica a la vejiga

Este Ejemplo demuestra que el análogo de la Impureza 3 Syn3 es eficaz para potenciar la transferencia génica a la vejiga.

PROCEDIMIENTOS:

1. Disolución de Syn3

Las pruebas iniciales de Syn3 indicaron que no era muy soluble ni en disolución salina tamponada ni en H_2O . Sin embargo, se encontró que Syn3 se disolvía bastante bien en el detergente Big CHAP, así como en el detergente Tween-80 (aunque con algo más de dificultad en comparación con la disolución en Big CHAP). Cuanto mayor es la concentración de la disolución de Big CHAP utilizada en la disolución, mayor es la cantidad de Syn3 que se puede disolver. Se encontró que hasta 5 mg/ml de Syn3 se disolvían en Big CHAP 15 mM.

En los siguientes estudio que usaban Syn3 en Tween-80, se preparó una disolución de 100 mg/ml de Syn3 en Tween80 al 10%. Esta disolución madre se diluyó en H_2O (1:100) para dar una concentración final de 1 mg/ml de Syn3 en Tween-80 al 0,1 %.

La Tabla II resume las concentraciones de Syn3 elegidas para las pruebas *in vivo*:

Tabla II

Concentración de Syn3 en el detergente	Formulación	Concentración final de Syn3 con rAd
5,0 mg/ml	Big CHAP 15 mM	4,5 mg/ml
0,5 mg/ml	Big CHAP 7,8 mM	0,45 mg/ml
0,25 mg/ml	Big CHAP 3,9 mM	0,22 mg/ml
1,0 mg/ml	Tween-80 al 0,40%	0,90 mg/ml
1,0 mg/ml	Tween-80 al 0,10%	0,45 mg/ml
0,50 mg/ml	Tween-80 al 0,05%	0,22 mg/ml

2. Pruebas In Vivo

Se probó *in vivo* la actividad de transferencia génica de Syn3 por determinación del nivel de expresión de la β -galactosidasa que seguía a la administración de adenovirus que contenía el gen de la β -galactosidasa administrado en una de las anteriores disoluciones de detergente. En este procedimiento, ratas Harlan Sprague-Dawley hembra se cateterizaron y se les administró adenovirus diluido 1:10 bien en Big CHAP o en Tween-80 que contenía Syn3 en una de las concentraciones anteriores durante 45 minutos. Tras la eliminación del virus y lavado de la vejiga, se permitió que los animales se recuperaran. Los animales se sacrificaron 48 horas después, se fijaron las vejigas, y se

tiñeron para la expresión de β -galactosidasa. Tras el registro fotográfico, las vejigas se incluyeron en parafina para recorte y examen histológico.

RESULTADOS:

1. Actividad de transferencia de genes de Syn3 en Big CHAP

Syn3 se ensayó a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM. A esta concentración, se disolvió con relativa facilidad, y se esterilizó por filtración (Filtro de jeringuilla de 0,2 Φ m de Acrodisc; Gelman Sciences). Los experimentos iniciales utilizaron Big CHAP de Calbiochem. nº de lote B19546, mientras que los experimentos finales utilizaron Big CHAP de Sigma nº de lote 37H5023. Ninguna de las disoluciones madre de Big CHAP experimentó actividad de transferencia de genes en solitario a la concentración utilizada. Como control positivo, se utilizó Calbiochem nº de lote 679793 como formulación para administración de rAd. Se identificó que este lote concreto de Big CHAP contenía las impurezas activas que habían identificado y a partir de las cuales se modeló Syn3. Como se muestra en la Figura 27, se encontró que Syn3 (I3A) potenciaba en gran medida la transferencia génica y la expresión de β -gal en comparación con la administración del virus solo en Big CHAP 7,8 mM.

Para determinar si concentraciones inferiores de Syn3 podrían mostrarse tan eficaces en la potenciación de la transferencia génica como las concentraciones más elevadas, Syn3 fue administrado a 0,25 mg/ml en Big CHAP 3,9 mM (Figura 28A). Se obtuvieron niveles muy elevados de transferencia génica, pero no tan consistentemente elevados como los observados con Syn3 a 0,5 mg/ml (Figura 28B).

2. Actividad de transferencia de genes de I3A/Syn3 en Tween-80

La prueba inicial de I3A en Tween-80 comenzó usando I3A a 1 mg/ml en Tween-80 al 0,4%. Sin embargo, prácticamente no se obtuvo transferencia génica cuando se utilizó esta concentración de Tween (no se muestran los datos). Como se teorizó que la elevada concentración de Tween-80 podría haber secuestrado el I3A impidiendo el reparto en la membrana y permitiendo la penetración vírica, la concentración de Tween-80 se redujo al 0,1%, manteniendo la concentración de I3A a 1 mg/ml. Se ensayaron dos preparaciones de Syn3 diferentes para probar su actividad de transferencia de genes a 1 mg/ml en Tween-80 al 0,1%. A esta concentración, se observaron niveles muy elevados de transferencia génica cuando se usó tanto el primer lote (I3A) (Figura 29A) como el segundo lote de Syn3 (Figura 29B). El segundo lote de Syn3 también había demostrado niveles muy elevados de actividad de transferencia génica a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM, de forma que todos los experimentos futuros se realizaron con Syn3 en lugar de con I3A.

La actividad de transferencia génica de Syn3 en Big CHAP (0,5 mg/ml en 7,8 mM) se comparó a su actividad en Tween80 (1 mg/ml en Tween-80 al 0,1%). Se encontró que ambas formulaciones tenían aproximadamente los mismos niveles de potenciación de la transferencia génica quizás con una transferencia ligeramente mayor observada en Big CHAP (Figura 30A y Figura 30C respectivamente). Como la prueba de la β -galactosidasa no es demasiado cuantitativa, es difícil discernir entre diferencias pequeñas. Sin embargo, las vejigas tratadas con Syn3 a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM tuvieron consistentemente los niveles más elevados de expresión de β -galactosidasa. Syn3 incrementó la transferencia génica en ambos detergentes, aunque no se disuelve con tanta facilidad en el Tween-80. Puesto que la concentración de Syn3 en Big CHAP fue el doble que en Tween, seguidamente se ensayó Syn3 para determinar su actividad de transferencia génica en ambos detergentes. A 0,5 mg/ml, Syn3 parece producir mejor transferencia génica en Big CHAP 7,8 mM (Figura 31 A), de la obtenida usando Syn3 en Tween-80 al 0,05%. Cuando se utilizó Syn3 a 0,5 mg/ml en Tween-80 al 0,05%, parece que hay más regiones que carecen de la expresión de la β -galactosidasa, de forma similar a la observada cuando la concentración de Syn3/I3A se redujo a 0,25 mg/ml en Big CHAP 3,9 mM (Figura 28A). Esto sugiere que algunas de las diferencias en la actividad de transferencia génica de Syn3 en Big CHAP vs. Tween-80 son probablemente debidas en parte al detergente en el que Syn3 fue disuelto.

3. Examen histológico de las vejigas tratadas con Syn3

Las vejigas de los animales tratados con Syn3-rAd (β -Gal) se prepararon para examen histológico para determinar los niveles de infección vírica, así como el grado de penetración vírica en el urotelio de la vejiga. La reducción de la concentración de Syn en cualquiera de los detergentes dio por resultado una reducción equivalente en la expresión de β -Gal (Figura 32A-F). Aunque la expresión de la β -galactosidasa resultante de la administración de Syn3 a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM fue ligeramente superior a la del Tween-80 (Figura 32A vs. Figura 32D), se resalta que esta concentración de Syn3 habitualmente da por resultado un alistamiento masivo de infiltrados en la vejiga (Figura 32A).

Puesto que la expresión de la β -galactosidasa y el nivel de infiltrados fue superior en la vejigas en las que se utilizó Syn3 a 0,5 mg/ml en Big CHAP que en las vejigas en las que Syn3 estaba a 1mg/ml en Tween-80, esto sugiere que la infiltración fue debida al aumento de la penetración y expresión vírica que se produce cuando rAd se administra en el Big CHAP. Para discernir la contribución que Syn3 puede tener en el reclutamiento de infiltrados, se compararon secciones de vejigas expuestas a Syn3 y virus con las que se habían expuesto a Syn3 solo (Figura 33A y Figura 33B, respectivamente.). Cuando Syn3 se administra solo, se observa una cantidad significativa de infiltración, solo

un poco inferior a la observada con Syn3 y virus conjuntamente. El virus administrado sin Syn3 dio por resultado niveles extremadamente bajos de infección e infiltrados (Figura 33C), mientras que el control negativo (sin virus, sin Syn3) no mostró infiltración (Figura 33D).

4. Estabilidad de Syn3 en disolución

Syn3 es muy estable cuando se disuelve en el detergente Big CHAP. Cuando Syn3 se disolvió en Big CHAP a cualquiera de 0,5 mg/ml o 0,5 mg/ml, retuvo su actividad de transferencia génica en periodos prolongados (30 días o superiores) incluso almacenado a temperatura ambiente. Cuando Syn3 se disolvió a 100 mg/ml en Tween-80 al 10%, fue estable durante al menos una semana almacenado a 4°C. Sin embargo, si se deja a temperatura ambiente a esta concentración elevada (100 mg/ml), solidificará en 24 horas. Syn3 diluido hasta 1 mg/ml en Tween-80 al 0,1% es estable durante al menos 30 días (periodo más prolongado ensayado).

CONCLUSIONES

La actividad de transferencia génica de Syn3 parece ser extremadamente elevada a 0,5 mg/ml en Big CHAP 7,8 mM. Sin embargo, se prefieren concentraciones inferiores de Syn3 (por ejemplo, 0,25 mg/ml en Big CHAP 3,9 mM) debido a la posibilidad de efectos secundarios a concentraciones más elevadas. Syn3 también ha demostrado niveles consistentes elevados de transferencia génica a 1 mg/ml en Tween-80 al 0,1 %. Basándose en los resultados de estos estudios, una formulación particularmente adecuada de Syn3 para uso como agente de transferencia génica es a 1 mg/ml en Tween-80 al 0,1 %.

Ejemplo 15

Formulación clínica de Syn3

Este ejemplo proporciona, a efectos ilustrativos, un ejemplo de una formulación de Syn3 que es adecuada para uso como formulación clínica para administrar un vector vírico. Esta formulación también se puede usar para administrar compuestos potenciadores; muchas otras formulaciones como las descritas en el presente documento son también adecuadas para usar con Syn3 y otros compuestos.

Una disolución madre de Syn3 se preparó disolviendo Syn3 a 100 mg/ml en Tween 80 al 10%. Esta disolución madre se diluyó a continuación hasta una concentración de Syn3 de 6 mg/ml usando un tampón acuoso que contenía Tris (1,7 mg/ml), fosfato de sodio (monosodio, dihidrato, 1,7 mg/ml), sacarosa (20 mg/ml, cloruro de magnesio (hexahidrato, 0,4 mg/ml), y glicerol (100 mg/ml) en agua.

Esta disolución se diluyó con una disolución que contenía el vector vírico para obtener una disolución de virus que contenía 1 mg/ml de Syn3 en Tween-80 al 0,1%. Esta disolución fue eficaz para potenciar la transferencia génica.

Ejemplo 16

Síntesis de análogos de Syn3 que tienen una mayor solubilidad en agua

Syn3 había demostrado una elevada actividad potenciadora de la transferencia génica *in vivo*, pero era relativamente insoluble en disoluciones acuosas, y necesitaba la presencia de detergente para completar la disolución. Adicionalmente, Syn3 requiere varias horas para disolverse completamente en Tween-80 al 10%, complicando adicionalmente el uso clínico de este reactivo. Para resolver estas dificultades, se sintetizaron dos análogos de Syn3 que una mayor solubilidad en disolución acuosa. Al retirar el resto lactosa de Syn3 y la posterior metilación o reducción de la amina resultante, se sintetizaron dos compuestos novedosos que se denominaron como Cloruro de trimetilamonio A (A-tma) y Clorhidrato-A (A-HCl), respectivamente, en la que A representa la región conservada de Syn3 común a ambas moléculas (ver la Figura 21). Estos dos compuestos catiónicos se neutralizaron posteriormente a su sal de cloruro para facilitar su disolución.

A-TMA se sintetizó como se muestra en la Figura 35. Brevemente, el ácido cólico (CA) (2,0 g, 5 mmol) en DMF (30 ml), 0°C) se trató con Et₃N (0,72 ml, 5,1 mmol) y a continuación con cuidado, con cloroformiato de isobutilo (0,67 ml 5,1 mmol). La mezcla se agitó durante tres días y dio como resultado un compuesto. Este se purificó fácilmente en SiO₂ eluyendo con DCM/MeOH (6: 1 a 4:1). Tras 30 min. a temperatura ambiente, se agregó una disolución de la amina (J-2/55) (522 mg, 2,26 mmol) en DMF (4 ml). La amina se sintetizó de acuerdo con Han, Y-P y Hang, H-S, Bull. Korean Chem. Soc. (1994) 15: 1025-1027. Se obtuvieron 1,8 g del compuesto resultante, J-2/5C (BOC-A), dando como resultado un rendimiento del 72%.

La amina (250 mg, 61/11, 0,27 mmol) en DMF (10 ml) se trató con base de Hungs (diisopropiletilamina) (200 µl, 1,15 mmol) y MeI (75 µl, 1,2 mmol). La CCF mostró principalmente un compuesto, junto a unas pocas impurezas. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se aplicó a una columna de sílice eluida con MeCN/AcOH/H₂O (4:1:1). Las fracciones intermedias se combinaron y se sometieron a cromatografía de intercambio iónico en la forma Na⁺ de una resina de intercambio catiónico Dowex 50W-X8-200, eluida con NaCl/MeOH 1:1 0,5 M. Las fracciones más puras se desalaron con Sephadex LH-20 lipófilo y se liofilizaron para dar el cloruro de trimetilamonio puro (J-2/90 (A-tma)). Se obtuvieron 82 mg del compuesto resultante, dando como resultado un rendimiento del 32 %.

Para obtener el A-HCl, se trató BOC-A (1,0 g, 1 mmol) en MeOH (60 ml) con una disolución de AcCl en MeOH (2 ml en 20 ml) a 0 °C. Se dejó que la reacción alcanzara lentamente la temperatura ambiente. La CCF tras 3 h mostró la desaparición del material de partida. Tras la evaporación (con EtOH/tolueno), el residuo se aplicó a la forma Na⁺ de una resina de intercambio catiónico Dowex 50W-X8-200. Sin embargo, el producto la atravesó directamente. La elución con NaCl 0,5 M no produjo ningún material adicional. La cromatografía instantánea en SiO₂ tuvo éxito (DCM/MeOH/H₂O; 60:35:5), aunque el producto pareció eluirse en dos bandas. La RMN demostró que las fracciones iniciales y finales eran idénticas. Se obtuvieron 650 mg del compuesto resultante, A-HCl, dando como resultado un rendimiento del 65 %. Se resalta que el tratamiento con base (-Ome o resina) puede cambiar el comportamiento del producto en una CCF.

Ejemplo 17

A-tma y A-HCl potencian la transferencia génica *In vivo*

Este Ejemplo demuestra que los compuestos A-tma y A-HCl tienen actividad de transferencia génica *in vivo*.

Procedimientos:

1. Preparación de disoluciones para administración:

Se eligió una concentración de 1 mg/ml para las pruebas iniciales de ambos compuestos. Para la determinación de la actividad de transferencia génica de cada uno de estos compuestos, se comparó el nivel de la actividad de la β-galactosidasa obtenida tras la administración del Syn3 análogo/virus/tampón respecto a la utilización de solamente virus/tampón.

La disolución de A-TMA se preparó disolviendo 10 mg de A-TMA en 10 ml de PBS de Dulbecco. Se añadió glicerol para dar una concentración final de 10 mg/ml. Todas las disoluciones se esterilizaron por filtración antes del uso (filtro de jeringuilla de 0,2 Φm de Acrodisc). El virus (BGCG 70AAB) se diluyó 1:10 bien en esta disolución de A-TMA, o en PBS-glicerol de Dulbecco antes de la administración.

