



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 006**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01968346 .5**

96 Fecha de presentación : **31.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1320386**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Nuevo lipopolímero catiónico como agente de suministro de genes biocompatibles.**

30 Prioridad: **14.09.2000 US 662511**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2011

73 Titular/es: **EGEN, Inc.**
601 Genome Way, Suite 3100
Huntsville, Alabama 35806, US

72 Inventor/es: **Mahato, Ram, I.;**
Han, Sang-Oh y
Furgeson, Darin, Y.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Nuevo lipopolímero catiónico como agente de suministro de genes biocompatibles

5 ÁMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una sustancia bioactiva. Más concretamente, se refiere a una composición y a un método para la provisión de sustancias bioactivas, como, por ejemplo, ADN, ARN, oligonucleótidos, proteínas, péptidos y fármacos, mediante la facilitación de su transporte transmembranal o mediante la mejora de su adhesión a superficies biológicas. Se refiere en especial a un novedoso lipopolímero catiónico conforme a la reivindicación 1 que comprende una polietilenimina (PEI) ramificada, un ancla lipídica derivada del colesterol, y un enlazante biodegradable que une mediante enlace covalente la PEI ramificada y el ancla lipídica derivada del colesterol. Un ejemplo de un novedoso lipopolímero tal es poli{(etilenimina)-co-[N-2-aminoetil]etilenimina}-co-[N-(N-colesteriloxycarbonil-(2-aminoetil)etilenimina)] (de aquí en adelante, denominada "PEACE"). Los lipopolímeros catiónicos de la presente invención se pueden utilizar en la administración de fármacos y son especialmente útiles para administrar un ácido nucleico o cualquier sustancia bioactiva aniónica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Por lo general, la terapia génica se considera un abordaje prometedor, no sólo para el tratamiento de enfermedades que incluyen defectos genéticos, sino también para el desarrollo de estrategias para el tratamiento y la prevención de enfermedades crónicas tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la artritis reumatoide. No obstante, los ácidos nucleicos, así como otras sustancias polianiónicas, son degradados rápidamente por las nucleasas y son escasamente captados por las células cuando se administran en soluciones acuosas. Desde los primeros esfuerzos por hallar métodos de administración de ácidos nucleicos a cultivos celulares de tejidos a mediados de la década de los 50, se ha conseguido un avance sostenido en la administración de ADN, ARN y oligonucleótidos antisense funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Entre los portadores de genes empleados hasta ahora se incluyen los sistemas víricos (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, o virus herpes simples) o no víricos (liposomas, polímeros, péptidos, precipitación con fosfato cálcico y electroporación). Se ha demostrado que los vectores víricos tienen una elevada eficiencia transfectora en comparación con los vectores no víricos, pero a causa de diversas desventajas, como, por ejemplo, el hecho de que sólo se dirigen contra células en división, así como el hecho de que el ADN se inserta al azar, junto con su baja capacidad para transportar genes terapéuticos de gran tamaño, el riesgo de replicación, y la posible reacción inmune del huésped, su uso *in vivo* se ve enormemente limitado.

En comparación con los vectores víricos, los vectores no víricos son fáciles de fabricar y la probabilidad de que generen reacciones inmunes es menor; además, con ellos no se requiere replicación. Cada vez se ha prestado mayor atención al desarrollo de vectores de transferencia génica no víricos seguros y eficientes, que son o polímeros policationicos o lípidos catiónicos. Se han introducido, para uso en administración de genes, polímeros policationicos tales como la poli-L-lisina, la poli-L-ornitina y la polietilenimina (PEI), que interaccionan con el ADN formando complejos poli-iónicos. Asimismo, se ha constatado que diversos lípidos catiónicos forman lipoplejos con el ADN y que inducen la transfección eficiente de diversas células eucarióticas. De entre tales tipos de vectores sintéticos, se utilizan ampliamente los lípidos catiónicos porque resulta posible diseñar y sintetizar numerosos derivados que son excelentes en los aspectos de eficiencia en la transfección, biodegradabilidad y baja toxicidad. De entre ellos, se sabe que los derivados catiónicos del colesterol son muy útiles dada su elevada eficiencia de transfección *in vitro*. Aunque aún no se ha aclarado del todo el mecanismo de esta actividad transfectora, probablemente incluye la unión del complejo ADN/lípido a la superficie celular mediante el exceso de cargas positivas del complejo. Probablemente, los complejos unidos a la superficie celular se internalizan y el ADN se libera en el citoplasma de la célula desde un compartimento endocítico.

Sin embargo, no es posible aplicar directamente la tecnología de transfección *in vitro* a aplicaciones *in vivo*. En relación con el uso *in vivo*, el mayor problema que se produce con los lípidos diéter, tales como el cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o la lipofectina, es que no son metabolitos naturales del organismo, y por ello no son biodegradables y resultan tóxicos para las células. Además, se ha notificado que la transfección de lípidos catiónicos es inhibida por los factores presentes en el suero, y por ello, resulta ser un método ineficaz para la introducción de material genético en las células *in vivo*.

Un reactivo de transfección idóneo debería mostrar un alto nivel de actividad transfectora sin que sea necesario realizar ninguna manipulación mecánica ni física de las células o tejidos. El reactivo debería ser no tóxico, o tener una toxicidad mínima, a la dosis eficaz. Además, a fin de evitar efectos secundarios adversos duraderos en las células tratadas, debería ser biodegradable. Cuando se utilizan transportadores de genes para la administración de ácidos nucleicos *in vivo*, es esencial que los transportadores de genes en sí sean no tóxicos y que se degraden formando productos no tóxicos. Para minimizar la toxicidad del transportador de genes intacto y de los productos de

degradación de éste, el diseño de los transportadores de genes debe basarse en metabolitos que se den naturalmente.

En la Patente estadounidense N° 5283185, concedida a Epand *et al* (de aquí en adelante, la “patente 185”), se describe un método para facilitar la transferencia de ácidos nucleicos a células, y dicho método comprende la preparación de una dispersión lipídica mixta del lípido catiónico 3β[N-(N',N"-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol) con un colípido en un solvente transportador adecuado. El método descrito en la patente 185 incluye el uso de un solvente halogenado para preparar una suspensión de liposomas. En las aplicaciones farmacéuticas, no es posible eliminar de una manera práctica los residuos de los solventes halogenados de una preparación, una vez introducidos. En la Patente estadounidense N° 5753262 (de aquí en adelante, la “patente 262”), se describe el uso de una sal ácida del lípido 3β[N-(N',N"-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol) y un lípido coadyuvante (“helper”), tal como la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) o la dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), para producir una transfección eficaz *in vitro*. Además, estos lípidos catiónicos se han mostrado menos eficientes en la transferencia de genes *in vivo*.

Dada su magnitud inferior a la de las células, se ha formulado la hipótesis de que las nanopartículas mejorarían la captación en las interfaces celulares, lográndose así, en el verdadero sentido del término, un “efecto farmacológico local”. Asimismo, se ha formulado la hipótesis de que se produciría una mayor captación celular de los fármacos contenidos en nanopartículas (gracias a la endocitosis), en comparación con los fármacos libres correspondientes. Se han investigado las nanopartículas como sistemas de transporte de fármacos para situar sustancias terapéuticas en los tumores en el tratamiento del cáncer, y para administrar fármacos (sustancias antivirales o antibacterianas) a dianas intracelulares, para dirigir fármacos al sistema reticuloendotelial (en caso de infecciones parasitarias), como adyuvante inmunológico (por vía oral y subcutánea), para la administración de fármacos oculares con acción sostenida, y para el tratamiento farmacológico sistémico prolongado.

En vista de lo expuesto hasta aquí, es evidente que resulta deseable la provisión de un transportador de genes que sea no tóxico, biodegradable y capaz de formar nanopartículas, liposomas o micelas para el tratamiento génico y farmacológico. El novedoso transportador de genes de la presente invención comprende un novedoso lipopolímero catiónico que comprende una polietilenimina (PEI) ramificada, un ancla lipídica derivada del colesterol, y un enlazante biodegradable que une de manera covalente la PEI ramificada y el ancla lipídica derivada del colesterol, conforme a la reivindicación 1. El lipopolímero de la presente invención resulta útil para preparar un liposoma catiónico o una micela catiónica para la administración de fármacos, en especial para la administración de ácidos nucleicos, otras moléculas bioactivas aniónicas o ambas cosas, y es fácilmente susceptible a la degradación metabólica una vez incorporada a la célula. En la Patente estadounidense N° 5945400 se describen composiciones farmacéuticas diseñadas para transfectar ácidos nucleicos, conforme a la reivindicación 1.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un lipopolímero catiónico no tóxico biodegradable, tal y como se establece en las reivindicaciones 1 a 10. El lipopolímero presenta la ventaja de que tiene una toxicidad reducida, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la administración de fármacos u otras sustancias bioactivas a un individuo que necesite tales fármacos o sustancias.

El lipopolímero catiónico se puede usar para administrar ácidos nucleicos, y lleva a cabo con mayor eficacia la transfección tanto estable como transitoria de polinucleótidos tales como el ADN y el ARN a las células.

El lipopolímero catiónico no tóxico biodegradable de la presente invención comprende una polietilenimina (PEI) ramificada, un ancla lipídica derivada del colesterol o de ácidos grasos con una cadena C₁₂ a C₁₈, y un enlazante biodegradable que une de manera covalente la PEI ramificada y el ancla lipídica. Preferiblemente, el peso molecular promedio de la PEI ramificada está en un intervalo de 600 a 25000 Daltons. Además, el lípido catiónico comprende al menos un 50% de grupos amino libres no sustituidos funcionales. Preferiblemente, la PEI ramificada se conjuga con el ancla lipídica mediante un enlace éster. Preferiblemente, la proporción molar entre la PEI ramificada y el derivado del colesterol conjugado oscila entre 1:1 y 1:20.

Ajustando el peso molecular de la PEI ramificada y la proporción molar entre PEI ramificada y derivado del colesterol conjugado, puede hacerse que el lipopolímero resultante sea soluble en agua o insoluble en agua. Por ejemplo, para obtener un lipopolímero soluble en agua, el peso molecular promedio de la PEI ramificada debe estar, preferiblemente, entre 1800 y 25000, y la proporción molar entre la PEI ramificada y el derivado del colesterol conjugado debe estar, preferiblemente, entre 1:1 y 1:5. Para obtener un lipopolímero insoluble en agua, el peso molecular promedio de la PEI ramificada debe estar, preferiblemente, entre 600 y 1800, y la proporción molar entre la PEI ramificada y el derivado del colesterol conjugado debe estar, preferiblemente, entre 1:1 y 1:2. Aunque en la presente invención se prefiere un ancla lipídica derivada del colesterol, se pueden utilizar también otras fracciones lipófilas, como, por ejemplo, ácidos grasos saturados o insaturados con una cadena C₁₂ a C₁₈.