Como A-HCl no es totalmente soluble en disolución salina, y como la disolución en H₂O dio por resultado una disolución de pH 4,7, entonces se escogió una disolución tamponada con Tris de A-HCl cuya composición es la siguiente:

Disolución tampón (Tampón D)

Tris 2,8 mM, pH 7,5,

NaH₂PO₄ 1,2 mM

MgCl₂ 2 mM

sacarosa al 0,2%

glicerol 10 mg/ml

pH final 6,5

Se disolvieron diez mg de A-HCl en este tampón y se esterilizó por filtración antes del uso (filtro de jeringuilla de 0,2 Φm de Acrodisc). El virus (BGCG 70AAB) se diluyó 1:10 en esta disolución antes de la administración. Para comparar, también se ensayó el virus diluido en este tampón sin A-HCl.

2. Administración *in vivo*

Se anestesiaron con isoflurano ratas hembra HSD. Las ratas se cateterizaron transuretralmente hasta la vejiga mediante un conducto PE50 lubricado con gelatina K-Y. Se instaló un ligadura en la uretra externa para evitar el retorno a la circulación renal. La orina, de haber alguna, fue eliminada, y la vejiga se lavó con 0,5 ml de 0,5 ml PBS y se vació. El rAd se diluyó a la concentración deseada (1:10) y se instiló durante 45 minutos. Se retiró el material de administración, anotando el volumen devuelto. La vejiga se lavó con 0,5 ml de 0,5 ml PBS y se vació. Se retiraron la ligadura y el catéter, y se permitió que los animales se recuperaran en jaulas.

Tras 48 horas, los animales se sacrificaron y sus vejigas infladas se fijaron con 0,5 ml de fijador durante 1 hora. A continuación las vejigas se lavaron durante toda la noche y se llevó a cabo una tinción del órgano completo con X-gal.

Resultados:

Ambos compuestos proporcionaron una actividad potenciadora de la transferencia génica en comparación con los controles. Los niveles de actividad de transferencia génica se resumen en la Tabla III. Se muestran niveles relativos de actividad de transferencia génica, los niveles de actividad de transferencia génica más elevados se indican por

'++++', y los niveles inferiores por '+' (si no hay actividad de transferencia se indica por 0).

Tabla III: Evaluación de la actividad de transferencia génica en animales usando análogos de Syn3 solubles en agua

Animal nº	Composición de la disolución	Actividad de transferencia génica
nº 297	PBS/1%Glicerol	0
nº 298	1 mg/ml A-TMA en PBS / glicerol al 1%	++
nº 988	1 mg/ml A-TMA en PBS / glicerol al 1%	++
nº 989	1 mg/ml A-TMA v PBS / glicerol al 1%	++
nº 384	Tampón D	0
nº 385	1 mg/ml A-HCl en Tampón D	++
nº 386	1 mg/ml A-HCl en Tampón D	++
nº 387	1 mg/ml A-HCl en Tampón D	++

5 Conclusiones:

Ambos compuestos A-tma y A-HCl demostraron actividad de transferencia génica significativamente por encima de los niveles obtenidos con los controles. Aunque estos niveles son menores de los obtenidos mediante Syn3 en Tween-80, indican que es posible potenciar la transferencia génica usando un agente potenciador de la transfección de base acuosa tal como A-tma y A- HCl. El compuesto A-SC, cuyo resto lactosa de Syn3 sustituido por un resto de ácido succínico no fue eficaz como compuesto potenciador de la transferencia génica. Este compuesto produjo una actividad de transferencia génica a niveles equivalentes a los controles (no se muestran los datos). La Tabla IV resume los resultados de transferencia génica usando estos compuestos en comparación con la actividad de transferencia génica de Syn3 a 1 mg/ml.

Tabla IV: Resumen de la actividad de transferencia génica de análogos de Syn3 solubles en agua

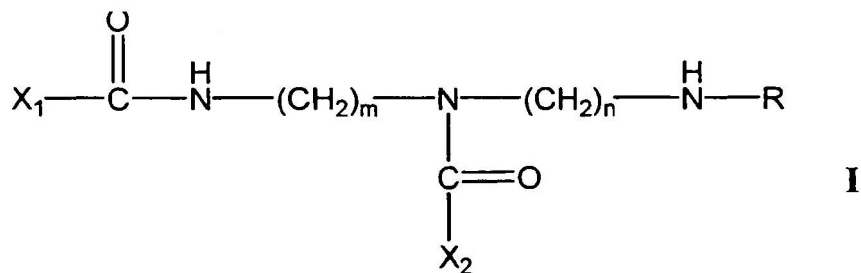
Compuesto	Concentración	Actividad de transferencia génica
A-TMA	1 mg/ml	++
A-HCl	1 mg/ml	++
A-SC	1 mg/ml	0/+
Syn3	1 mg/ml	++++

Puesto que se encontró que ambos compuestos tenían una solubilidad mucho mayor en H₂O (de hasta 5 mg/ml), es probable que un aumento en la concentración de estos análogos diera por resultado una actividad de transferencia génica incluso superior *in vivo*.

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento como si se indicara para cada publicación o solicitud de patente individual su incorporación por referencia.

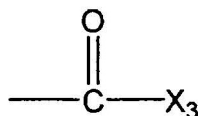
Como será evidente para una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención, la presente invención se puede realizar de forma diferente a la que se ha dado a conocer específicamente en los que antecede, sin separarse del espíritu o características esenciales de la invención. Las formas de realización particulares de la invención anteriormente descrita, deben considerarse por tanto de manera ilustrativa y no restrictiva. El alcance de la presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas en lugar de estar limitado a los ejemplos contenidos en la descripción precedente.

De este modo, un aspecto de la invención es un procedimiento para administrar un agente a células, comprendiendo el procedimiento administrar el agente a las células en una composición que comprende un compuesto potenciador de la administración de Fórmula I.



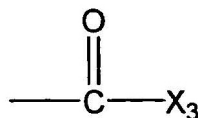
en la que:

m y n son iguales o diferentes y cada uno es un número entero de 2-8; R es un grupo catiónico o



X₁ es un grupo ácido cólico o un grupo ácido desoxiglicólico; y X₂ y X₃ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo constituido por un grupo ácido cólico, un grupo ácido desoxiglicólico, y un grupo sacárido;

en el que al menos uno de X₂ y X₃ es un grupo sacárido cuando R es



En una forma de realización adicional, la cantidad de agente administrado a las células en presencia del agente potenciador de la administración está aumentada en relación con la cantidad del agente administrado a las células cuando el agente se administra en ausencia del compuesto potenciador de la administración.

En una forma de realización adicional, el agente es un agente terapéutico. En una forma de realización adicional, la concentración del compuesto potenciador de la administración está entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 2 mg/ml.

En una forma de realización adicional, la concentración del compuesto potenciador de la administración está entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 2 mg/ml. En una forma de realización adicional, la concentración del compuesto potenciador de la administración está entre aproximadamente 0,2 y 2 mg/ml.

En una forma de realización adicional, las células se proporcionan en forma de tejido.

En una forma de realización adicional, el tejido es un órgano. En una forma de realización adicional, la administración es por administración intravesical.

En una forma de realización adicional, el agente es una proteína. En una forma de realización adicional, el agente es un gen.

En una forma de realización adicional, el gen se administra en un vector. En una forma de realización adicional, el vector es un vector vírico. En una forma de realización adicional, el vector vírico se selecciona entre el grupo compuesto por un vector adenovírico, un vector retrovírico, y un vector vírico adenoasociado.

En una forma de realización adicional, el vector vírico se administra como una suspensión que contiene de aproximadamente 1×10^8 partículas/ml a aproximadamente 5×10^{11} partículas/ml de vector vírico.

En una forma de realización adicional, la suspensión contiene de aproximadamente 1×10^9 partículas/ml a aproximadamente 1×10^{11} partículas/ml de vector vírico. En una forma de realización adicional, el gen es un gen terapéutico.

En una forma de realización adicional, el gen terapéutico es un gen supresor de tumores. En una forma de realización adicional, el gen supresor de tumores es p53.

En una forma de realización adicional, el gen supresor de tumores es un gen de retinoblastoma.

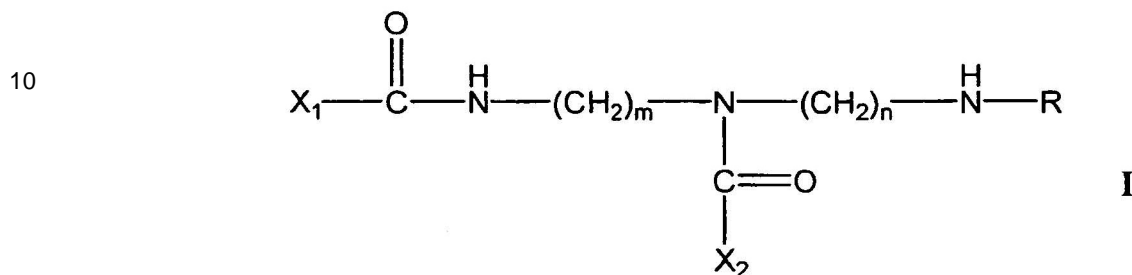
En una forma de realización adicional, el gen supresor de tumor de retinoblastoma codifica una proteína RM de longitud completa. En una forma de realización adicional, el gen supresor de tumor de retinoblastoma codifica p56^{RB}.

En una forma de realización adicional, las células son células cancerosas.

En una forma de realización adicional, las células cancerosas son células cancerosas de vejiga. En una forma de realización adicional, las células cancerosas se proporcionan en forma de tejido.

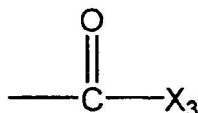
- 5 En una forma de realización adicional, el compuesto potenciador de la administración se administra antes de la administración del agente. En una forma de realización adicional, el compuesto potenciador de la administración se administra junto al agente.

Otro aspecto de la invención es una composición para administrar un agente a células, comprendiendo la composición el agente y un compuesto potenciador de la administración de Fórmula



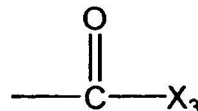
- 15 en la que:

m y n son iguales o diferentes y cada uno es un número entero de 2-8; R es un grupo catiónico o



- 20 X_1 es un grupo ácido cólico o un grupo ácido desoxiglicólico; y X_2 y X_3 se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo constituido por un grupo ácido cólico, un grupo ácido desoxiglicólico, y un grupo sacárido;

en el que al menos uno de X_2 y X_3 es un grupo sacárido cuando R es



- 25 En una forma de realización adicional, el grupo sacárido comprende uno o más restos de pentosa o hexosa. En una forma de realización adicional, el grupo sacárido se selecciona entre el grupo compuesto por grupos monosacáridos de pentosa, grupos monosacáridos de hexosa, grupos disacáridos pentosa-pentosa, grupos disacáridos hexosa-hexosa, grupos disacáridos pentosa-hexosa, y grupos disacáridos hexosa-pentosa.

- 30 En una forma de realización adicional, el grupo sacárido es un trisacárido.

En una forma de realización adicional, la concentración del compuesto potenciador de la administración está entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 2 mg/ml. En una forma de realización adicional, la concentración del compuesto potenciador de la administración está entre aproximadamente 0,2 y 2 mg/ml.

- 35 En una forma de realización adicional, el agente modula un proceso biológico en una célula cuando el agente está presente en la célula.

En una forma de realización adicional, el proceso biológico se selecciona entre el grupo compuesto por crecimiento celular, diferenciación, proliferación, una ruta metabólica o sintética, expresión génica, un procedimiento asociado a una dolencia, y una respuesta inmune. En una forma de realización adicional, el agente comprende un polinucleótido.

- 40 En una forma de realización adicional, el polinucleótido se selecciona entre el grupo compuesto por un ácido nucleico de sentido contrario, un ácido nucleico que forma un triplete, y un ácido nucleico que comprende un gen que codifica un polipéptido.

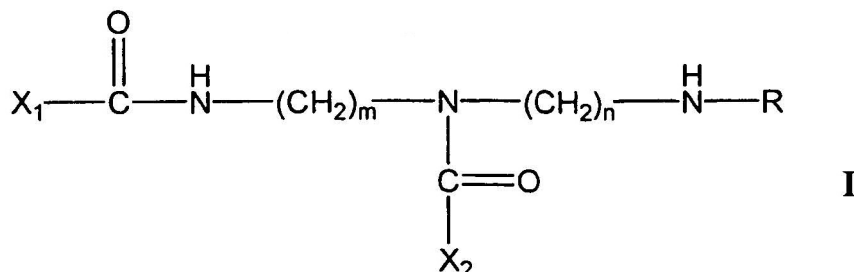
En una forma de realización adicional, el gen es un gen supresor de tumores

En una forma de realización adicional, el gen supresor de tumores se selecciona entre el grupo constituido por un

gen del retinoblastoma y un gen p53.

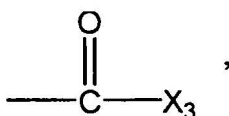
En una forma de realización adicional, la composición comprende además una matriz polimérica. En una forma de realización adicional, la composición comprende además un mucoadhesivo.

Otro aspecto de la invención es un compuesto potenciador de la administración que tiene la Fórmula I:



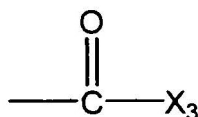
en la que:

m y n son iguales o diferentes y cada uno es un número entero de 2-8; R es un grupo catiónico o



X₁ es un grupo ácido cólico o un grupo ácido desoxiglicólico; y X₂ y X₃ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo constituido por un grupo ácido cólico, un grupo ácido desoxiglicólico, y un grupo sacárido;

en el que al menos uno de X₂ y X₃ es un grupo sacárido cuando R es



En una forma de realización adicional, R es un grupo catiónico seleccionado entre el grupo constituido por NMe³⁺ y NH⁺.

En una forma de realización adicional, el grupo sacárido comprende uno o más restos de pentosa o hexosa.

En una forma de realización adicional, el grupo sacárido se selecciona entre el grupo compuesto por grupos monosacáridos de pentosa, grupos monosacáridos de hexosa, grupos disacáridos pentosa-pentosa, grupos disacáridos hexosa-hexosa, grupos disacáridos pentosa-hexosa, y grupos disacáridos hexosa-pentosa.

En una forma de realización adicional, el grupo sacárido comprende de tres a aproximadamente ocho restos monosacáridos. En una forma de realización adicional, el grupo sacárido es un trisacárido.

En una forma de realización adicional, al menos uno de X₂ y X₃ es un grupo sacárido En una forma de realización adicional, m y n son cada uno independientemente 2 o 3. En una forma de realización adicional, ambos X₁ y X₂ son grupos ácido cólico y X₃ es un grupo sacárido.

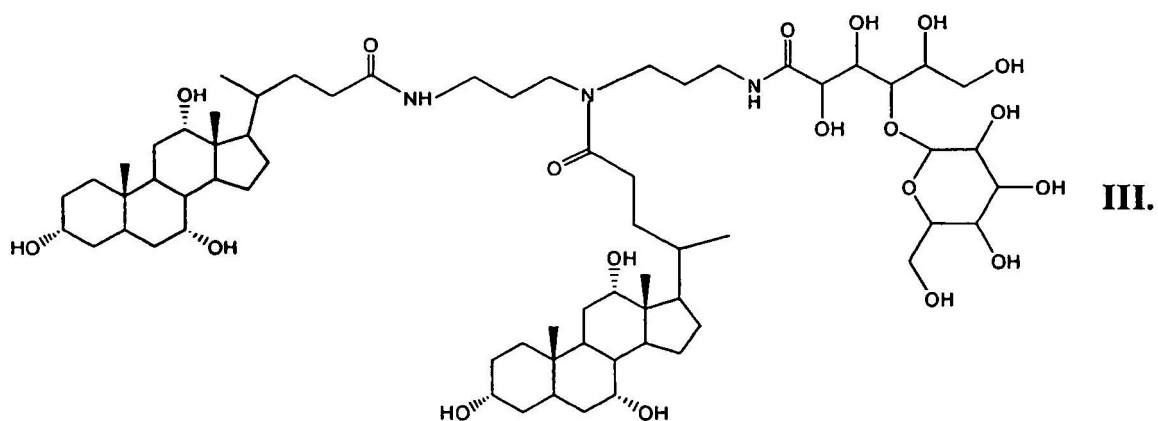
En una forma de realización adicional, el grupo sacárido es un grupo disacárido hexosa-hexosa.

En una forma de realización adicional, m y n son cada uno 3, ambos X₁ y X₂ son grupos ácido cólico, y X₃ es un grupo monosacárido de hexosa.