Los lipopolímeros biodegradables se pueden sintetizar mediante métodos relativamente simples y baratos. Los lipopolímeros catiónicos de la presente invención pueden formar espontáneamente partículas discretas de un tamaño del orden de las nanopartículas con un ácido nucleico, que pueden promover una transfección de genes en líneas celulares de mamíferos que es más eficiente que la que se puede lograr convencionalmente con lipofectina y polietilenimina. El lipopolímero de la presente invención es fácil y rápidamente susceptible a la degradación metabólica tras su incorporación a las células animales. Además, el lipopolímero catiónico soluble en agua puede formar una solución micelar acuosa que resulta particularmente útil para la administración sistémica de diversas sustancias bioactivas tales como ADN, proteínas, fármacos hidrófobos o fármacos hidrófilos. El lipopolímero catiónico insoluble puede formar liposomas catiónicos con un coadyuvante, lo que resulta particularmente útil para la administración local de fármacos. Por eso, el lipopolímero catiónico biocompatible y biodegradable de la presente invención proporciona un transportador de genes mejorado, para uso como reactivo general para la transfección de células de mamíferos y para la aplicación *in vivo* de la terapia génica.

Asimismo, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, tal y como se indica en las reivindicaciones 11 a 15. Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir formulaciones para transfección, que comprendan el lipopolímero catiónico de la presente invención, unido en forma de complejo a un ácido nucleico seleccionado y con la proporción de carga (carga positiva del lipopolímero/carga negativa del ácido nucleico) adecuada que tenga una eficacia óptima para la transfección tanto *in vitro* como *in vivo*. En concreto, para la administración sistémica, la proporción de carga (+/-) es, preferiblemente, de 5/1 a 1/1; y para la administración local, la proporción de carga (+/-) es, preferiblemente, de 3/1 a 0,5/1.

Además, la invención incluye un lipopolímero catiónico, tal y como se ha definido hasta aquí, para uso en la administración de una sustancia bioactiva a un animal de sangre caliente. La invención incluye también las composiciones farmacéuticas para uso conforme con la reivindicación 17. En la presente invención se describe un lipopolímero catiónico conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en un método para transfectar un ácido nucleico a una célula de mamífero, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dicho método comprende poner la célula en contacto con los complejos lipopolímero catiónico:ácido nucleico o liposoma catiónico:ácido nucleico que se han descrito anteriormente en esta invención. En el método se puede hacer uso de la administración sistémica de los complejos lipopolímero catiónico:ácido nucleico o liposoma catiónico:ácido nucleico a un animal de sangre caliente. En el método de transfección se puede hacer uso de la administración intravenosa de los complejos lipopolímero catiónico:ácido nucleico o liposoma catiónico:ácido nucleico a un animal de sangre caliente. En particular, el método puede comprender la inyección intravenosa de complejos PEACE/pADN y de complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN a un animal de sangre caliente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

En la FIG. 1 se ilustra un esquema de la síntesis de la poli{(etilenimina)-co-[N-2-aminoetil]etilenimina}-co-[N-(N-colesteriloxycarbonil-(2-aminoetil)etilenimina)] ("PEACE").

En la FIG. 2 se ilustra la determinación de la estructura química y el peso molecular de la PEACE 1800 insoluble en agua mediante espectros de RMN ¹H (FIG. 2A) y espectros de masas MALDI-TOF (FIG. 2B).

En la FIG. 3 se ilustra la determinación de la estructura química y el peso molecular de la PEACE 1800 soluble en agua mediante espectros de RMN ¹H (FIG. 3A) y espectros de masas MALDI-TOF (FIG. 3B).

En la FIG. 4 se ilustra la prueba de retardo en gel de complejos de PEACE soluble en agua y pCMV-Luc (FIG. 4A) y de liposomas de PEACE:DOPE y pCMV-Luc (FIG. 4B).

En la FIG. 5 se ilustra la prueba de protección, frente a la DNasa, de los complejos de PEACE soluble en agua y pCMV-Luc.

En la FIG. 6 se ilustra la prueba de viabilidad de células de adenocarcinoma de colon CT-26 tras ser transfectadas con complejos de PEACE soluble en agua y pCMV-Luc (FIG. 6A) y con complejos de liposomas de PEACE:DOPE y pCMV-Luc (FIG. 6B).

En la FIG. 7 se ilustra la prueba de actividad de la luciferasa en células de adenocarcinoma de colon CT-26 cultivadas tras ser transfectadas con complejos de PEACE soluble en agua y pCMV-Luc (FIG. 7A) y con complejos de liposomas de PEACE:DOPE y pCMV-Luc (FIG. 7B).

En la FIG. 8 se ilustra la prueba de TI-PCR de células de adenocarcinoma de colon CT-26 tras ser transfectadas *in vivo* con complejos de liposomas de PEACE:DOPE y pmlL-12.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Debe tenerse en cuenta que, tanto cuando se utilizan en esta especificación como cuando se utilizan en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular “un”, “uno”, “una”, “el”, y “la” incluyen las correspondientes formas del plural a menos que por el contexto se deba entender claramente que no. Así, por ejemplo, cuando se alude a un polímero que contiene “un azúcar”, debe entenderse que ello incluye la alusión a dos o más de tales azúcares; si se alude a “un ligando”, debe entenderse que ello incluye la alusión a dos o más de tales ligandos; y si se alude a “un fármaco”, debe entenderse que ello incluye la alusión a dos o más de tales fármacos.

En la descripción y en las reivindicaciones de la presente invención, la siguiente terminología se utilizará conforme a las definiciones que se realizan a continuación:

“Transfectar” o “transfección” significa el transporte de ácidos nucleicos desde el entorno externo a una célula hasta el entorno interno de la célula, con especial alusión al citoplasma y/o al núcleo celular. Sin limitarnos a ninguna teoría concreta, se entiende que los ácidos nucleicos se pueden administrar a las células bien en formas, bien tras ser encapsulados dentro de uno o más complejos lípido catiónico/ácido nucleico, o adheridos a dichos complejos, o englobados en los mismos. Hay instancias transfectoras concretas que hacen llegar un ácido nucleico al núcleo celular. Son ácidos nucleicos el ADN, el ARN, y los congéneres sintéticos de los mismos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser missense, antisense, nonsense, así como nucleótidos productores de proteínas, y nucleótidos activadores, desactivadores y reguladores de la velocidad que controlan la producción de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. En concreto, pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, secuencias híbridas, secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser de origen natural o artificial. Además, el ácido nucleico puede variar en tamaño: desde oligonucleótidos a cromosomas. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, vírico, y similares. Pueden obtenerse mediante cualquier técnica de las conocidas por los entendidos en la materia.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, el término “sustancia bioactiva” o “fármaco”, o cualquier otro término similar, significa cualquier material o compuesto químico o biológico adecuado para ser administrado mediante los métodos conocidos hasta la fecha presente en este ámbito del conocimiento y/o mediante los métodos que se describen en la presente invención, y que induce un efecto biológico o farmacológico deseado, que puede consistir en (1) un efecto profiláctico sobre el organismo y que evita un efecto biológico no deseado como, por ejemplo, una infección, (2) aliviar un estado ocasionado por una enfermedad como, por ejemplo, el alivio del dolor o de una inflamación causados por una enfermedad, y/o (3) aliviar o paliar una enfermedad o eliminarla por completo del organismo. El efecto puede ser local, como cuando se proporciona un efecto anestésico local, o sistémico.

Esta invención no se refiere a fármacos novedosos o a clases nuevas de sustancias bioactivas, sino que se limita a las composiciones y métodos de administración de genes u otras sustancias bioactivas ya existentes en este ámbito del conocimiento o que puedan identificarse posteriormente como sustancias activas y que resultan adecuadas para administrarse conforme a la presente invención. Entre tales sustancias están las amplias clases de compuestos que se administran normalmente al organismo. Incluyen, en general: ácidos nucleicos, tales como el ADN, el ARN y los oligonucleótidos; sustancias que combaten las infecciones, como los antibióticos y los antivirales; analgésicos y combinaciones de analgésicos; sustancias anoréxicas; antihelmínticos; antiartríticos; antiasmáticos; anticonvulsivos; antidepresivos; antidiabéticos; antidiarreicos; antihistamínicos; antiinflamatorios; preparados contra la migraña; sustancias contra las náuseas; antineoplásicos; fármacos contra el Parkinson; antipruríticos; antipsicóticos; antipiréticos; antiespasmódicos; anticolinérgicos; simpatomiméticos; derivados de las xantinas; preparados de uso cardiovascular, como el potasio, los bloqueantes de los canales del calcio, los betabloqueantes, los alfabloqueantes y los antiaritmicos; antihipertensivos; diuréticos y antidiuréticos; vasodilatadores: generales, coronarios, periféricos y cerebrales; estimulantes del sistema nervioso central; vasoconstrictores; preparados para la tos y los resfriados, incluidos los descongestivos; hormonas, tales como el estradiol y otros esteroides, incluidos los corticosteroides; hipnóticos; inmunosupresores; relajantes musculares; parasimpaticolíticos; psicoestimulantes; sedantes; y tranquilizantes. Mediante el método de la presente invención pueden administrarse fármacos en todas sus formas, es decir, ionizados, no ionizados, como bases libres y como sales con ácidos añadidos, y fármacos con peso molecular bajo o alto.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, el término “cantidad eficaz” significa una cantidad no tóxica de ácido nucleico o de sustancia bioactiva y que resulta suficiente para brindar el efecto local o sistémico deseado, así como el comportamiento deseado, con una proporción riesgo/beneficio razonable que es la que comportaría cualquier tratamiento médico.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, el término “péptido” significa péptidos de cualquier longitud, lo que incluye a las proteínas. Los términos “polipéptido” y “oligopéptido” se utilizan en esta invención sin denotar ninguna limitación de tamaño intencionada concreta, a menos que se indique un tamaño concreto. Los péptidos típicos que se pueden utilizar son los seleccionados del grupo que comprende oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica, factor de crecimiento epidérmico, prolactina, luliberina u hormona liberadora de

hormona luteinizante, hormona del crecimiento, factor de liberación de la hormona del crecimiento, insulina, somatostatina, glucagón, interferón, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, renina, bradisinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, así como los análogos sintéticos, las modificaciones y los fragmentos farmacológicamente activos de dichos péptidos, los anticuerpos monoclonales y las vacunas solubles. La única limitación que se puede imponer en relación con qué fármacos a base de péptidos o proteínas se deben utilizar es la de su funcionalidad.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, un “derivado” de un hidrato de carbono incluye, por ejemplo: una forma ácida de un azúcar, como pueda ser el ácido glucurónico; una amina de un azúcar, como la galactosamina; un fosfato de un azúcar, como, por ejemplo, una manosa-6-fosfato.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, el término “liposoma” significa una vesícula microscópica compuesta de una bicapa o bicapas uni o multilaminares que rodea o rodean a compartimentos acuosos.

Conforme al uso que de él se hace en la presente invención, el término “administrar”, y términos similares, significa hacer llegar la composición al individuo a quien se está tratando, de una manera tal que se hace que la composición sea capaz de circular sistémicamente y de unirse a una célula diana, donde es captada por endocitosis. Así, la composición se administra al individuo preferiblemente de una manera sistémica: habitualmente, mediante administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Los inyectables para dicho uso se pueden preparar en formas convencionales, como solución o como suspensión, o en una forma sólida que resulte adecuada para su preparación como solución o suspensión en un líquido previamente a su inyección, o bien, como emulsión. Entre los excipientes adecuados están, por ejemplo, el agua, la solución salina, la dextrosa, el glicerol o el etanol; y, si se desea, se pueden añadir cantidades pequeñas de sustancias auxiliares como, por ejemplo, sustancias humectantes o emulsificadoras, y tampones.