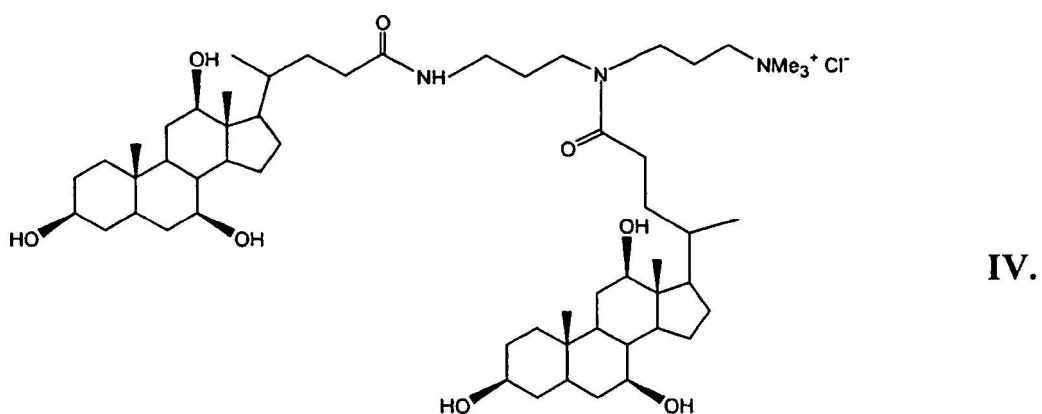
En una forma de realización adicional, m y n son cada uno 3, ambos X₁ y X₃ son grupos ácido cólico, y X₂ es un grupo monosacárido de hexosa.

En una forma de realización adicional, m y n son cada uno 3, ambos X₁ y X₂ son grupos ácido cólico, y X₃ es un grupo disacárido hexosa-hexosa.

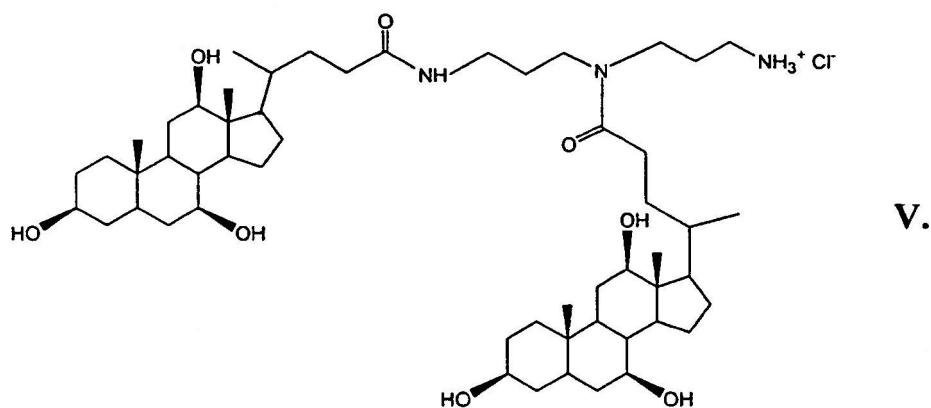
En una forma de realización adicional, m y n son cada uno 3, ambos X₁ y X₃ son grupos ácido cólico, y X₂ es un grupo disacárido hexosa-hexosa. En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la Fórmula III:



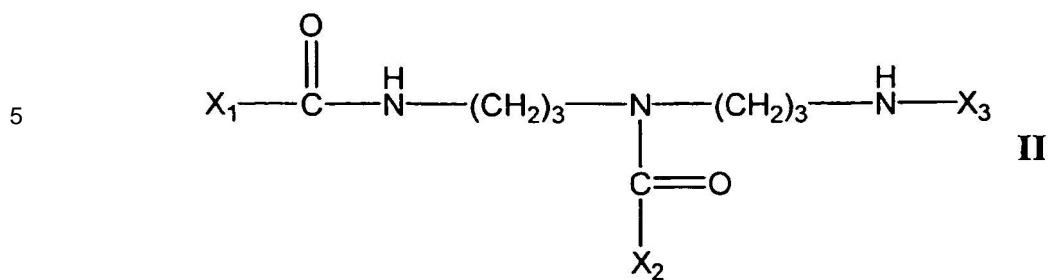
En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la Fórmula IV:



En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la Fórmula V:



Otro aspecto de la invención es un compuesto potenciador de la administración que tiene la Fórmula II:

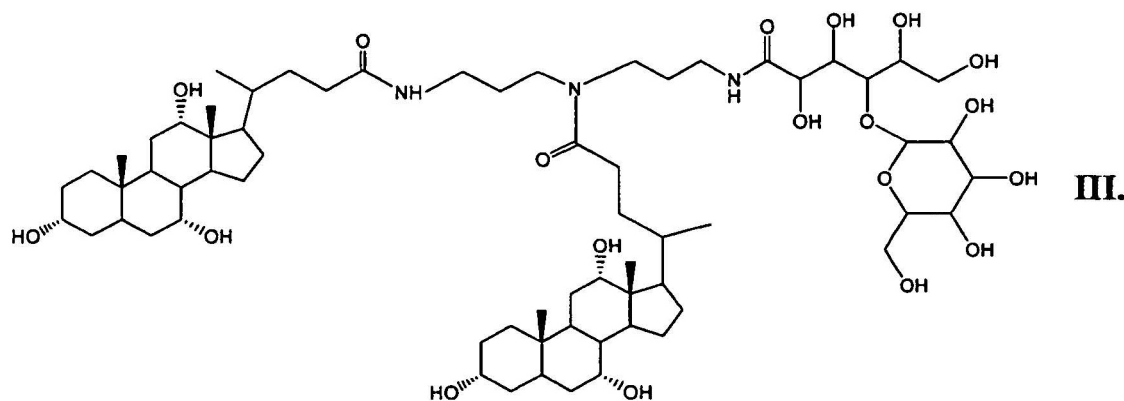


10 en la que X_1 y X_2 se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo constituido por un grupo ácido cólico y un grupo ácido desoxiglicólico y X_3 es un grupo sacárido;

En una forma de realización adicional, ambos X_1 y X_2 son grupos ácido cólico y X_3 es un grupo sacárido.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición para administrar un agente a una célula, en la que un compuesto potenciador de la administración y el agente se proporcionan por separado antes de mezclarse de manera previa a su administración a un paciente y el compuesto potenciador de la administración es un compuesto de fórmula III, que tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del compuesto potenciador de la administración es de 0,002 a 2 mg/ml y la composición comprende adicionalmente un tampón.

3.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la composición se formula para administración intravesical a la vejiga.

4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente es un agente terapéutico.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que el compuesto potenciador de la administración y el agente se mezclan antes de administrarse a un paciente.

6.- La composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que el agente es un modulador de un proceso biológico en una célula cuando el agente está presente en la célula, en la que el proceso biológico se selecciona entre el grupo que consiste en crecimiento celular, diferenciación, proliferación, una ruta metabólica o sintética, expresión génica, un procedimiento asociado a una dolencia, y una respuesta inmune.

7.- La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la proliferación es un trastorno neoplásico.

8.- La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el trastorno neoplásico es cáncer.

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en la que el agente comprende un ácido nucleico que comprende un gen que codifica un polipéptido.

10.- La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el gen codifica una citocina.

11.- La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la citocina es un alfa-interferón.

12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el gen se incorpora a un vector.

13.- La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el vector es un vector vírico recombinante.

14.- La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el vector vírico recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en un vector del virus del herpes, un vector retrovírico, un vector del virus vaccinia, un vector vírico adenoasociado y un vector adenovírico.

15.- La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el vector adenovírico tiene una delección en el gen de la proteína IX.

16.- La composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en la que el vector adenovírico comprende un promotor de CMV.

17.- La composición de acuerdo con la reivindicación 13 a 16, en la que el vector vírico se formula como una

suspensión que contiene de aproximadamente 1×10^8 partículas/ml a 5×10^{11} partículas/ml del vector vírico.

18.- La composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 17 en la que la composición es para tratar el cáncer.

19.- La composición de la reivindicación 18, en la que el cáncer es un carcinoma de vejiga.

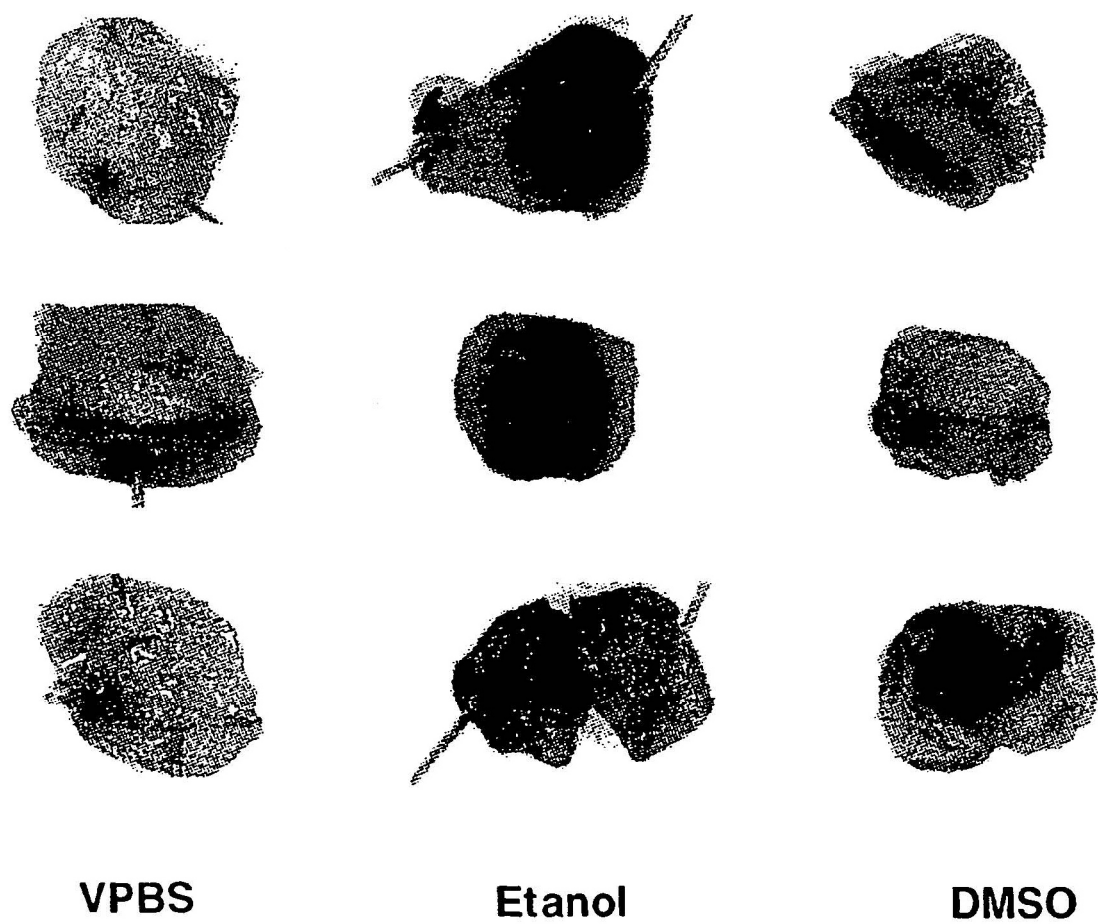


Figura 1

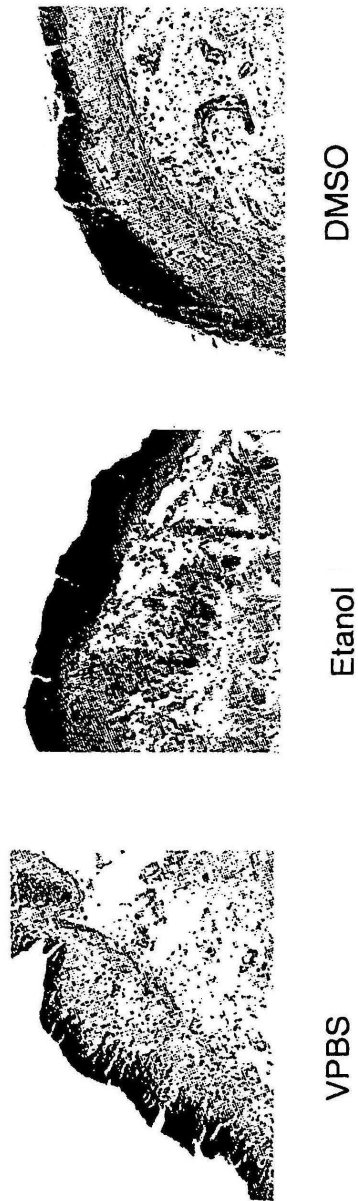


Figura 2

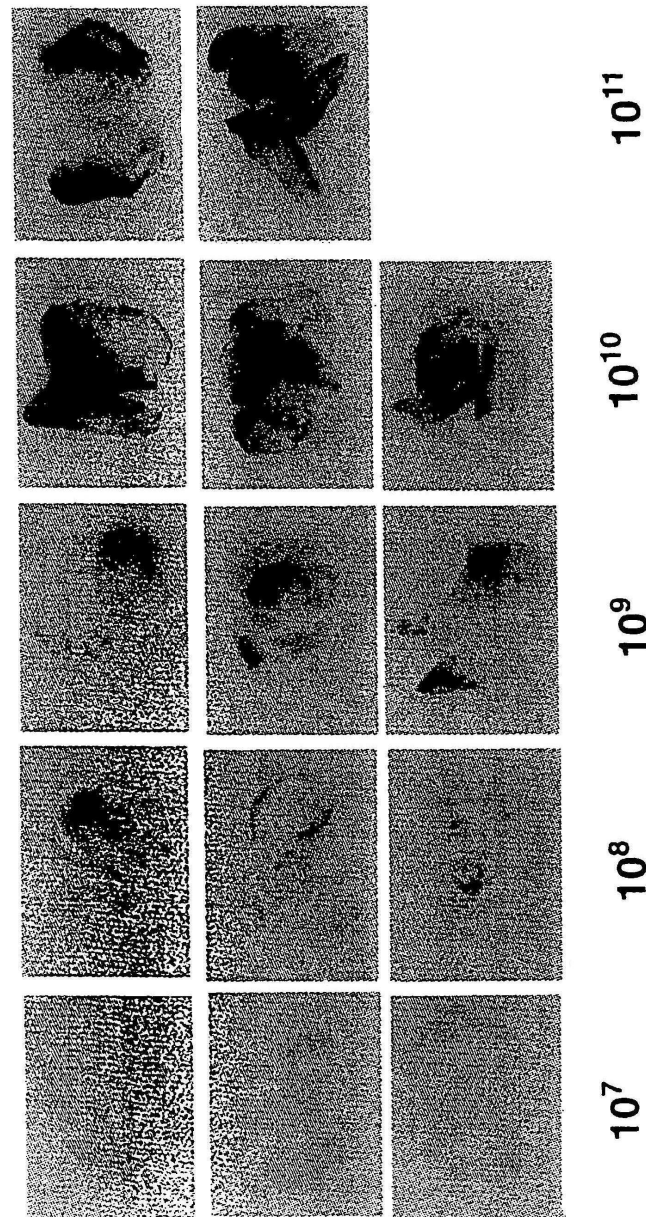


Figura 3

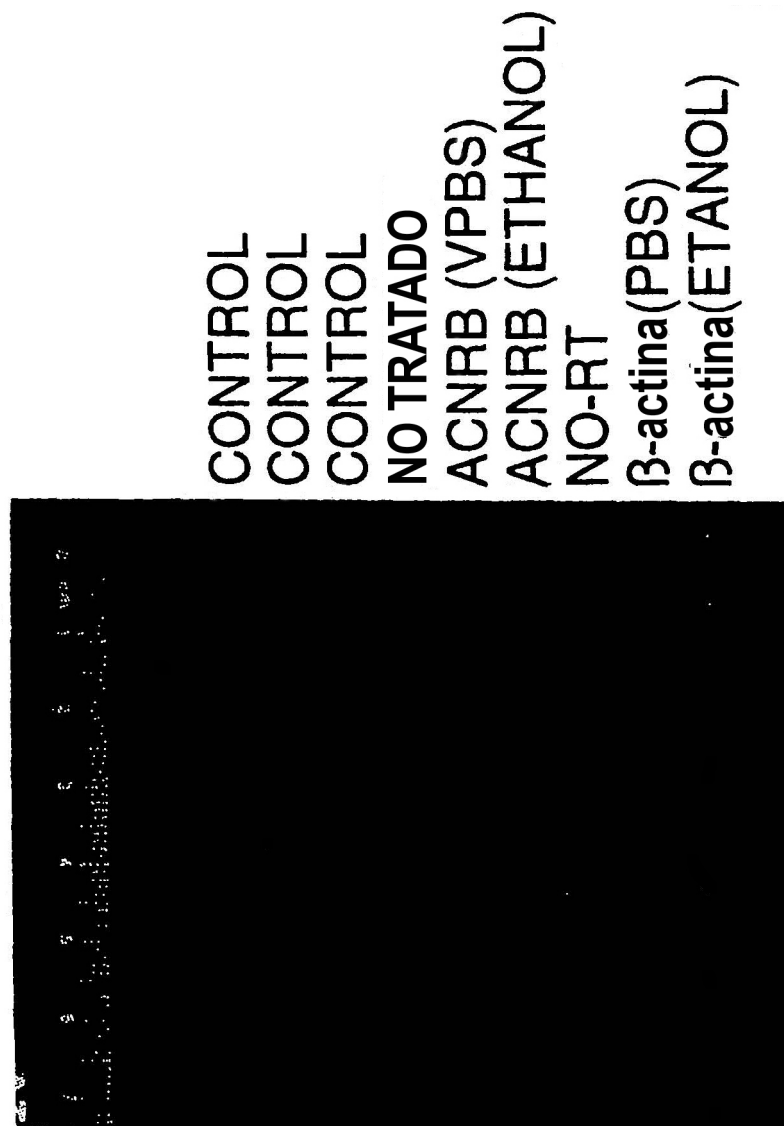


FIG. 4.