Para que la terapia génica tenga éxito, es fundamental desarrollar vehículos de administración de genes que sean seguros y eficaces tras su administración sistémica. Se demostró que muchos de los lípidos catiónicos que se utilizaron en pruebas clínicas tempranas, como, por ejemplo, el cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y el 3β[N-(N,N"-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol(DC-colesterol), eran eficientes para la transferencia génica *in vitro*, pero menos eficientes para la transferencia génica en animales. Véase Felgner PL *et al*, Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417 (1987); y Gao, X. y Huang L. (1991), A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 280-285.

La estructura general de un lípido catiónico tiene tres partes: (i) un *ancla lipídica hidrófoba*, que ayuda a formar liposomas (o estructuras micelares) e interacciona con las membranas celulares; (ii) un *grupo enlazante*; y (iii) un *grupo de cabeza, cargado positivamente*, que interacciona con el plásmido, conduciendo a la condensación de éste. Se han utilizado para la transfección en diversos tipos de células muchos compuestos que tienen un único grupo terciario o un grupo de cabeza amonio cuaternario o que contienen poliaminas protonables unidas a un lípido dialquilo o a anclas de colesterol. Se ha demostrado que la orientación del grupo de cabeza poliamina en relación al ancla lipídica influye enormemente en la eficiencia de transfección. Asimismo, se ha demostrado que la conjugación de grupos de cabeza espermina o espermidina al ancla lipídica derivada del colesterol mediante una unión carbamato a través de una amina secundaria, a fin de generar lípidos catiónicos con forma de T, resulta muy eficaz en la transferencia de genes al pulmón. En cambio, la generación de un lípido poliamínico lineal mediante la conjugación de espermina o espermidina con colesterol o con un ancla lipídica dialquilo se mostró mucho menos eficaz para la transferencia de genes.

Se ha demostrado que un lípido catiónico que contenga tres aminas protonables en su grupo de cabeza es más activo que el DC-colesterol, que contiene únicamente una amina protonable. Además, se ha constatado que, además del número de aminas protonables, la elección del grupo enlazante que enlaza el ancla lipídica hidrófoba con el grupo de cabeza catiónico influye también en la actividad de transferencia génica. Sustituyendo el enlazante carbamato con urea, una amida o una amina, se produjo una pérdida apreciable de la actividad transfectora. Se ha demostrado que la PEI es muy eficaz en la transferencia de genes, y que ésta depende del peso molecular y la proporción de carga de la PEI. No obstante, la PEI de alto peso molecular es muy tóxica para las células y los tejidos.

El lipopolímero catiónico biodegradable comprende una polietilenimina (PEI) ramificada, un ancla lipídica derivada del colesterol, y un enlazante biodegradable que une mediante enlace covalente la PEI ramificada y el ancla lipídica derivada del colesterol. Preferiblemente, el peso molecular promedio de la PEI ramificada está en el intervalo de 600 a 25000 Daltons. Preferiblemente, la PEI ramificada se conjuga con el derivado del colesterol mediante un enlace éster. Un ejemplo de este novedoso lipopolímero es la poli{(etilenimina)-co-[N-2-aminoetil]etilenimina}-co-[N-(N-colesteriloxycarbonil-(2-aminoetil)etilenimina)] (de aquí en adelante, denominada “PEACE”). Las aminas primarias, secundarias y terciarias de la PEI contenida en la PEACE proporcionan suficientes cargas positivas para una

condensación adecuada del ADN. La unión entre el grupo de cabeza polar y el ancla lipídica hidrófoba es biodegradable, pero lo suficientemente fuerte para sobrevivir en un entorno biológico. La unión éster entre el ancla lipídica derivada del colesterol y la polietilenimina posibilita la biodegradación del lipopolímero, y la PEI ramificada de peso molecular relativamente bajo reduce notablemente la toxicidad de dicho lipopolímero. Aunque en esta invención se prefiere un ancla lipídica derivada del colesterol, se pueden utilizar también otras fracciones lipófilas, como, por ejemplo, ácidos grasos saturados o insaturados de cadena C₁₂ a C₁₈.

El lipopolímero catiónico biodegradable, tal como la PEACE, tiene un grupo amino o varios grupos amino que es/son atraído(s) electrostáticamente por compuestos polianiónicos tales como los ácidos nucleicos. El lipopolímero catiónico o el liposoma catiónico pueden condensar el ADN, formando, por ejemplo, estructuras compactas. Tras su administración, los complejos formados por estos lipopolímeros catiónicos y ácidos nucleicos se internalizan en las células mediante la endocitosis mediada por receptores. Además, el grupo lipófilo del lipopolímero o liposoma permite insertar el anfífilo catiónico en la membrana o liposoma de la célula y actúa como ancla para que el grupo amino catiónico se fije a la superficie de la célula. Los lipopolímeros aquí descritos tienen un grupo o varios grupos con una carga positiva muy alta, así como un grupo o varios grupos hidrófilo(s), que mejoran mucho la captación celular y tisular en el proceso de administración de genes, fármacos y otras sustancias bioactivas. Además, el uso de la PEI ramificada de peso molecular relativamente bajo reduce la citotoxicidad potencial del polímero y aumenta la eficiencia de transfección.

Los grupos amino de la PEI ramificada se pueden conjugar también con grupos amino directamente o mediante moléculas espaciadoras, así como con ligandos dirigidos a dianas, y con enlazantes tales como el polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero aprobado por la FDA, del que se sabe que inhibe la inmunogenicidad de las moléculas a las que está unido. Sólo una parte de los grupos amino disponibles se unen al ligando o al espaciador/ligando, de manera que la carga neta del lipopolímero es positiva. El peso molecular promedio del PEG está en el intervalo de 0,5 a 20 KDaltons, y más preferiblemente, en el intervalo de 0,5 a 5 KDaltons.

Los ligandos dirigidos a dianas conjugados con el lipopolímero dirigen al complejo lipopolímero-ácido nucleico/fármaco para que se una a células diana específicas y para que penetre en dichas células (células tumorales, células hepáticas, células hematopoyéticas, y similares). Los ligandos dirigidos a dianas pueden ser también un elemento dirigido a dianas intercelulares, lo que permite guiar la transferencia del ácido nucleico/fármaco hacia ciertos compartimentos celulares preferidos (mitocondria, núcleo, etc.). En una forma de realización preferida de la presente invención, los ligandos pueden ser fracciones azúcares unidas a grupos amino. Tales fracciones azúcares son, preferiblemente, monosacáridos u oligosacáridos, como, por ejemplo, galactosa o manosa.

Otros tipos de ligandos que es posible utilizar son, entre otros, los siguientes: péptidos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, receptores celulares, receptores de factores de crecimiento, receptores de citoquinas, transferrina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato (monocitos), manosa (macrófagos, algunas células B), Lewis^x y sialil-Lewis^x (células endoteliales), N-acetil-lactosamina (células T), galactosa (células de carcinoma de colon), y trombomodulina (células endoteliales de pulmón de ratón); sustancias fusogénicas tales como la polimixina B y la hemaglutinina HA2; sustancias lisosomotrópicas; y señales de localización del núcleo (SLN) tales como el antígeno T.

Una ventaja de la presente invención es que proporciona un transportador de genes y el tamaño de partícula y la densidad de carga se pueden controlar con facilidad. El control del tamaño de partícula resulta crucial para la optimización del sistema de administración de genes, ya que a menudo el tamaño de partícula determina la eficiencia de transfección, la citotoxicidad y la dirección a dianas tisulares *in vivo*. En general, para hacer posible su penetración eficaz en el tejido, el tamaño de una partícula de administración de genes no debe superar el tamaño de un virus. En la presente invención, se puede hacer variar el tamaño de partícula empleando diferentes números de lisinamidas unidas al colesterol, lo que a su vez determina el tamaño de partícula del complejo de ácido nucleico.

En una forma de realización preferida de la invención, los tamaños de partícula oscilan entre 80 y 200 nm, en función de la composición del lipopolímero catiónico y de la proporción de mezcla de los componentes. Se sabe que las partículas, las nanosferas y las microesferas de diversos tamaños, cuando se inyectan en el organismo, se acumulan en diferentes órganos del mismo en función del tamaño de dichas partículas inyectadas. Por ejemplo, las partículas de diámetro inferior a 150 nm, tras su administración sistémica, son capaces de pasar a través de los sinusoides fenestrados del endotelio del hígado, para terminar localizándose en el bazo, en la médula ósea y posiblemente en los tejidos tumorales. La inyección intravenosa, intra-arterial o intraperitoneal de partículas de un tamaño aproximado de 0,1 a 2,0 µm conduce a un aclaramiento rápido (retirada) de dichas partículas del torrente sanguíneo, por parte de los macrófagos del sistema reticuloendotelial. Los novedosos lipopolímeros catiónicos de la presente invención se pueden utilizar para fabricar dispersiones con tamaño de partícula controlado, que se pueden dirigir hacia diversos órganos de la manera aquí descrita.

Se cree que la composición descrita en las presentes reivindicaciones resulta eficaz para administrar, mediante endocitosis, un ácido nucleico seleccionado a los hepatocitos; dicha administración estaría mediada por los

receptores del galactosilo situados en la superficie de los hepatocitos. La transferencia de ácidos nucleicos a otras células puede llevarse a cabo emparejando una célula que tenga un receptor celular seleccionado con un azúcar seleccionado. Por ejemplo, los lípidos catiónicos, conjugados con hidratos de carbono, de la presente invención, pueden prepararse utilizando manosa para transfectar macrófagos, utilizando N-acetil-lactosamina para transfectar células T, o utilizando galactosa para transfectar células de carcinoma de colon.

Los lipopolímeros catiónicos aquí descritos pueden brindar un lípido catiónico de carga positiva muy alta que es biodegradable y anfífilo, y que concretamente está compuesto de PEI ramificada hidrófila y de derivados del colesterol hidrófobos; la PEI policationica hidrófila forma complejos con ácidos nucleicos de carga negativa o con otras sustancias bioactivas y aumenta la captación celular de lípidos catiónicos cargados con fármacos. El grupo hidrófilo puede ser PEI ramificada, estando el peso molecular promedio de dicha PEI ramificada entre 600 y 25000 Daltons. El grupo hidrófobo es, preferiblemente, un colesterol o un derivado del colesterol. Preferiblemente, la PEI ramificada se conjuga con el derivado del colesterol mediante un enlace éster. La proporción molar entre PEI ramificada y derivado del colesterol está, preferiblemente, en un intervalo de 1:1 a 1:20.