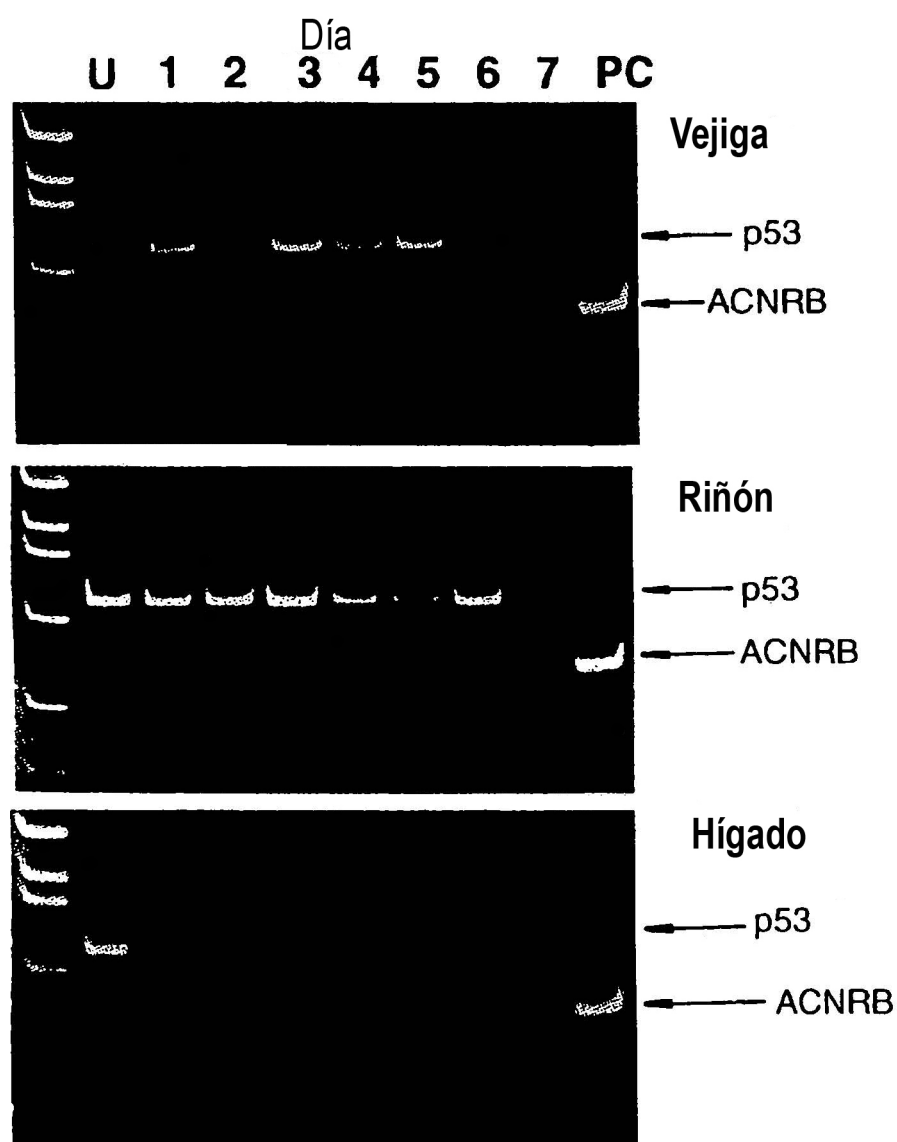


FIG. 5.

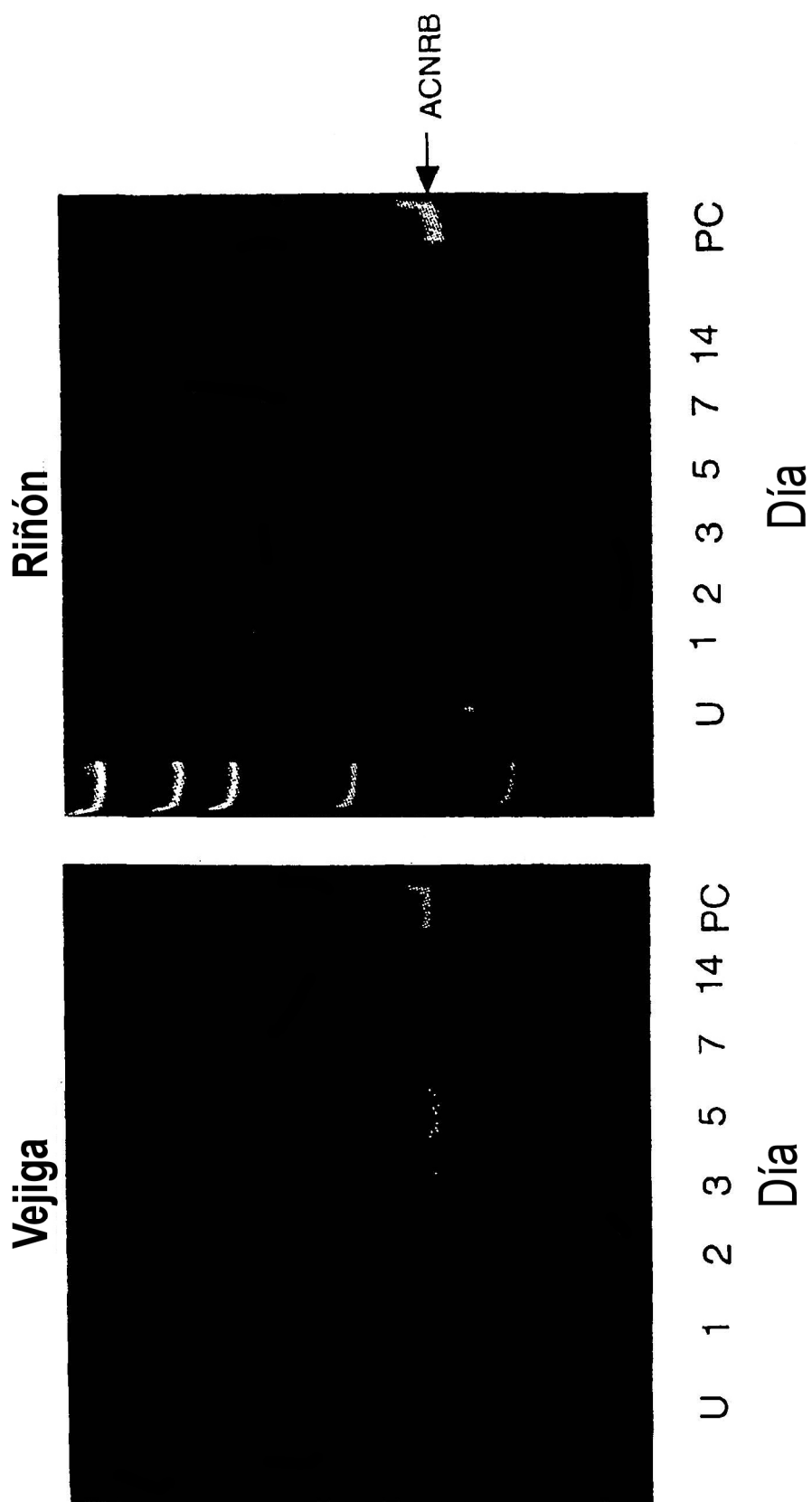


Figura 6

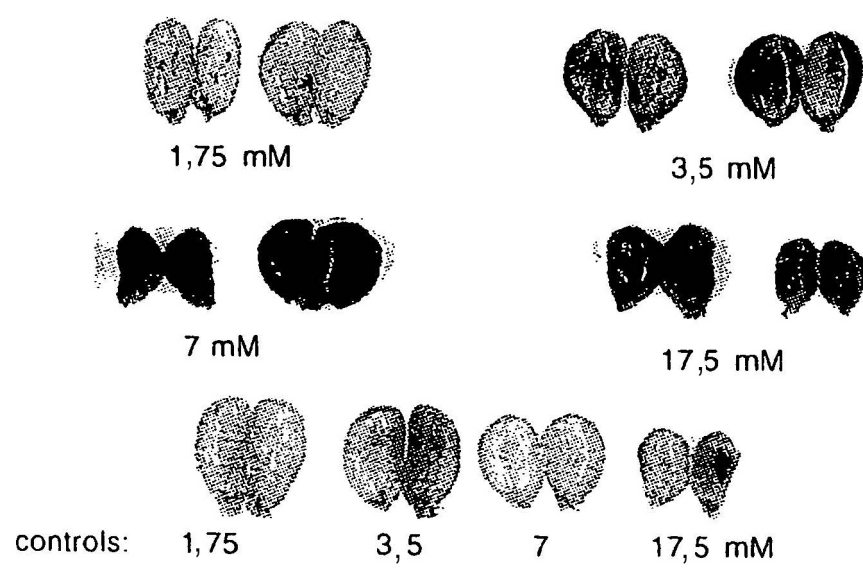


Figura 7

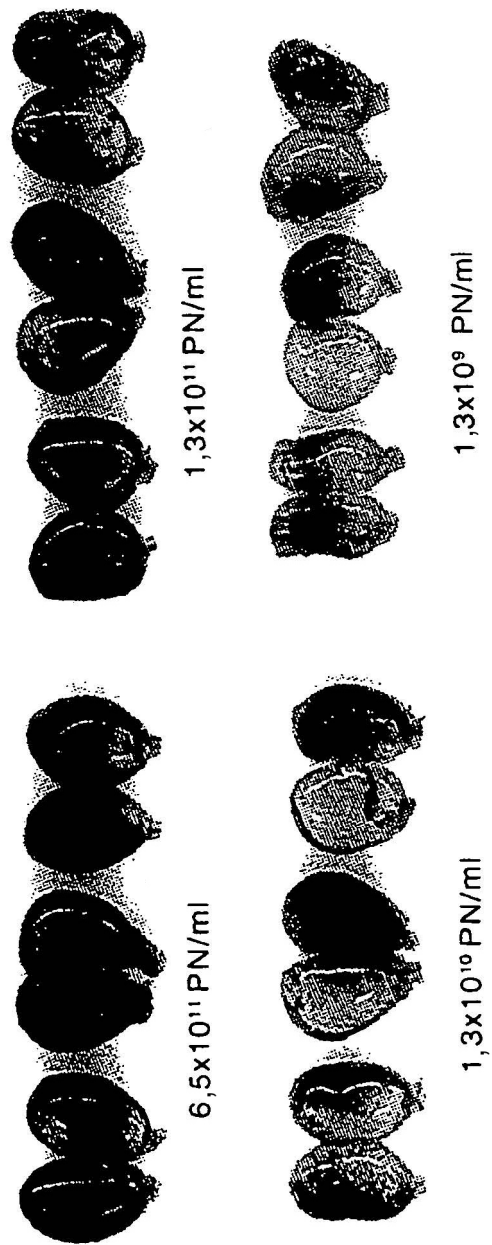


FIG. 8.

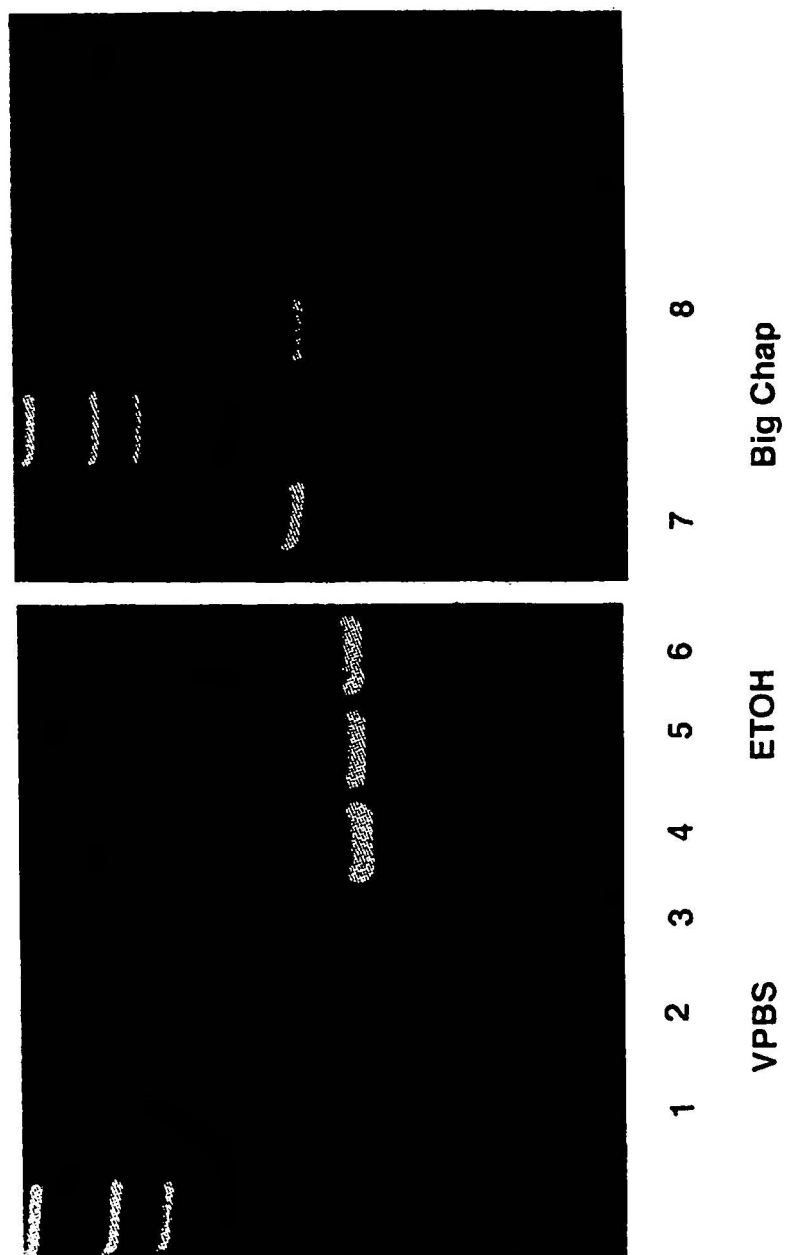


Figura 9



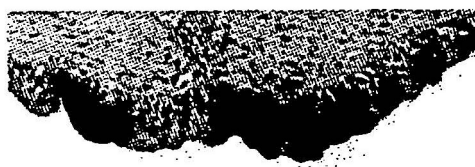
VPBS

**Big Chap
(4 mM)**

FIG. 10.



VPBS



Big Chap 7 mM

FIG. II.

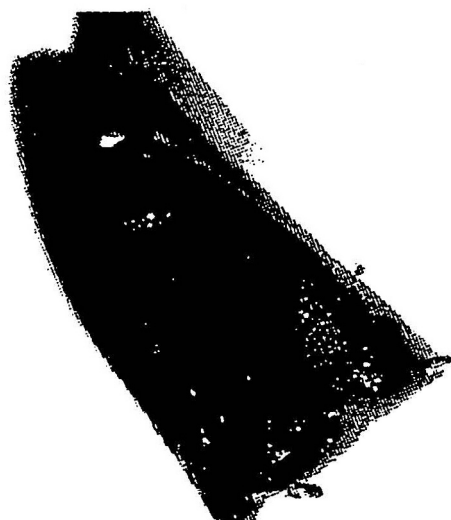


1200 X



300 X

FIG. 12.



Formulación de control



Ácido taurodeoxicólico 10 mM



rAd-βgal: en VPBS

Figura 13



Figura 14 Big Chap de Sigma no potencia la transferencia de genes

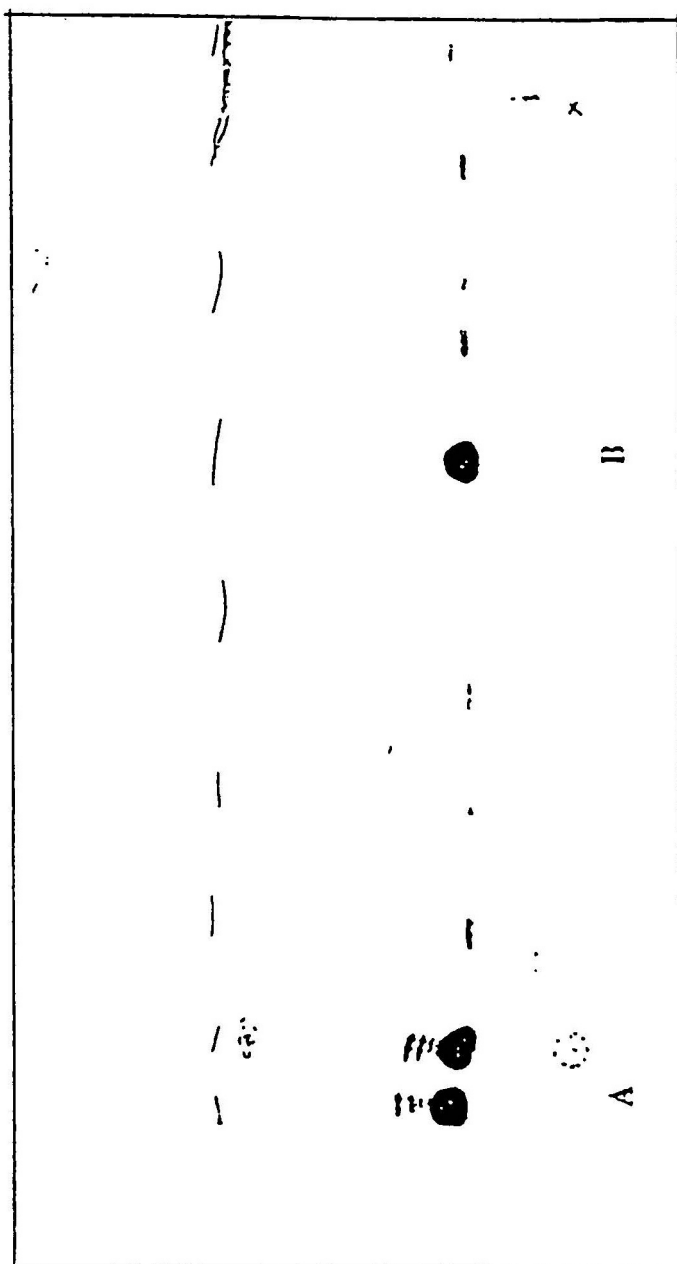


Figura 15 Cornatografía en capa fina (TLC); Big Chap (Cambiochem y Sigma)

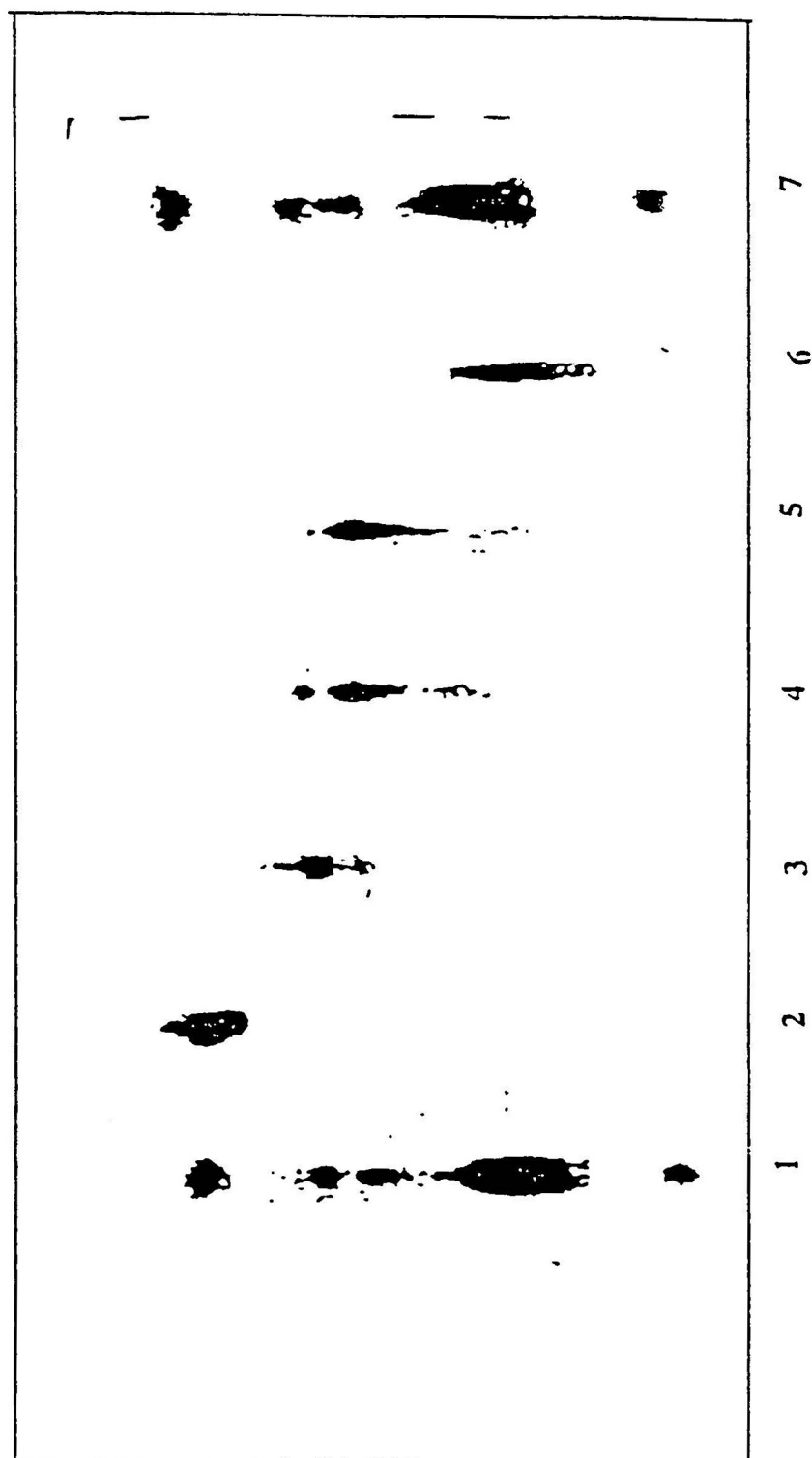


Figura 16 TLC: Big Chap e impurezas

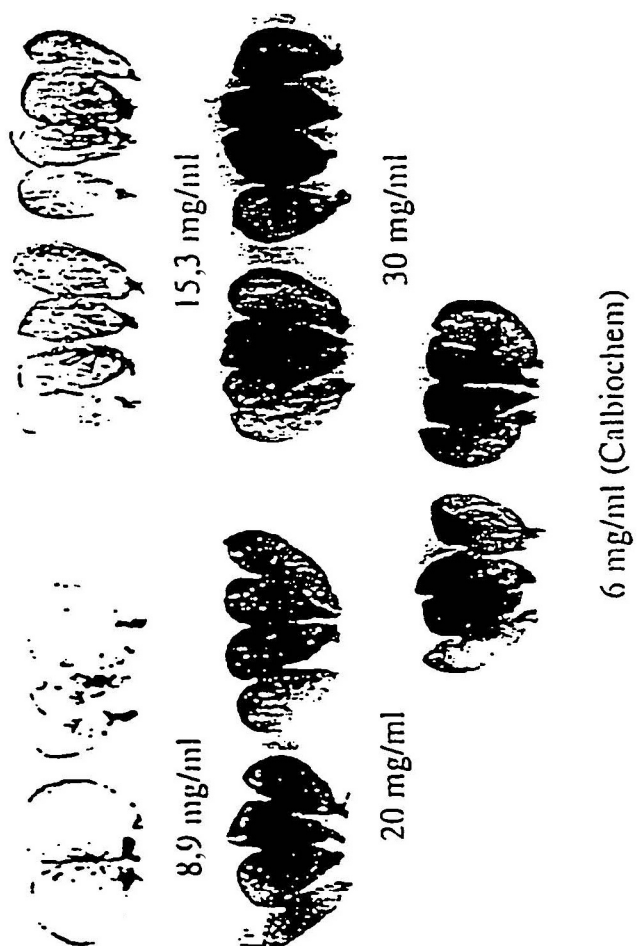


Figura 17 Las concentraciones más elevadas de Big Chap (Sigma) potencian la transferencia de genes

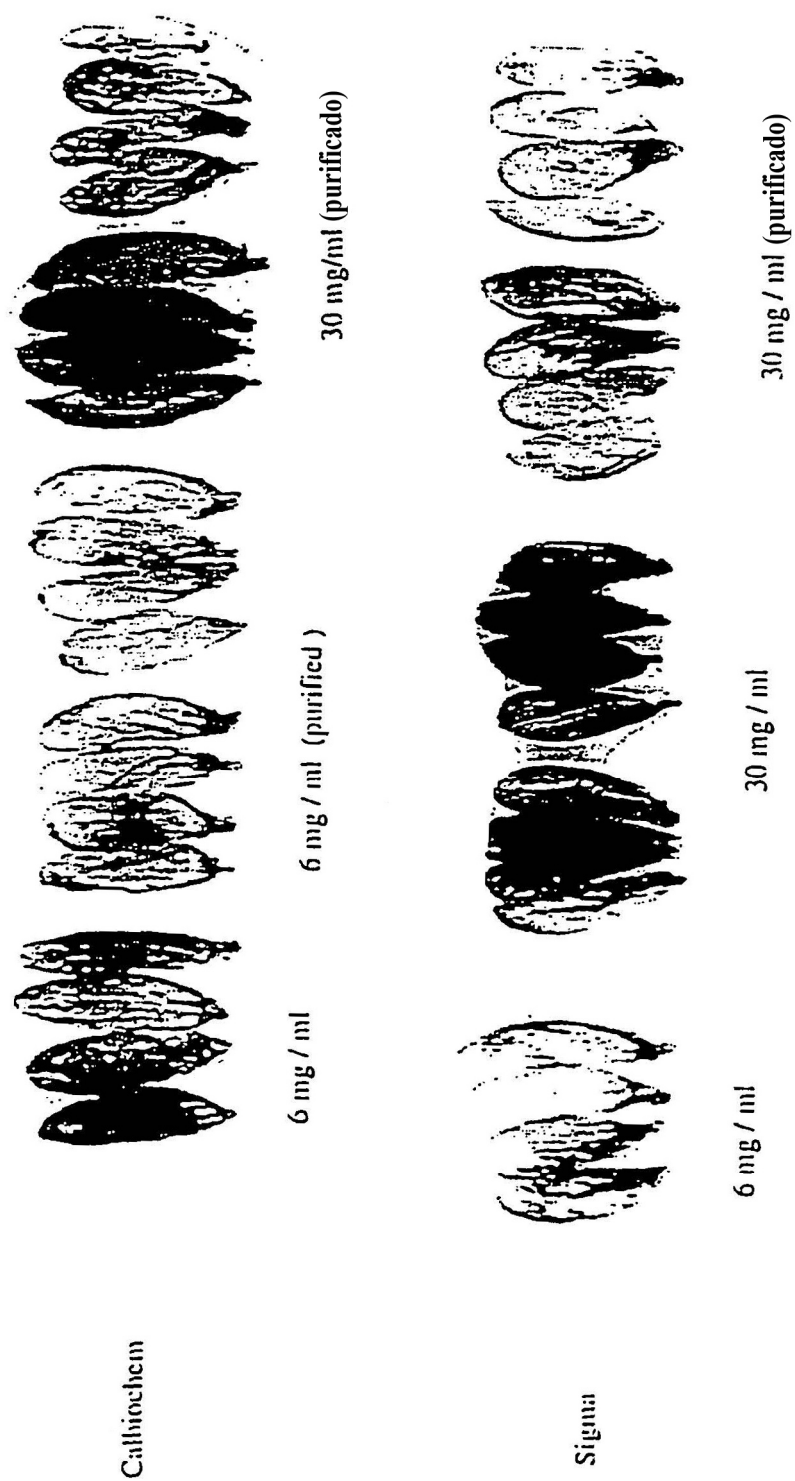


Figura 18 Actividad reducida de ambas fuentes de BC tras la purificación

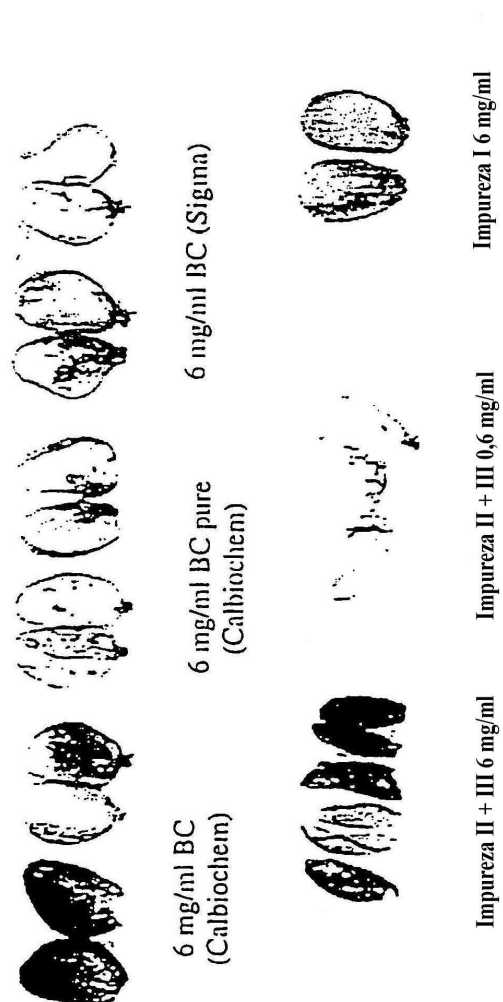


Figura 19 Las impurezas potencian la transferencia de genes mediada por rAd

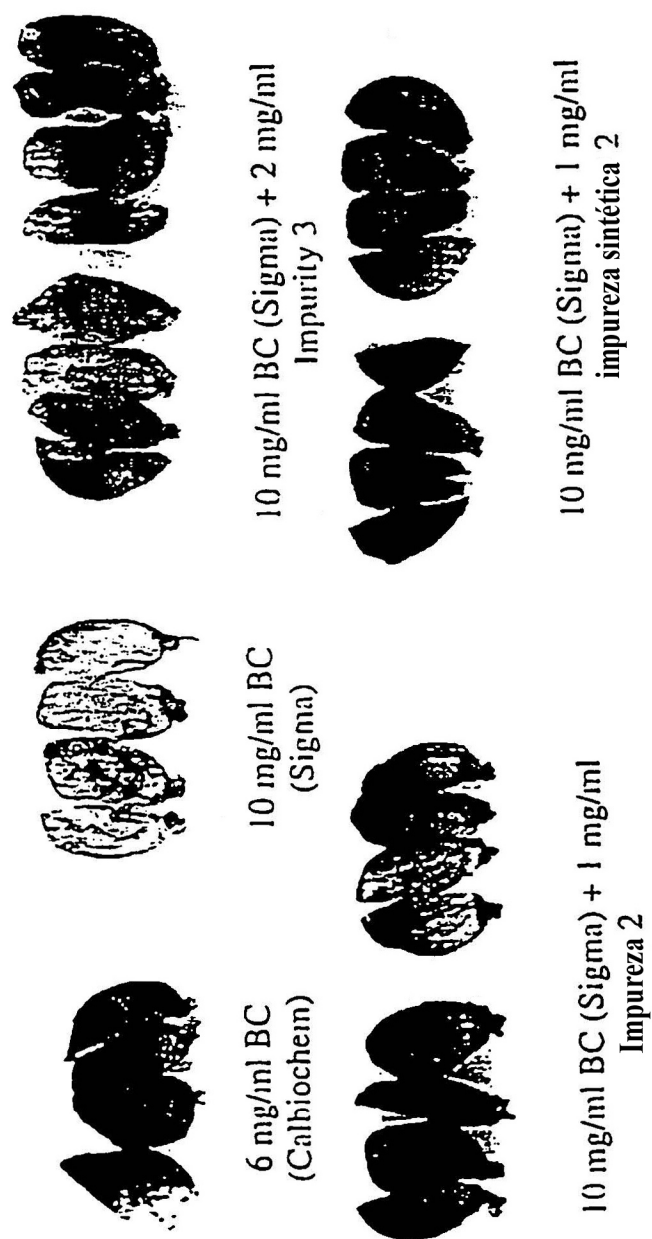


Figura 20 Transferencia de genes potenciada tras repicado de las Impurezas II o III en BC de Sigma