Ajustando el peso molecular de la PEI ramificada y la proporción molar entre PEI ramificada y derivado del colesterol, el lipopolímero resultante puede ser soluble o insoluble en agua. Por ejemplo, para obtener un lipopolímero soluble en agua conforme a la presente invención, el peso molecular promedio de la PEI ramificada oscila, preferiblemente, entre 1800 y 25000 Daltons, y la proporción molar entre la PEI ramificada y el derivado del colesterol conjugado oscila, preferiblemente, entre 1:1 y 1:5. Para obtener un lipopolímero insoluble en agua conforme a la presente invención, el peso molecular promedio de la PEI ramificada oscila, preferiblemente, entre 600 y 1800 Daltons, y la proporción molar entre la PEI ramificada y el derivado del colesterol conjugado oscila, preferiblemente, entre 1:1 y 1:2.

Los lipopolímeros catiónicos solubles en agua son dispersables en agua y forman micelas catiónicas; por lo tanto, se pueden utilizar para fabricar formulaciones de liberación sostenida de fármacos, sin que sea necesario utilizar temperaturas altas o condiciones de pH extremas, y en el caso de fármacos solubles en agua como los polipéptidos y los oligonucleótidos, sin exponer el fármaco a solventes orgánicos durante las formulaciones. Tales lipopolímeros catiónicos biodegradables resultan también útiles para fabricar formulaciones inyectables, de liberación continua y sostenida, de fármacos. Pueden actuar como sustancias dispersantes muy eficientes y se pueden administrar mediante inyección a fin de proporcionar una liberación sostenida de fármacos lipófilos.

Además, los lipopolímeros insolubles en agua se pueden utilizar por sí solos o, preferiblemente, en una mezcla con un lípido coadyuvante en forma de formulaciones de liposomas catiónicos, para hacer llegar genes a órganos concretos del cuerpo humano o de cuerpos de animales. Cuando la proporción de carga (grupos amino/fosfatos) es baja, resulta especialmente ventajoso utilizar lípidos coadyuvantes neutros. Preferiblemente, el lípido coadyuvante es una sustancia seleccionada del grupo que comprende:

dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE),
oleoilpalmitoilfosfatidiletanolamina (OPE),
difitanoilfosfatidiletanolamina (difitanoil-PE), disteroil-,
-palmitoil-, y -miristoilfosfatidiletanolamina, así como sus derivados N-metilados de 1 a 3 veces. Preferiblemente, la proporción molar entre el lipopolímero y el lípido coadyuvante oscila entre 4:1 y 1:2, y más preferiblemente, entre 2:1 y 1:1. A fin de optimizar la eficiencia de transfección de las presentes composiciones, se prefiere utilizar agua como excipiente y difitanoil-PE como lípido coadyuvante. Además, la proporción de carga oscila, preferiblemente, entre 5/1 y 1/1 para la administración sistémica, y entre 3/1 y 0,5/1 para la administración local. Dicha proporción puede ser variada por un entendido en la materia en función del polímero utilizado, de la presencia de un adyuvante, del ácido nucleico, de la célula diana y del modo de administración que se emplee.

Se han utilizado con éxito liposomas con una serie de tipos de células que normalmente son resistentes a la transfección mediante otros procedimientos. Se han utilizado eficazmente liposomas para introducir genes, fármacos, sustancias radioterapéuticas, enzimas, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en un amplio abanico de líneas celulares cultivadas y animales. Además, se desprende de diversos estudios que el uso de liposomas, tras su administración sistémica, no provoca respuestas autoinmunes, toxicidad ni localización en las gónadas. Véase Nabel *et al*, Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes, Human Gene Ther., 3:649-656, 1992b.

Dado que se sabe que los liposomas catiónicos y las micelas catiónicas funcionan bien en la administración intracelular de sustancias que no son ácidos nucleicos, los liposomas catiónicos o las micelas catiónicas que forman los lipopolímeros catiónicos de la presente invención se pueden utilizar para la administración celular de sustancias que no son ácidos nucleicos, como, por ejemplo, proteínas y diversos compuestos farmacéuticos o bioactivos. En el presente documento se describen usos de los lipopolímeros catiónicos conformes con la reivindicación 1 en métodos para el tratamiento de diversas enfermedades, cuando para dicho tratamiento resulta necesario transferir material a las células. En concreto, dentro del ámbito de la presente invención se incluye el tratamiento de las siguientes

enfermedades: cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y enfermedades genéticas hereditarias.

El lipopolímero catiónico de la presente invención, que mejora la unión a las células y la captación de la sustancia bioactiva que se desea administrar, se ha concebido para superar los problemas asociados a los lípidos catiónicos conocidos, tal y como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el lipopolímero catiónico biodegradable PEACE es fácilmente hidrolizado o convertido en PEI y colesterol en el organismo. Gracias a su bajo peso molecular, la PEI es retirada fácilmente de la circulación sanguínea, y en ésta el colesterol es una molécula presente de manera natural. Los productos de degradación son moléculas pequeñas y no tóxicas, sujetas a la excreción por vía renal e inertes durante el periodo requerido para la expresión de los genes. La degradación se produce mediante una reacción hidrolítica y/o enzimática simple. Es posible que la degradación enzimática sea notable en ciertas organelas, como, por ejemplo, los lisosomas. El tiempo que se precisa para la degradación puede oscilar entre días y meses en función del peso molecular de los lípidos catiónicos y de las modificaciones que se realicen a los mismos.

Además, a partir del lipopolímero catiónico de la presente invención y de ácidos nucleicos u otras sustancias bioactivas cargadas negativamente, se pueden formar, mediante simple mezcla, complejos de nanopartículas o de microesferas. El grupo lipófilo (derivado del colesterol) del lipopolímero catiónico permite insertar el anfífilo catiónico en la membrana de la célula. Actúa como ancla para que el grupo amino catiónico se una a la superficie de la célula, lo que aumenta la captación del complejo transportador catiónico/ácido nucleico por parte de la célula que se desea transfectar. Por lo tanto, el transportador de genes catiónico de la presente invención proporciona una mayor eficiencia de transfección tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con los transportadores de genes catiónicos conocidos hasta ahora.

Los siguientes ejemplos permitirán que los entendidos en la materia comprendan más claramente cómo poner en práctica la presente invención.

Se adquirió polietilenimina (PEI) de 600, 1200 y 1800 Da de la empresa Polysciences, Inc. (Warrington, PN, Estados Unidos); asimismo, se adquirió clorofornato de colesterilo de la empresa Aldrich, Inc. (Milwaukee, WI, Estados Unidos); se adquirió 2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) de la empresa Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Estados Unidos). Y se adquirió trietilamina (TEA), cloruro de metileno anhidro, cloroformo, éter etílico y acetona de la empresa Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos).

Ejemplo 1

Síntesis de PEACE insoluble en agua

En este ejemplo se ilustra la preparación de PEACE insoluble en agua.

Se disolvió un gramo de PEI (Pm: 1200 Daltons) en una mezcla de 15 ml de cloruro de metileno anhidro y 100 µl de trietilamina (TEA). Tras agitación en hielo durante 30 minutos, se añadió lentamente una solución de 1,2 g clorofornato de colesterilo a la solución de PEI, y se agitó la mezcla en hielo durante toda la noche. El producto resultante (PEACE) se precipitó añadiendo éter de etilo, y a continuación, mediante centrifugación y posterior lavado con éter de etilo adicional y acetona. Se disolvió la PEACE en cloroformo, obteniéndose una concentración final de 0,08 g/ml. En la Fig. 1 se presenta un esquema de la reacción que se acaba de describir. Tras la síntesis y purificación, se caracterizó la PEACE mediante espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF y RMN ¹H.

Los resultados de la RMN de la PEACE 1200 insoluble en agua son los siguientes: como se ilustra en la FIG. 2A, RMN ¹H (200 Mhz, CDCl₃), δ0,6 (3 H de CH₃ del colesterol); δ2,5 (230 H de -NHCH₂CH₂- del esqueleto de la PEI); δ3,1 (72 H de =N-CH₂CH₂-NH₂- de la cadena lateral de la PEI); δ5,3 (1 H de =C=CH-C- del colesterol). Otro pico que apareció a δ0,8, -δ1,9, fue el colesterol. Se determinó que la cantidad de colesterol conjugado a la PEI era del 40%. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de la PEACE reveló que su peso molecular era de 1600 Da aproximadamente, como se ilustra en la Fig. 2B. El pico apareció entre 800 y 2700 y la mayoría de los picos estaban en torno a 1600, lo que es de esperar dado que para la síntesis se utilizaron PEI de 1200 Da y colesterol de 414 (retirando el cloruro). De lo anterior se desprende que la mayoría de la PEACE 1200 sintetizada comprendía una proporción molar 1/1 entre colesterol y PEI, aunque parte de la PEACE 1200 sintetizada no se conjugó o se conjugó a una proporción molar de 2/1 (colesterol/PEI).

Ejemplo 2

Síntesis de PEACE soluble en agua

En este ejemplo se ilustra la preparación de PEACE soluble en agua.

Se agitaron 3 gramos de PEI (Pm: 1800 Daltons) en hielo en una mezcla de 10 ml de cloruro de metileno anhidro y 100 µl de trietilamina durante 30 minutos. Se disolvió 1 gramo de clorofornato de colesterilo en 5 ml de cloruro de metileno anhidro helado y luego se añadió lentamente la disolución resultante a la solución de PEI durante 30

minutos. Se agitó la mezcla durante 12 horas en hielo, y se secó el producto resultante en un evaporador rotatorio. Se disolvió el polvo en 50 ml de HCl 0,1 N. Se extrajo la solución acuosa con 100 ml de cloruro de metileno tres veces, y luego se filtró la solución extraída, a través de un filtro de microfibras de vidrio. Se concentró el producto mediante evaporación del solvente, se precipitó aquél con un gran exceso de acetona, y se secó dicho producto en condiciones de vacío. Se analizó el producto mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y RMN ^1H , y luego se almacenó (conservó) el producto a -20°C hasta su uso.

Los resultados de la RMN de la PEACE 1200 soluble en agua son los siguientes: como se ilustra en la FIG. 3A, RMN ^1H (500 Mhz, $\text{D}_2\text{O} + 1,4\text{-dioxano-}d_6$), $\delta 0,8$ (2,9 H de CH_3 del colesterol); $\delta 2,7$ (59,6 H de $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ del esqueleto de la PEI); $\delta 3,2$ (80,8 H de $=\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2-$ de la cadena lateral de la PEI); $\delta 5,4$ (0,4 H de $=\text{C=CH-C-}$ del colesterol). Otro pico que apareció a $\delta 0,8$, $-\delta 1,9$, fue el colesterol. Se determinó que la cantidad de colesterol conjugado a la PEI era del 47%. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de la PEACE reveló que su peso molecular era de 2200 Da aproximadamente. El pico apareció entre 1000 y 3000 y la mayoría de los picos estaban en torno a 2200, como se ilustra en la Fig. 3B. La posición esperada es 2400, un cloruro 35 se elimina de la PEI 1800 + cloroformato de colesterilo 449. De lo anterior se desprende que la mayoría de la PEACE 1800 sintetizada comprendía una proporción molar 1/1 entre colesterol y PEI, aunque parte de la PEACE 1800 sintetizada no se conjugó o se conjugó a una proporción molar de 2/1 (colesterol/PEI).