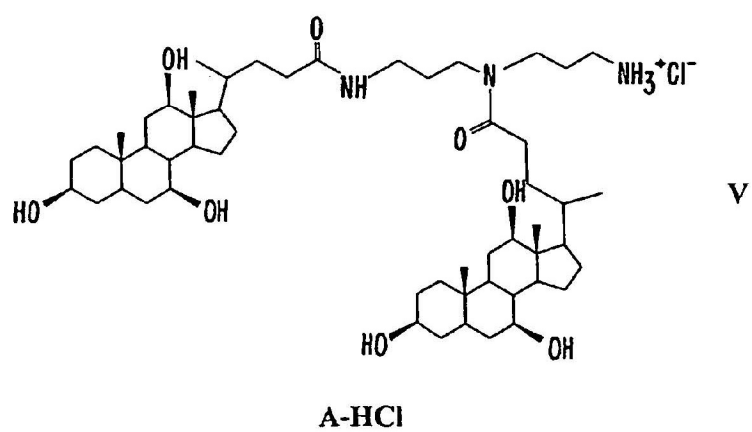
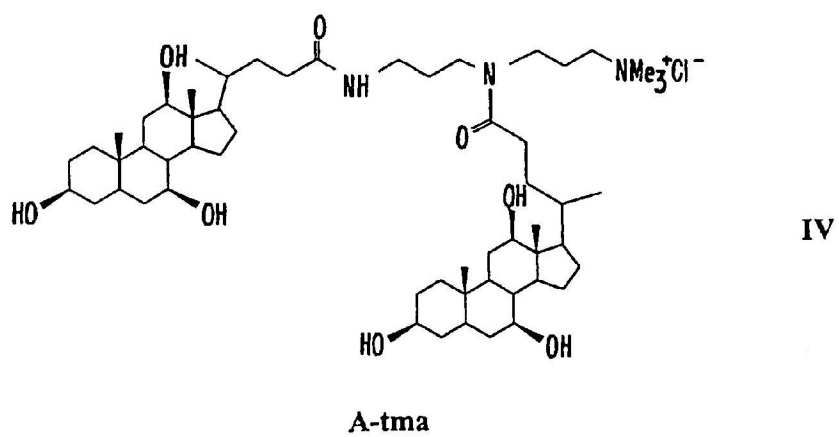
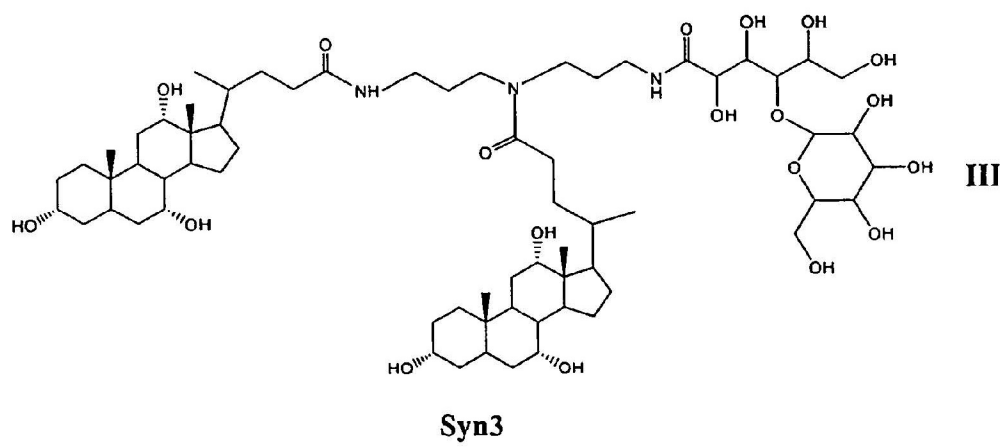
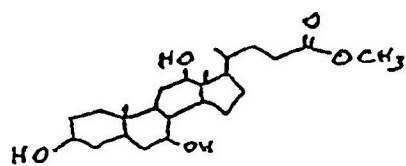
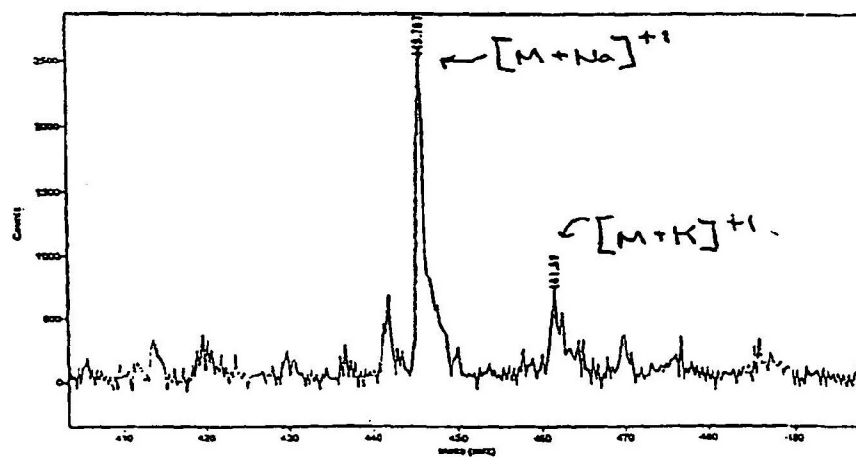


FIG. 2I.

Estructura, MALDI-EM, y RMN 1H de la Impureza 1



**espectro
de masas**



200 1

WATER: LDE 100%

Model: Linear

Applying Voltage: 2000

Grid Voltage: 54.000 V

Grade Work Value: 0.100 %

Deleg. 200 On

Year: 1920

Score Averaged 124

Pressure: 1.01e-07

Low Mats Gate: OFF

Negative ions: -36 p

RMN

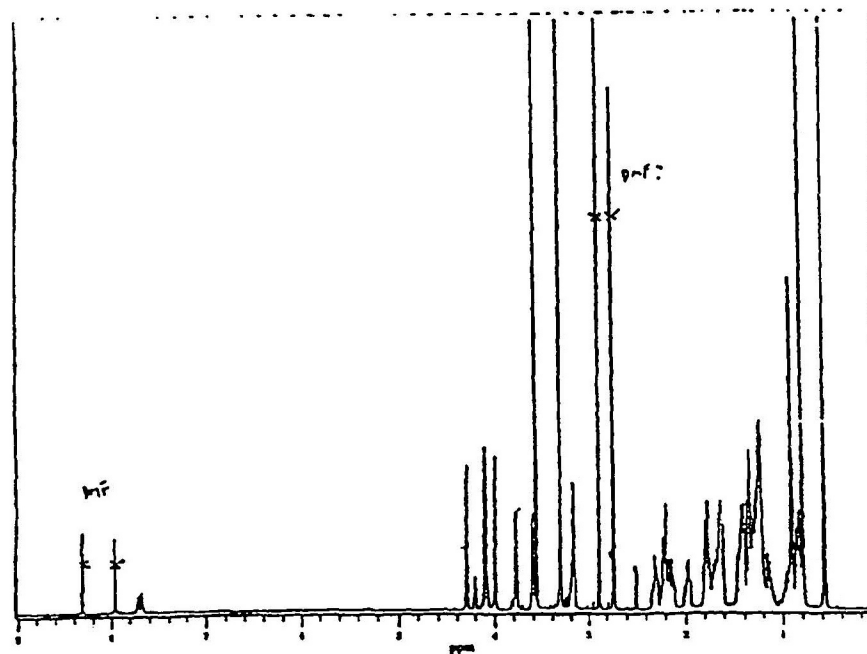


Figura 22

Estructura, MALDI-EM, y RMN 1H de la Impureza 2

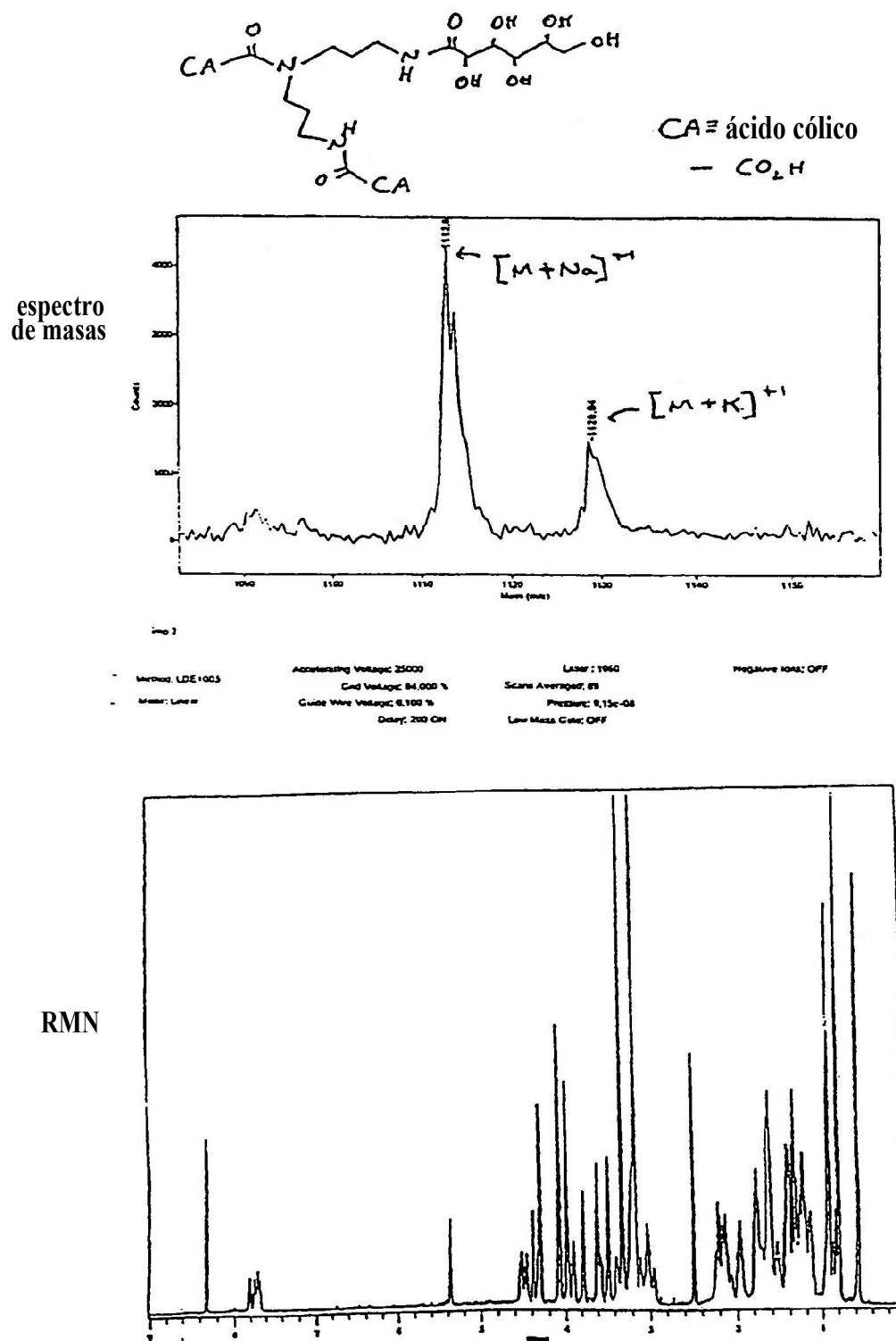
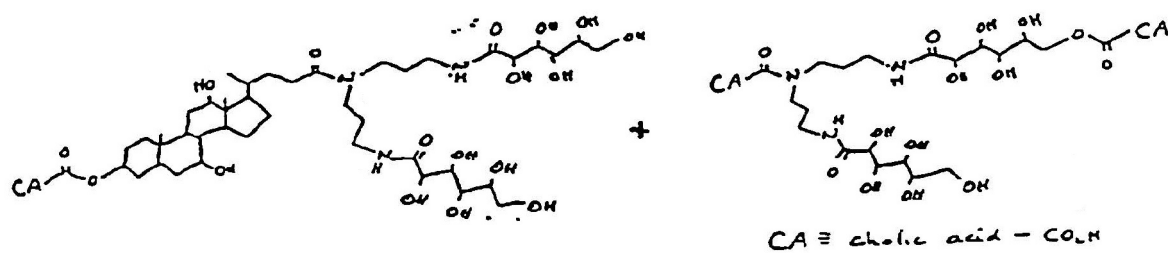
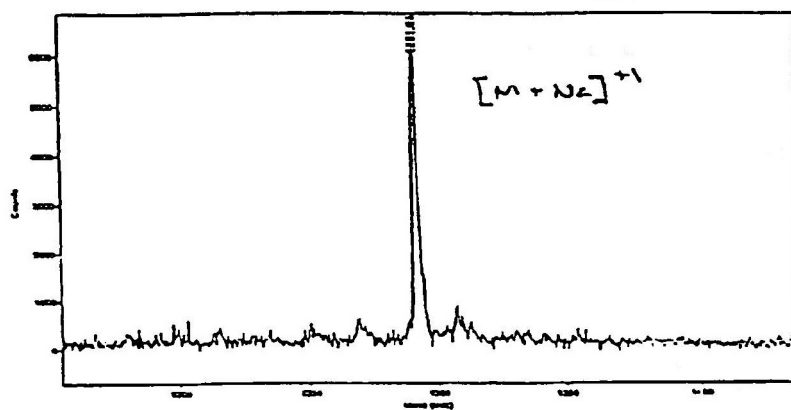


Figura 23

Estructura, MALDI-EM, y RMN 1H de la Impureza 3

espectro
de masas

Impurity 3
 Ionization: L2014000
 Acceleration Voltage: 25000
 Grid Voltage: 54.000 V
 Gun Voltage: 5.100 V
 Delay: 300 CH
 Laser: 2000
 Beam Diameter: 54
 Pressure: 0.541 mT
 Low Mass Gate: OFF
 Purge Gas Flow: OFF

RMN

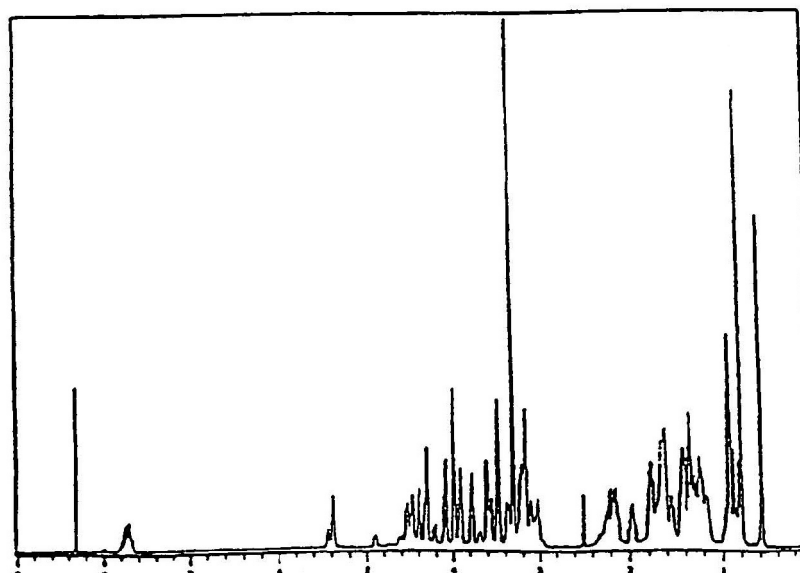


Figura 24

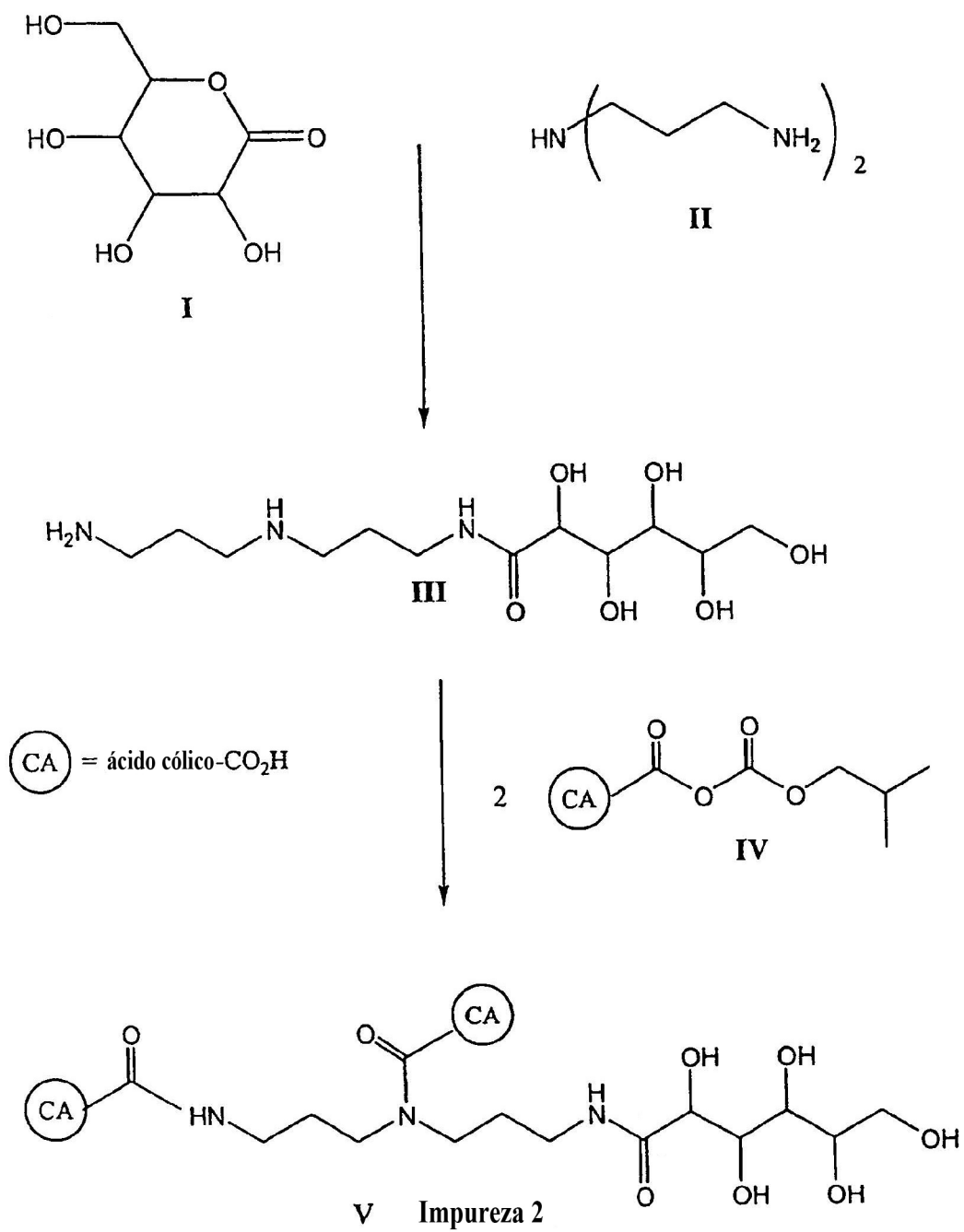


FIG. 25.

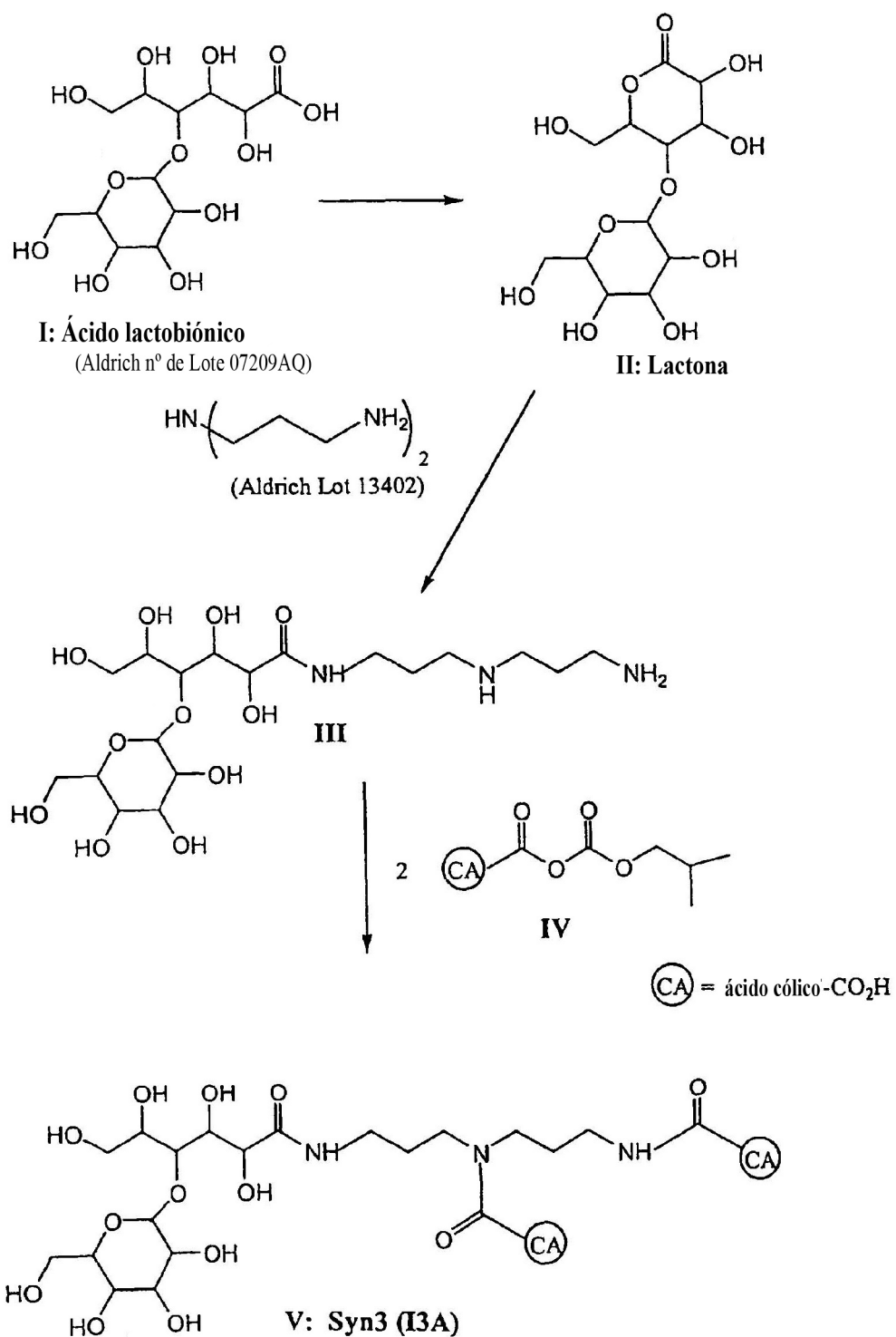


FIG. 26.