Ejemplo 3

Síntesis de PEACE empleando un grupo amino secundario

Se disolvieron cincuenta microlitros de PEI en 2 ml de cloruro de metileno anhidro en hielo. Después, se añadieron lentamente 200 μl de cloroformato de bencilo a la mezcla de reacción y se agitó la solución durante 4 horas en hielo. Tras la agitación, se añadieron 10 ml de cloruro de metileno y se extrajo la solución con 15 ml de NH_4Cl saturado. Se eliminó el agua de la fase de cloruro de metileno empleando sulfato de magnesio. Se redujo el volumen de solución, en condiciones de vacío, y se precipitó el producto (llamado PEI protegida por CBZ) con éter de etilo. Se disolvieron 50 microgramos de PEI protegida con CBZ unido a amina primaria en cloruro de metileno, se añadieron 10 mg de cloroformato de colesterol, y se agitó la solución durante 12 horas en hielo. El producto (PEACE protegida por CBZ) se precipitó con éter de etilo, se lavó con acetona, y luego se disolvió en DMF que contenía carbón activado con paladio como catalizador en H_2 como donante de hidrógeno. La mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró con Celite®, y se redujo el volumen de la solución mediante evaporador rotatorio. Finalmente, se obtuvo el producto mediante precipitación con éter de etilo.

Ejemplo 4

Síntesis de PEACE glucosilada

Se glucosilaron doscientos miligramos de PEI empleando 8 mg de $\alpha\text{-D-glucopiranosil fenilisotiocianato}$ disuelto en DMF. Para sintetizar PEACE galactosilada, manosilada y lactosilada se emplearon, respectivamente, $\alpha\text{-D-glucopiranosil fenilisotiocianato}$, $\alpha\text{-D-manopiranosil fenilisotiocianato}$ y $\alpha\text{-D-lactopiranosil fenilisotiocianato}$. Se ajustó el pH de la solución a $\text{pH} = 9$ añadiendo Na_2CO_3 1 M e incubándola durante 12 horas a temperatura ambiente. La PEI glucosilada se dializó contra NaCl 5 mM durante 2 días. El volumen de los materiales resultantes se redujo en condiciones de vacío y se precipitó con acetona. La PEI manosilada secada (bajo N_2) se disolvió en cloruro de metileno y se hizo reaccionar con cloroformato de colesterilo, de la manera descrita en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5

Síntesis de PEACE conjugada con folato

Se conjugaron doscientos miligramos de PEI con 10 mg de ácido fólico disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) que contenía 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Tras 12 horas de agitación, el producto (PEI-folato) se purifica mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). La solución se dializó contra agua desionizada durante 2 días. El volumen de los materiales resultantes se redujo en condiciones de vacío y se precipitó con acetona. Los materiales resultantes se secaron bajo N_2 . La PEI-folato secada se disolvió en cloruro de metileno y se hizo reaccionar con cloroformato de colesterilo, de la manera descrita en el Ejemplo 2.

Ejemplo 6

Síntesis de PEACE conjugada con RGD

Utilizamos $\text{NH}_2\text{-Cis-Arg-Gli-Asn-Met-Phe-Gli-Cis-CO-NH}_2$ cíclico como un péptido RGD con un extremo N-terminal. El péptido RGD se sintetizó empleando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida con química F-moc. La ciclación se llevó a cabo empleando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,01 M en NH_4OAc 1 mM a $\text{pH} 8,0$ durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se purificó con HPLC. Se hizo reaccionar un grupo amino N-terminal uno molar del péptido RGD con N-succinimidil 3(2-piridilditio)propionato (SPDP) 2 molar en DMSO y se precipitó dicho grupo amino N-terminal con éter de etilo (RGD-PDP). Se hicieron reaccionar doscientos miligramos de PEI con 7 miligramos de SPDP en DMSO durante 2 horas a temperatura ambiente. Los materiales resultantes (PEI-PDP) se

trataron con (-)-1,4-ditio-L-treitol (DTT) 0,1 M, y luego se sometieron a una columna bio-spin de separación. El RGD-PDP se disolvió en DMF y luego se añadió dicho RGD-PDP disuelto a la solución de PEI-PDP. Tras agitación durante 12 horas, el material resultante (RGD-PEI) se purificó mediante FPLC. La solución resultante se dializó contra agua desionizada durante 2 días, y después se redujo el volumen empleando un evaporador rotatorio. Los materiales resultantes se precipitaron en un gran exceso de acetona. Se hizo reaccionar el RGD-PEI con clorofornato de colesterol, de la manera descrita en el Ejemplo 2.

Ejemplo 7

Preparación de liposomas

Se disolvieron PEACE y DOPE en cloruro de metileno, a proporciones molares de 1/1, 1/2 y 2/1, y luego se añadieron dichas disoluciones a matraces de fondo redondeado de 100 ml de capacidad. Se rotó la solución transparente en un evaporador rotatorio a 30°C durante 60 minutos, obteniéndose finas películas de lípidos translúcidas. Se cubrieron los matraces con película de parafina perforada y se secó la película de lípidos, en condiciones de vacío, durante toda la noche. Se hidrataron las películas en 5 ml de agua estéril, obteniéndose una concentración final 5 mM de PEACE. Se sometieron las películas hidratadas a vórtice durante 60 minutos, y se extrudieron a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 0,4 µm empleando una extrusora de 10 ml (de la empresa Lipex Biomembranes, Inc., Vancouver, BC, Canadá).

Ejemplo 8

Amplificación y purificación de plásmidos

En este ejemplo se ilustra la preparación del ADN que formará un complejo con el liposoma preparado en el Ejemplo 7. Se utilizó el plásmido pCMV-luciferasa (pCMV-Luc) como gen informador y el pmlL-12 (un plásmido que porta el gen de la interleucina-12 murina, o gen mL-12) como gen terapéutico. Las subunidades p35 y p40 del mL-12 se expresaron a partir de dos unidades de transcripción independientes, separadas por un lugar de entrada ribosómico interno (IRES, por sus siglas en inglés), y fueron insertadas en un único plásmido, pCAGG. Este vector codifica el mL-12 bajo el control del mejorador inducido por citomegalovirus híbrido (CMV-IE, por sus siglas en inglés) y del promotor de la β-actina de pollo. Se amplificaron todos los plásmidos en células de la cepa DH5α de *E. coli*, y luego se aislaron y purificaron empleando kits QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kits (Chatsworth, CA, Estados Unidos). La pureza y la integridad de los plásmidos se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguida de tinción con bromuro de etidio, y la concentración de pADN se midió mediante absorbancia con rayos ultravioleta (UV) a 260 nm.

Ejemplo 9

Preparación de complejos de PEACE/pADN solubles en agua y de complejos de PEACE:DOPE/pADN

En este ejemplo se ilustra la formación de complejos de PEACE/pcADN solubles en agua y de complejos de PEACE:DOPE/pADN.

La PEACE soluble en agua preparada en el Ejemplo 2, los liposomas de PEACE:DOPE preparados en el Ejemplo 7 y el pADN preparado en el Ejemplo 8 se diluyeron por separado con glucosa al 5% hasta obtener un volumen de 250 µl de cada uno de dichos materiales, y luego se añadió la solución de pADN a los liposomas, bajo mezcla suave en vórtice. Se dejó que la formación de complejos se llevase a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A fin de estudiar el efecto de la proporción de carga sobre la transferencia de genes, se prepararon complejos de PEACE/pcADN solubles en agua y complejos de PEACE:DOPE/pADN a proporciones de carga que oscilaban entre 1/1 y 5/1 (+/-). Tras la formación de los complejos, se midió la osmolalidad y el pH de los complejos de PEACE:DOPE/pADN. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Los complejos de PEACE/pcADN solubles en agua y de liposomas de PEACE:DOPE/pADN formulados a diversas proporciones de carga se diluyeron 5 veces en la cubeta, a fin de medir el tamaño de partícula y el potencial ζ de los complejos. Se midió la movilidad electroforética de las muestras a 37°C, pH 7,0 y 677 nm de longitud de onda, empleando un ángulo constante de 15° con ZetaPALS (de la empresa Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY, Estados Unidos). Se calculó el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética, en base a la fórmula de Smoluchowski. Tras determinar la movilidad electroforética, se midió el tamaño de partícula promedio de las muestras.

El tamaño de partícula promedio de los complejos de PEACE/pcADN solubles en agua resultó ser mucho menor que el de los complejos de PEACE:DOPE/pADN, formulados a una proporción 3/1 (+/-) en glucosa al 5% (42 nm frente a 221 nm). En general, estos complejos presentaban una distribución estrecha del tamaño de partícula. En el caso de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN, se produjo una reducción del tamaño de partícula al aumentar las proporciones de carga: 430, 221 y 193 nm a las proporciones de carga 1/1, 3/1 y 5/1 (+/-), respectivamente.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los complejos de PEACE/pADN solubles en agua y de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN.

	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Osmolalidad (mOsm/kg) pH
<i>PEACE soluble en agua</i>			
PEACE 1800/pADN (1/1, +/-)	100,6 ± 1,5	8,23 ± 0,25	~300
PEACE 1800/pADN (3/1, +/-)	42,1 ± 0,35	37,40 ± 0,46	~300
PEACE 1800/pADN (5/1, +/-)	61,8 ± 0,1	61,67 ± 0,62	~300
<i>PEACE insoluble en agua</i>			
PEACE 1200:DOPE (1/1)/pADN (1/1, +/-)	430,6 ± 12,5	8,46 ± 0,4	~310 7,2~7,6
PEACE 1200:DOPE (1/1)/pADN (3/1, +/-)	220,8 ± 8,4	34,73 ± 0,7	~310 7,2~7,6
PEACE 1200:DOPE (1/1)/pADN (5/1, +/-)	193,3 ± 6,9	47,00 ± 0,7	~310 7,2~7,6

5

El potencial zeta de estos complejos oscilaba entre 8 y 47 mV, y se incrementaba cuando aumentaba la proporción de carga (+/-). La osmolalidad de dichos complejos oscilaba entre 331 y 359 mOsm, mientras que la de los complejos formulados en glucosa al 4% estaba en torno a 310 mOsm.

10

Ejemplo 10

Prueba de retardo en gel y de protección de la DNasa

15

En este ejemplo se evaluó la capacidad de la PEACE soluble en agua y de los liposomas de PEACE:DOPE insolubles en agua para condensarse y para proteger el pADN frente a la degradación enzimática. Descrito de una manera breve, se formaron complejos de PEACE soluble en agua y de liposomas de PEACE:DOPE con pADN a diversas proporciones de carga (+/-), que oscilaron entre 0,5/1 y 1/1, en presencia de glucosa al 5% (p/v), a fin de ajustar la osmolalidad en 290~300 mOsm. Se sometió a dichos complejos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Como se ilustra en la FIG. 4A y en la FIG. 4B, la PEACE cargada positivamente forma complejos muy fuertes con los iones fosfato cargados negativamente del esqueleto azucarado del ADN. Cuando la proporción de carga (+/-) llegó a 1/1, no se observó ADN libre.