A



854



976



859



860

0,5 mg/ml de I3A en Big CHAP 7,8 mM
Calbiochem nº de lote B19546

B



977



857

Big CHAP de Calbiochem
número de lote B19546

C



978



858

Big CHAP de Calbiochem
número de lote 679793

Figura 27

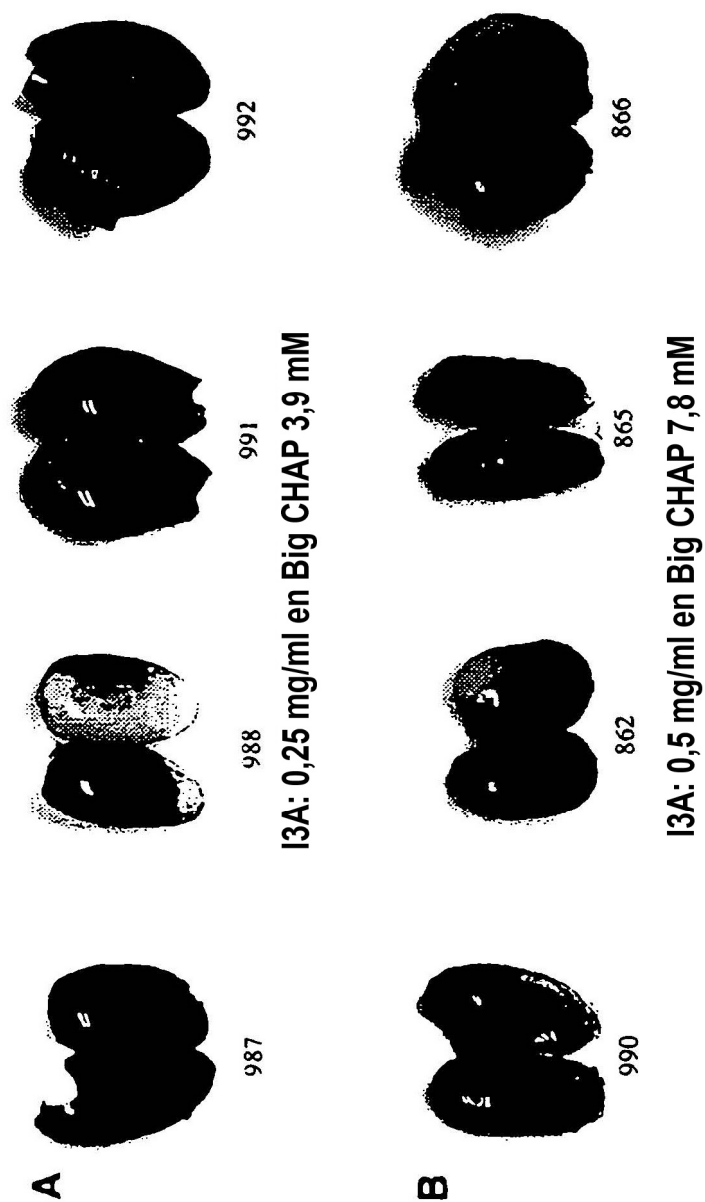


Figura 28

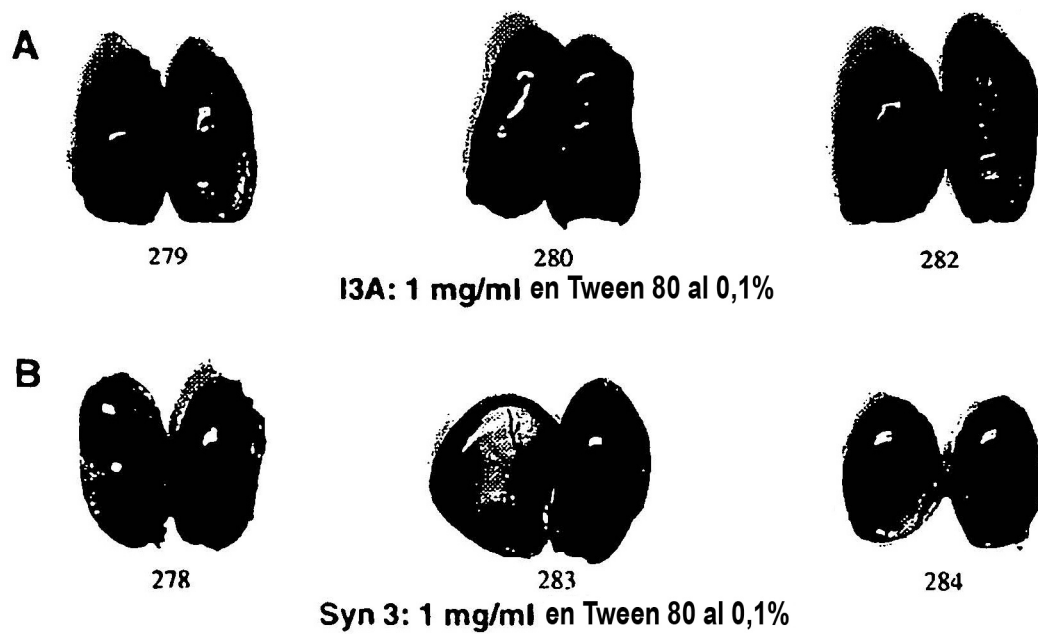


Figura 29

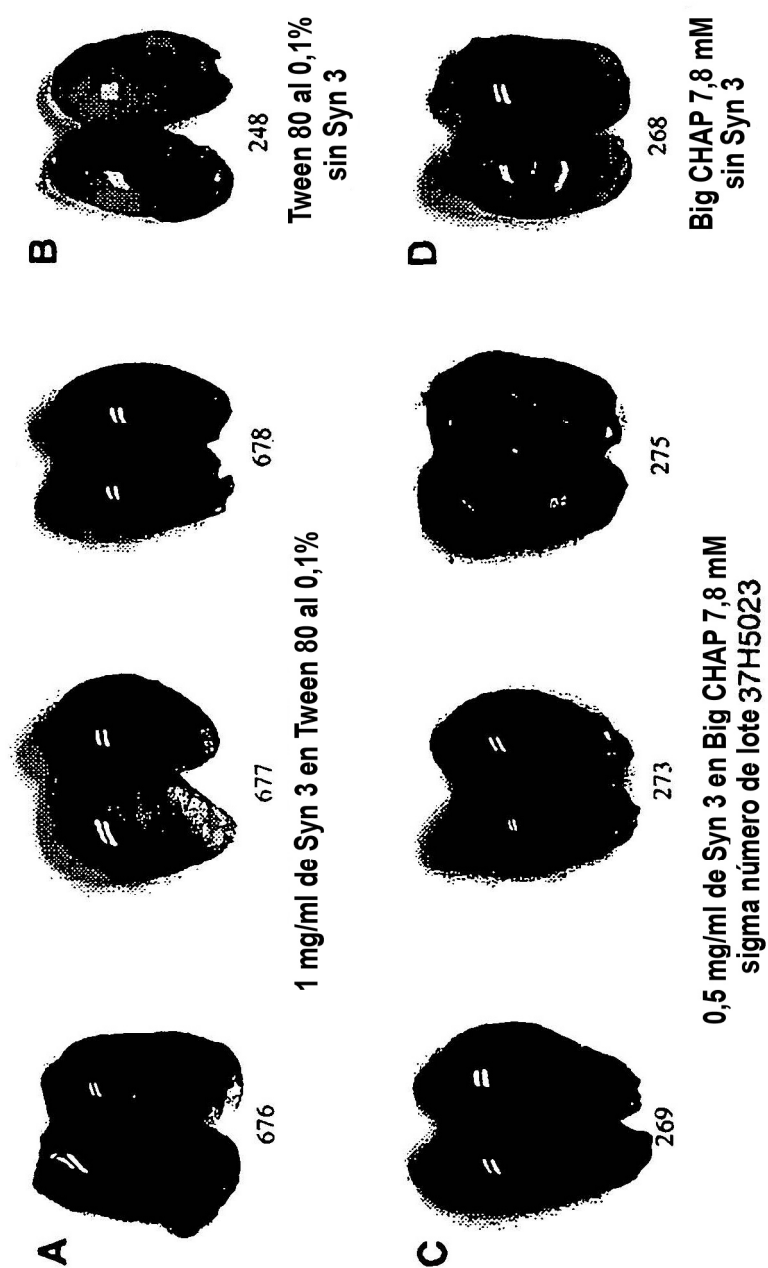


Figura 30

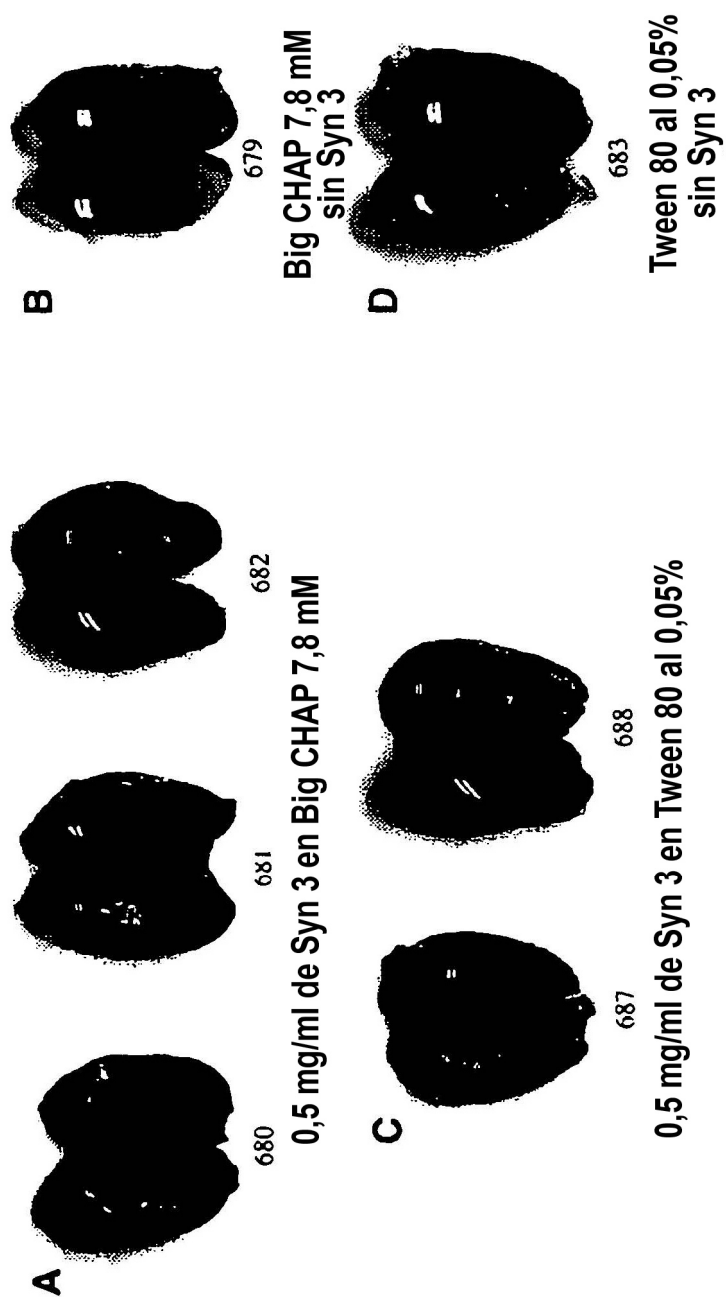


Figura 31

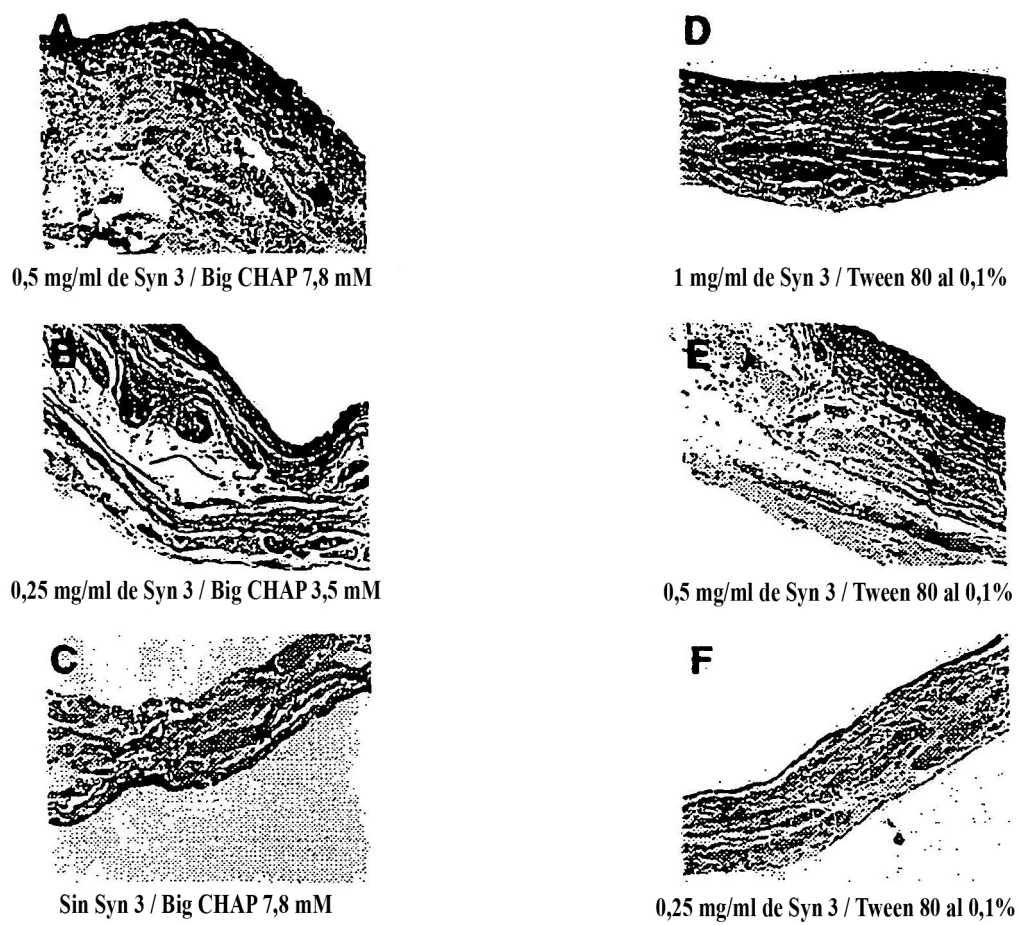


Figura 32

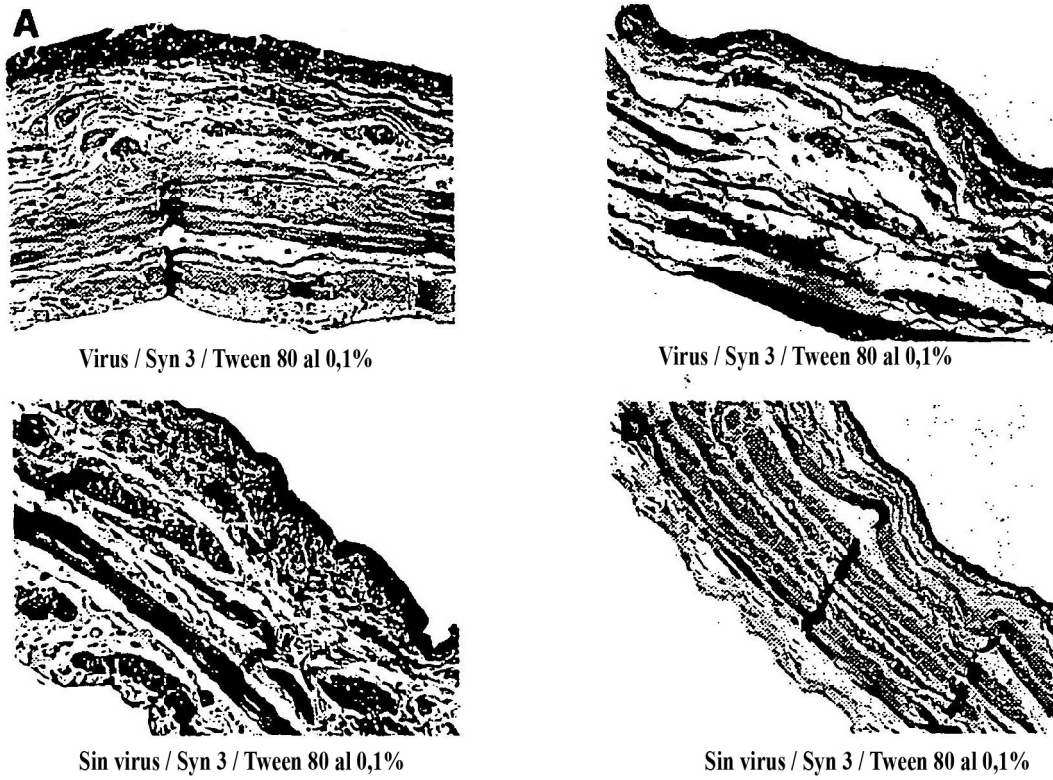


Figura 33

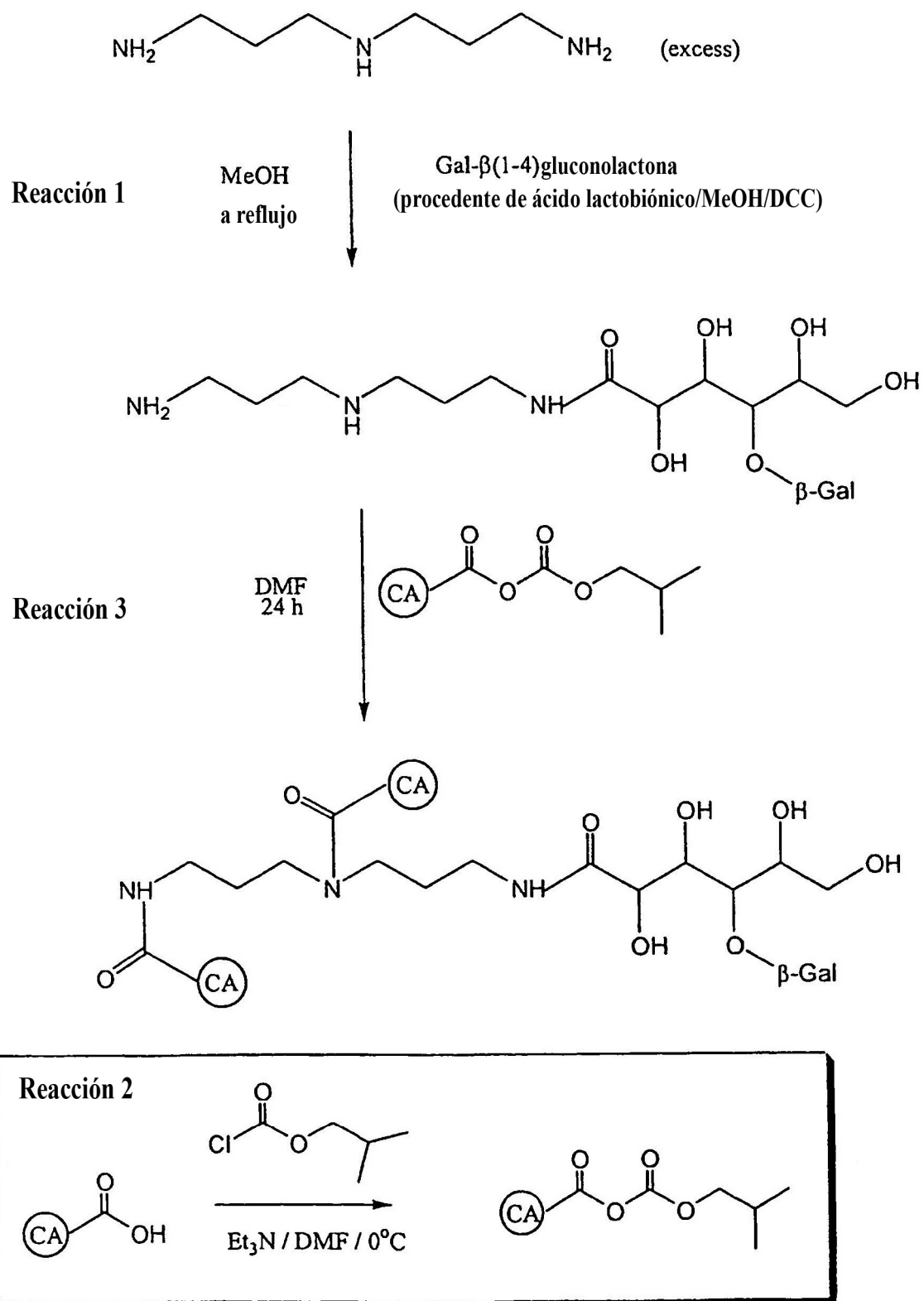


FIG. 34.

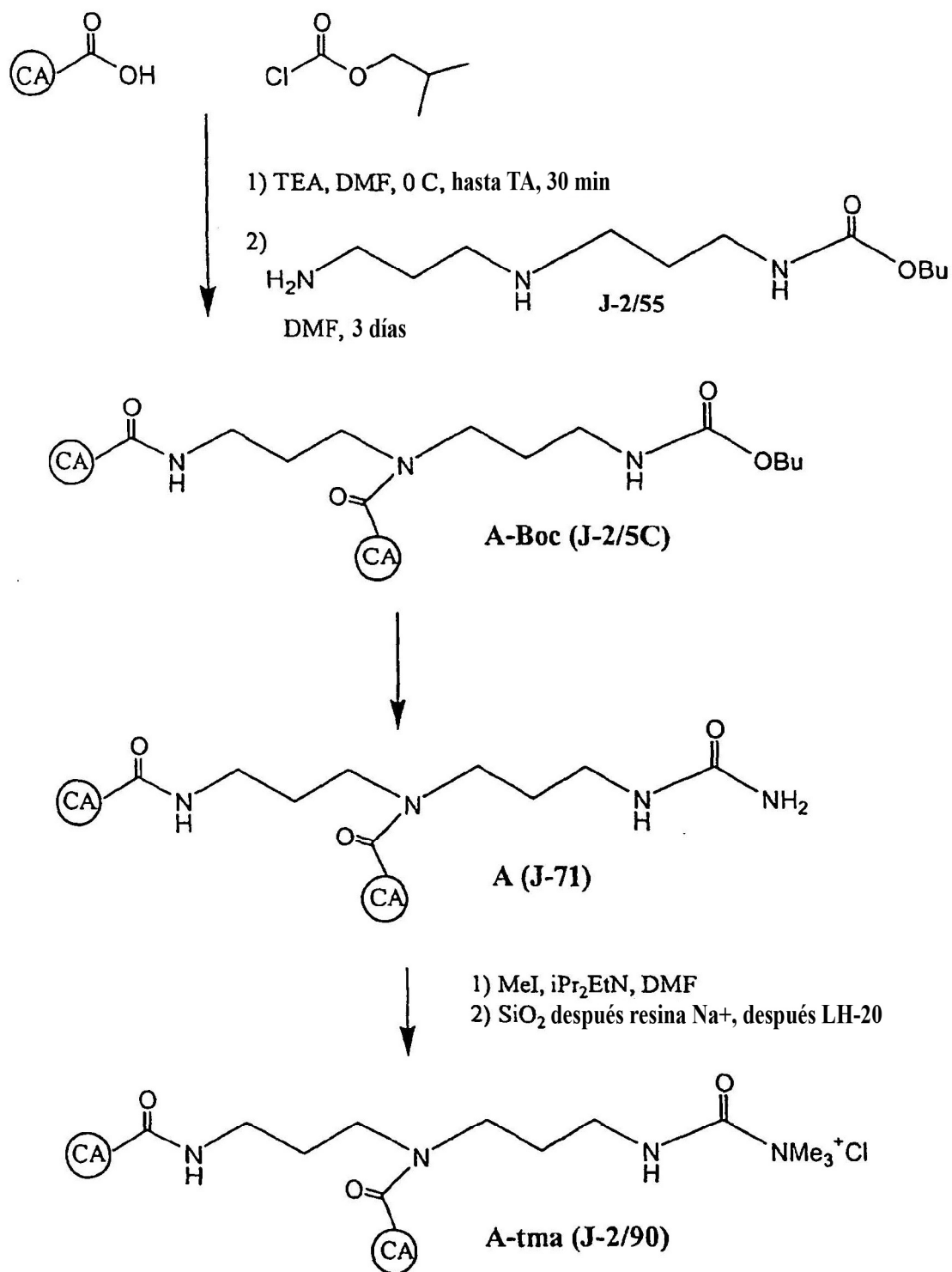


FIG 35.