20

25

Se sometió a prueba la capacidad de la PEACE soluble en agua y de los liposomas de PEACE:DOPE para proteger el pADN de la degradación enzimática mediante una prueba de protección de la DNasa. Se formó un complejo de veinte microgramos de pADN con PEACE soluble en agua o con liposomas de PEACE:DOPE a diversas proporciones de carga, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 273 unidades de DNasa a las formulaciones, y se incubaron las muestras a 37°C durante un período definido. A los 0, 5, 15 y 60 minutos post-incubación, se tomaron muestras de 50 µl en tubos de Eppendorf y se mezclaron dichas muestras con 50 µl de EDTA 100 mM agitando suavemente en vórtice a fin de inactivar la DNasa. Se añadió heparina (162 unidades/mg de ADN) a fin de disociar el pADN de la PEACE soluble en agua o de los liposomas de PEACE:DOPE. Se dejó que la heparina reaccionase con las mezclas durante 20 minutos, y luego se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1% para electroforesis.

30

35

Tanto la PEACE soluble en agua como los liposomas de PEACE:DOPE fueron capaces de proteger a los plásmidos de la degradación por parte de las nucleasas durante un período de 60 minutos posterior a la incubación, en presencia de DNasa a una proporción de carga (+/-) de 3/1. En la FIG. 5B se ilustra cómo la PEACE soluble en agua fue capaz de proteger el ADN incluso tras incubación a 37°C durante 2 horas. Cuando se formó un complejo entre el ADN del plásmido y los liposomas de PEACE:DOPE a una proporción de carga (+/-) de 3/1, dicho ADN del plásmido se condensó por completo y formó partículas esféricas. El tamaño de partícula de estos complejos estaba en torno a 200~300 nm (Tabla 1). Aunque se tiene una comprensión limitada del mecanismo celular en la transferencia de genes mediada por lípidos, por lo general se considera que la formación de complejos a escala nanométrica es un prerrequisito para la entrada de los complejos lípido/ADN en las células.

40

Ejemplo 11

Citotoxicidad

45

En este ejemplo se ilustra el sometimiento a prueba de la citotoxicidad de los complejos PEACE/pCMV-Luc solubles en agua y de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pCMV-Luc mediante una prueba MTT en células CT-26 empleando un amplio abanico de proporciones de carga. La prueba colorimétrica MTT es como la descrita

originalmente por T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, 65 J. Immunol. Methods 55-63 (1983).

Se cultivaron y mantuvieron células de adenocarcinoma de colon murino CT-26 en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin y 50 U/ml de gentamicina, a 37°C, humidificado con CO₂ al 5%.

Después, se sembraron dichas células CT-26 en una placa de 96 pocillos con RPMI (con FBS al 10%) a razón de 4000 células por pocillo, y se incubaron durante toda la noche (37°C, CO₂ al 5%). Tras alcanzar una confluencia del 80%, se añadieron 0,64 µg de pADN a diversas proporciones de carga de PEACE/pADN soluble en agua o de PEACE:DOPE/pADN, y se incubaron los pocillos (37°C, CO₂ al 5%) durante 48 horas. Tras esta incubación, se añadieron a cada pocillo 25 µl de solución madre de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en solución salina tamponada con fosfato, obteniéndose una concentración final de 0,5 mg/ml de MTT por pocillo. Se incubó la placa durante 4 horas adicionales. Se retiró el medio de cultivo y se añadieron 150 µl de DMSO a fin de disolver los cristales de formazán. Se leyó la placa espectrofotométricamente a 570 nm en un lector de placas de ELISA. Se calculó el porcentaje (%) relativo de células conforme a la siguiente ecuación:

Viabilidad (%) = $[\text{DO}_{570} (\text{muestra}) / \text{DO}_{570} (\text{control})] \times 100$,
donde DO₅₇₀ (control) representa la medición de los pocillos tratados exclusivamente con el tampón PBS y DO₅₇₀ (muestra) representa la medición de los pocillos tratados con cantidades diversas de PEACE:DOPE/pADN a diversas proporciones de carga.

Para comparar, se utilizaron complejos disponibles en comercios, formados por liposomas catiónicos (LipofectAMINA)/pCMV-Luc (5/1, p/p) y poli(L-lisina) (PLL). El reactivo LipofectAMINA es una formulación de liposomas 3:1 (p/p) del lípido policationico trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) (Pm: 867) y del lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Pm: 744) en agua filtrada mediante membrana. Basándonos en su estructura química, la LipofectAMINA tiene 2 aminas primarias, 2 aminas secundarias y una amina cuaternaria, lo que, en total, da 5 cargas positivas por molécula. Tras realizar cálculos posteriores, se demostró que, en el caso de los complejos de LipofectAMINA/pADN, 5/1 (p/p) se corresponde a 6,823/1 (+/-). Tras la normalización mediante proporciones de carga (+/-), confirmamos de este modo que los complejos de PEACE/pADN solubles en agua preparados a la proporción de carga 7/1 (+/-) no eran tóxicos para las células, mientras que tanto la PEI (Pm: 25000 Daltons) como el Superfect sí que eran tóxicos para las células, como se ilustra en la FIG. 6A. De forma similar, los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pCMV-Luc fueron menos tóxicos para las células cuando se formularon a la proporción de carga 7/1 (+/-) y proporciones inferiores. En cambio, los complejos de LipofectAMINA/pCMV-Luc eran muy tóxicos para las células, como se ilustra en la FIG. 6B.

Una característica importante del lipopolímero catiónico de la presente invención es su toxicidad relativamente baja hacia las células a las concentraciones que se requieren para una transfección óptima, ya que la citotoxicidad es uno de los mayores obstáculos en la aplicación de muchos anfillos catiónicos. La toxicidad de algunos de los lípidos catiónicos y lipopolímeros catiónicos sintéticos disponibles en el mercado, tales como la Lipofectina y la PEI, se ha atribuido a su naturaleza no biodegradable y no natural. De los resultados obtenidos se desprende que las propiedades naturales y la biodegradabilidad del lipopolímero de la presente invención son las responsables de su baja citotoxicidad y de su mayor biocompatibilidad.

Ejemplo 12

Transfección *in vitro*

En este ejemplo, se evaluó la eficiencia de transfección de complejos de PEACE/pCMV-Luc solubles en agua, de complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pCMV-Luc y de complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmIL-12, formulados a diversas proporciones de carga en glucosa al 5% (p/v), en líneas celulares de carcinoma de colon CT-26.

En el caso del gen de la luciferasa, se sembraron células CT-26 en placas de cultivo de tejidos con seis pocillos, a razón de 4x10⁵ células por pocillo en FBS al 10% que contenía medio de cultivo RPMI 1640. Las células alcanzaron una confluencia del 80% dentro de un plazo de 24 horas tras su transfección con complejos de PEACE/pADN solubles en agua o con complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN preparados a diversas proporciones de carga que oscilaban entre 0,5/1 (+/-) y 5/1 (+/-). La cantidad total de ADN cargado se mantuvo constante en 2,5 µg/pocillo y la transfección se llevó a cabo en ausencia de suero. Se incubaron las células en presencia de los complejos durante 5 horas en una incubadora de CO₂, y después se repusieron 2 ml de RPMI 1640 que contenía FBS al 10% y se procedió a incubación adicional durante 36 horas. Se lisaron las células empleando tampón de lisis IX (de la empresa Promega, Madison, WI, Estados Unidos) tras un lavado con PBS fría. Se realizaron pruebas de proteínas totales utilizando un kit de análisis de proteínas BCA (de la empresa Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Estados Unidos). Se midió la actividad de la luciferasa en términos de unidades relativas de luz (URL) empleando un

luminómetro con placas de 96 pocillos (de la empresa Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, Estados Unidos). Los valores finales de la luciferasa se cuantificaron en términos de URL/mg de proteína total. Se utilizaron ADN desnudo y cultivos sin tratar como controles positivo y negativo, respectivamente. Como se ilustra en la FIG. 7A, la eficiencia de transfección de la PEACE soluble en agua fue superior a la de la PEI. En el caso de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN, la eficiencia de transfección dependía de la proporción de carga y de las proporciones molares entre PEACE y DOPE, dándose la mayor eficiencia de transfección con los complejos de liposomas PEACE:DOPE (2/1 mol/mol)/pCMV-Luc, como se ilustra en la FIG. 7B.

En el caso del gen mL-12, se sembraron células CT-26 en matraces de 75 cm², a razón de 2x10⁶ células/matraz, en RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. Las células alcanzaron una confluencia del 80% en 24 horas, tras lo que se transfectaron con complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmL-12 preparados a diversas proporciones de carga que oscilaron entre 0,5/1 (+/-) y 5/1 (+/-). La cantidad total de ADN cargado se mantuvo en 15 µg/matraz y la transfección se llevó a cabo en ausencia de suero. Se dejaron incubar las células en presencia de los complejos durante 5 horas en una incubadora de CO₂ y después se repusieron 10 ml de RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. Después se incubaron las células durante 36 horas adicionales. Se comprobó si los sobrenadantes del cultivo contenían mL-12 p70 y p40, empleando para ello kits de prueba de inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), conforme a lo sugerido por el fabricante. Utilizando un gradiente de diversas proporciones de carga, se obtuvieron resultados similares a los de la transfección con luciferasa. Los niveles de mL-12 correspondientes a los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmL-12 (3/1, +/-) fueron notablemente más altos que los correspondientes al pmL-12 o que los correspondientes a las muestras no transfectadas.

Para complementar los resultados de ELISA obtenidos con las muestras transfectadas *in vitro*, se llevó a cabo la prueba de transcriptasa inversa - reacción en cadena de la polimerasa (TI-PCR), a fin de detectar transcritos de ARNm del mL-12 en las células tumorales transfectadas. Después de la transfección, se aisló el ARN total empleando el kit RNeasy Qiagen (de la empresa Qiagen Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Se lisaron y homogeneizaron las muestras en presencia de isotiocianato de guanidina y luego se realizó transcripción inversa empleando el kit de transcriptasa inversa Omniscript™ (de la empresa Qiagen Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Las muestras sometidas a transcripción inversa se amplificaron mediante la técnica PCR empleando un kit de núcleo de Taq polimerasa (de la empresa Qiagen Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Se utilizó TI-PCR para detectar la subunidad p35, así como el promotor de la β-actina y pCAGGS. Los cebadores ("primers") sintetizados de 5' a 3' fueron los siguientes: para el pmL-12 (p35), 5'-GTC TCC CAA GGT CAG CGT TCC-3' upstream y 5'-CTG GTT TGG TCC CGT GTG ATG-3' downstream; para la β-actina, 5'-ATG GTG GGA ATG GGT CAG AAG-3' upstream y 5'-CAC GCA GCT CAT TGT AGA AGG-3' downstream; para el pCAGGS, 5'-GCC AAT AGG GAC TTT CCA T-3' upstream y 5'-GGT CAT GTA CTG GGC ATA ATG-3' downstream. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 56°C durante 15 segundos, y extensión a 72°C durante 30 segundos. Se efectuaron un total de 35 ciclos para la amplificación del producto. El producto de la PCR se separó mediante electroforesis empleando gel de agarosa al 1%. El tamaño esperado del producto de la PCR del ARNm del mL-12 p35 era de 297 pb (pares de bases), y el de la β-actina, 150 pb.

Como se ilustra en la FIG. 8, los resultados de la TI-PCR revelan que la producción de mL-12 p35 a nivel de ARNm es suficiente para inducir la formación de mL-12 p70 mediante la formación de puentes disulfuro con el mL-12 p40. El control β-actina confirmó que la expresión del gen mL-12 se debía al mL-12 codificador de plásmido, y no a la producción endógena de mL-12 por parte de las células. De las bandas obtenidas de la TI-PCR se desprende que la expresión del gen mL-12 a nivel de proteínas debería ser considerablemente alta y que la cantidad de mL-12 p40 secretada por las células CT-26 transfectadas también debería ser considerablemente alta si la producción relativa de mL-12 p35 y la producción relativa de de IL-12 p40 son similares.

Ejemplo 13

Expresión de genes *in vivo*

En función del tamaño de partícula y de la carga superficial, se pueden hacer llegar complejos de PEACE/pADN solubles en agua y complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN insolubles en agua a la mayoría de los órganos, como, por ejemplo, pulmón, hígado, bazo y tumores distales, tras su administración sistémica. Para lograr una administración de genes eficaz a los hepatocitos, dichos complejos deben ser estables en sangre y su tamaño de partícula debe ser inferior a 100 nm, a fin de permitir su extravasación a través endotelio de los sinusoides hepáticos y su acceso al espacio de Disse. Además, estas partículas deben tener ligandos específicos, tales como la galactosa o la lactosa, a fin de promover su unión a los receptores de los hepatocitos y su internalización mediante endocitosis mediada por receptores. Fue posible producir complejos de PEACE/pADN y complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pADN para aplicación *in vivo*.

En este ejemplo se ilustra la expresión de genes *in vivo*, empleando un liposoma catiónico de PEACE:DOPE de la presente invención como transportador de genes. Se describe la transferencia y la expresión del plásmido pmL-12 en el pulmón de ratón tras su administración sistémica a una dosis de 0,25 mg de ADN/ratón utilizando 150 µl como el volumen de inyección. En este ejemplo se demuestran las propiedades especialmente ventajosas de las

composiciones a base de liposomas catiónicos conformes con la presente invención, en particular, para aplicaciones en terapia génica.

5 Se inyectaron por vía intravenosa células de adenocarcinoma de colon CT-26 en ratones BALB/c, para producir metástasis pulmonares a fin de evaluar la eficiencia de la transferencia de genes *in vivo* de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmIL-12 inyectados por vía intravenosa. 48 horas después de la inyección intravenosa de los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmIL-12, se extrajeron los pulmones; se cortaron dichos pulmones en pequeños trozos, se volvieron a cultivar dichos trozos durante 24 horas, y se analizaron los sobrenadantes del cultivo mediante la técnica ELISA. La producción de mIL-12 en el pulmón fue alta. Una de las propiedades más importantes del mIL-12 es su capacidad para inducir la producción de grandes cantidades de mIFN- γ . Por lo tanto, medimos también los niveles de mIFN- γ inducidos por el mIL-12. Los complejos de liposomas de PEACE:DOPE/pmIL-12 produjeron niveles de mIFN- γ mucho mayores que los producidos por el pmIL-12 desnudo o por los liposomas de PEACE:DOPE.

15 Dado el pequeño tamaño de los complejos de PEACE/pADN, esperamos que dichos complejos resulten especialmente útiles para la administración intratumoral de genes, así como para la administración sistémica a los hepatocitos y a los tumores distales. A fin de minimizar su unión a proteínas del plasma, se puede fijar poli(etilenglicol) (PEG) de pequeño tamaño al grupo de cabeza de la PEI de la PEACE soluble en agua.

20 Así, entre las diversas formas de realización descritas, se ha incluido una composición que comprende un novedoso lipopolímero catiónico y un método de uso del mismo para la administración de sustancias bioactivas, tales como ADN, ARN, oligonucleótidos, proteínas, péptidos y fármacos, mediante la facilitación de su transporte transmembranal o mediante el aumento de su adhesión a las superficies biológicas.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un lipopolímero catiónico no tóxico biodegradable que comprende una polietilenimina (PEI) ramificada, un ancla lipídica seleccionada de entre el colesterol y ácidos grasos con una cadena C₁₂ a C₁₈, y un enlazante biodegradable; el enlazante biodegradable une de manera covalente la PEI ramificada y el ancla lipídica, y en al menos una amina primaria de la PEI ramificada se injerta un polialquilenglicol que tiene un peso molecular comprendido entre 0,5 y 20 KDaltons, y el lípido catiónico contiene al menos un 50% de grupos amino libres no sustituidos funcionales.
- 10 2. El lipopolímero catiónico de la reivindicación 1, en el que la PEI ramificada tiene un peso molecular promedio de 600 a 25000 Daltons.
3. El lipopolímero catiónico de la reivindicación 1, en el que la proporción molar entre PEI ramificada y ancla lipídica está comprendida, preferiblemente, en un intervalo de 1:1 a 1:20.
- 15 4. El lipopolímero catiónico de la reivindicación 1, en el que el enlazante biodegradable es un enlace éster.
5. El lipopolímero catiónico poli{(etilenimina)-co-[N-2-aminoetil]etilenimina}-co-[N-(N-colesteriloxycarbonil-(2-aminoetil)etilenimina)] ("PEACE").
- 20 6. El lipopolímero catiónico de la reivindicación 1, que comprende además una fracción de dirección a dianas seleccionada del grupo que comprende transferrina, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato, manosa, Lewis^x y sialil-Lewis^x, N-acetil-lactosamina, galactosa, lactosa, trombosmodulina, sustancias fusogénicas tales como la polimixina B y la hemaglutinina HA2, sustancias lisosomotrópicas, y señales de localización del núcleo (SLN) tales como el antígeno T.
- 25 7. El lípido catiónico de la reivindicación 6, en el que la fracción de dirección a dianas es galactosa o lactosa.
8. El polímero catiónico de la reivindicación 6, en el que dicha fracción de dirección a dianas es una sustancia fusogénica seleccionada del grupo que comprende polimixina B y hemaglutinina HA2.
- 30 9. El lipopolímero catiónico de la reivindicación 6, en el que el polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG).
10. Una composición farmacéutica que comprende una sustancia bioactiva y un lipopolímero catiónico no tóxico biodegradable conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha sustancia bioactiva es un ácido nucleico, una proteína o un fármaco aniónico.
- 40 12. La composición de la reivindicación 10, en la que la proporción de carga entre lipopolímero catiónico y ácido nucleico (+/-) está comprendida en el intervalo de 5:1 a 1:1.
- 45 13. La composición de la reivindicación 10, que comprende además un lípido coadyuvante seleccionado del grupo que comprende dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), oleoilpalmitoilfosfatidiletanolamina (OPE), difitanoilfosfatidiletanolamina (difitanoil-PE), disteroil-, -palmitoil-, y -miristoilfosfatidiletanolamina, así como sus derivados N-metilados de 1 a 3 veces.
- 50 14. La composición de la reivindicación 13, en la que la proporción molar entre lipopolímero catiónico y lípido coadyuvante está comprendida en el intervalo de 4:1 a 1:2.
15. Un lipopolímero catiónico conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en la administración de una sustancia bioactiva a un animal de sangre caliente.
- 55 16. Una composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, para uso en el tratamiento del cáncer, de las enfermedades infecciosas, de las enfermedades inflamatorias y de las enfermedades genéticas hereditarias.

Figura 1

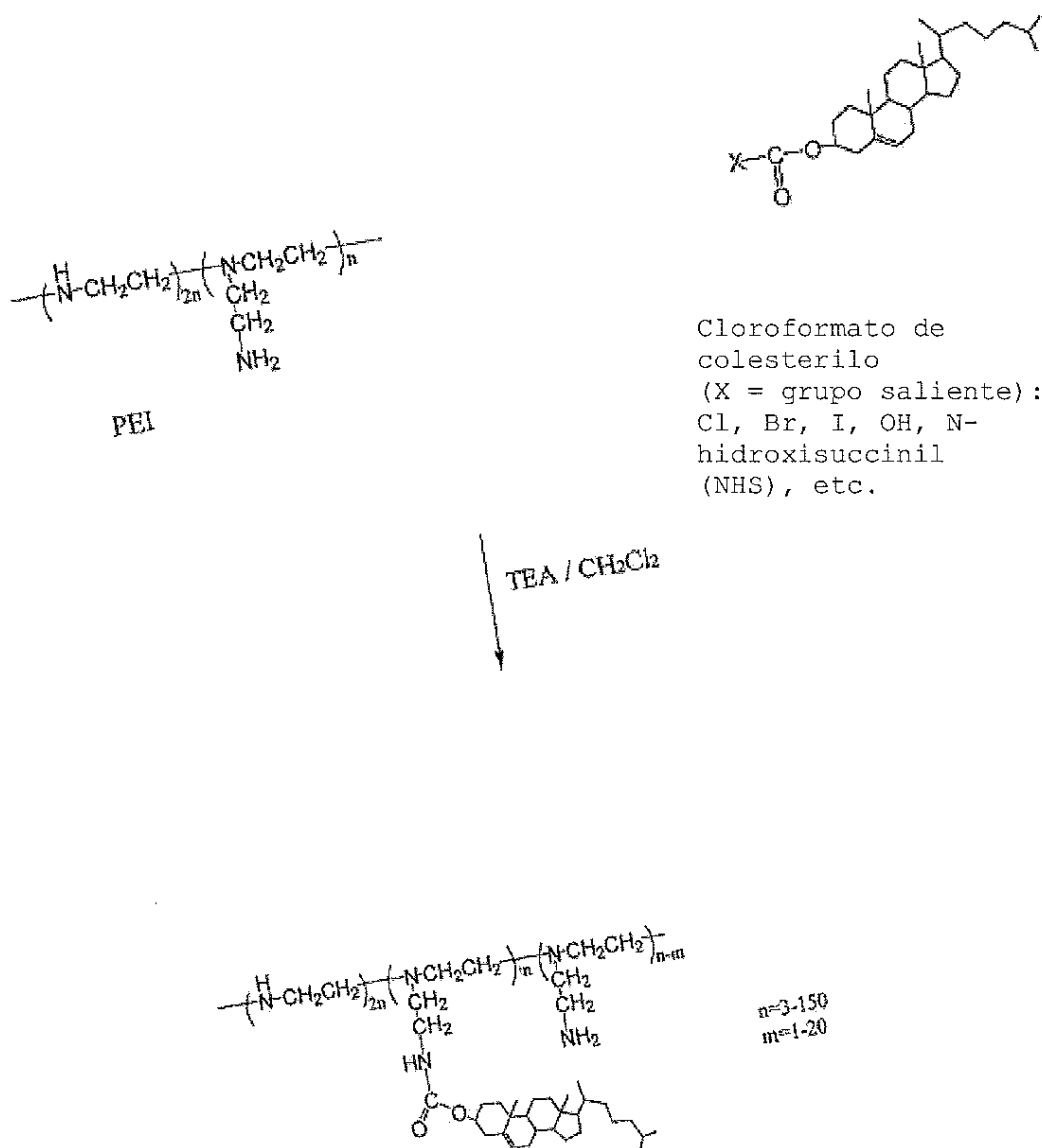


Figura 2A

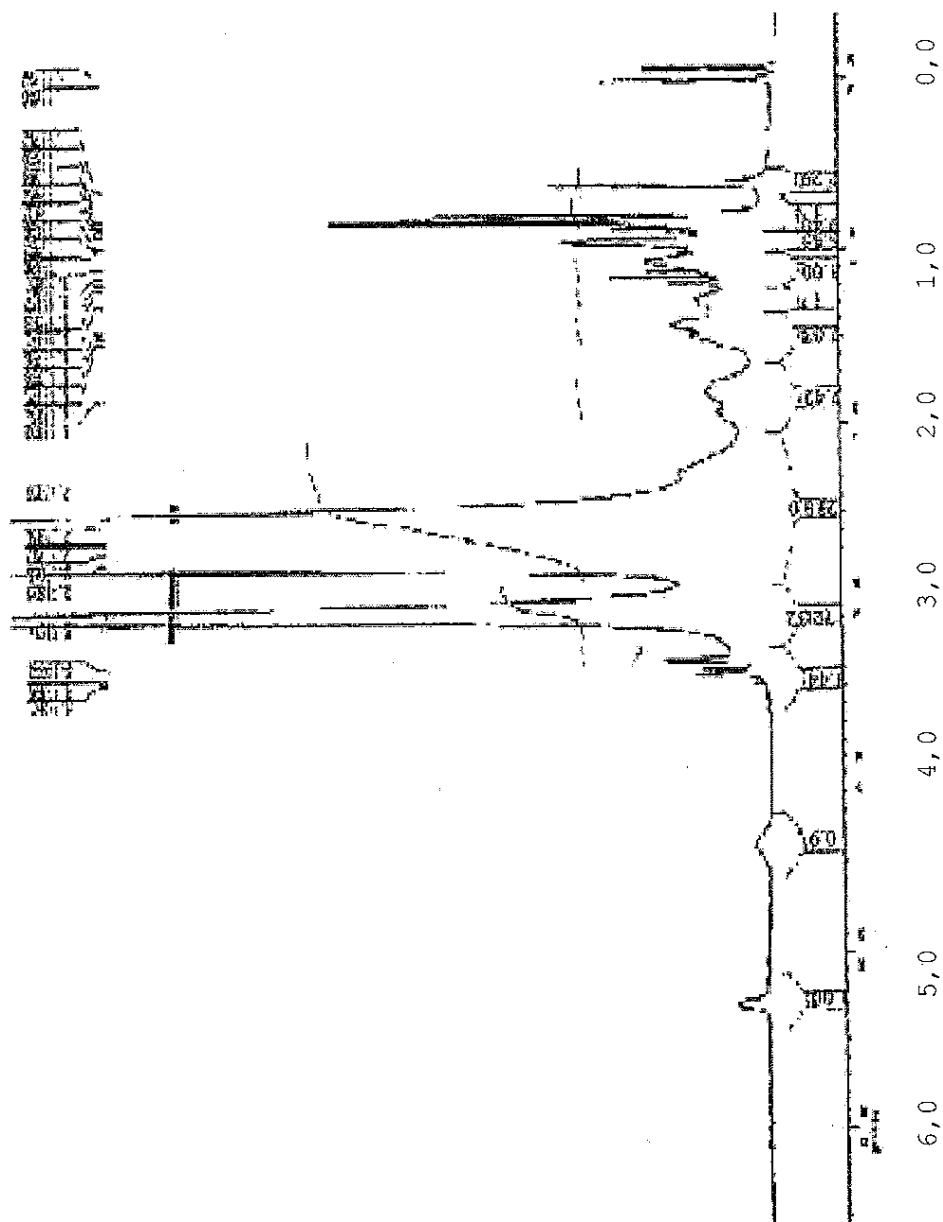


Figura 2B

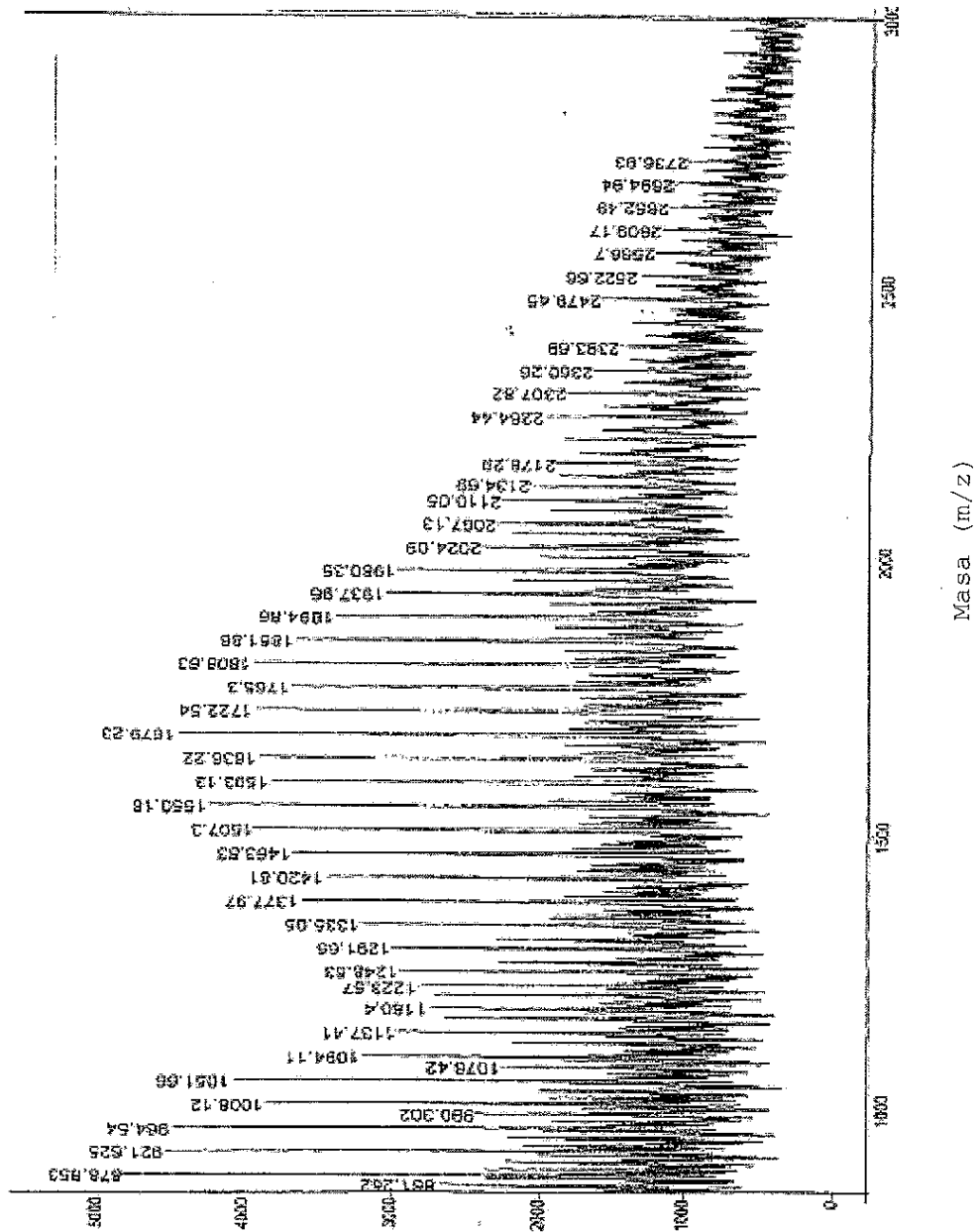




Figura 3A

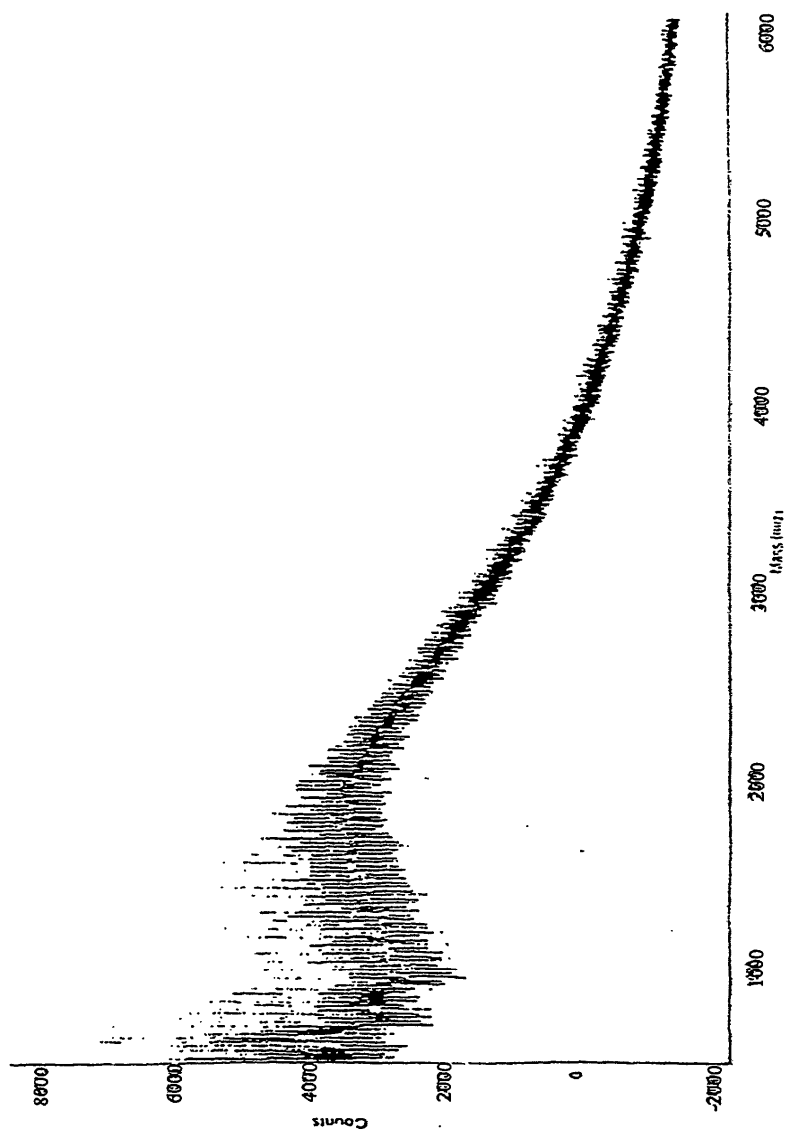


Figura 3B

1. Marcador de AIN (1 kpb)
2. pAUN
3. PEACE/pAIN (0,25/1) (+/-)
4. PEACE/pAIN (0,5/1) (+/-)
5. PEACE/pAIN (1/1) (+/-)
6. PEACE/pAIN (1,5/1) (+/-)
7. PEACE/pAIN (2/1) (+/-)
8. PEACE/pAIN (3/1) (+/-)
9. PEACE/pAIN (5/1) (+/-)
10. PEACE/pADN (7/1) (+/-)

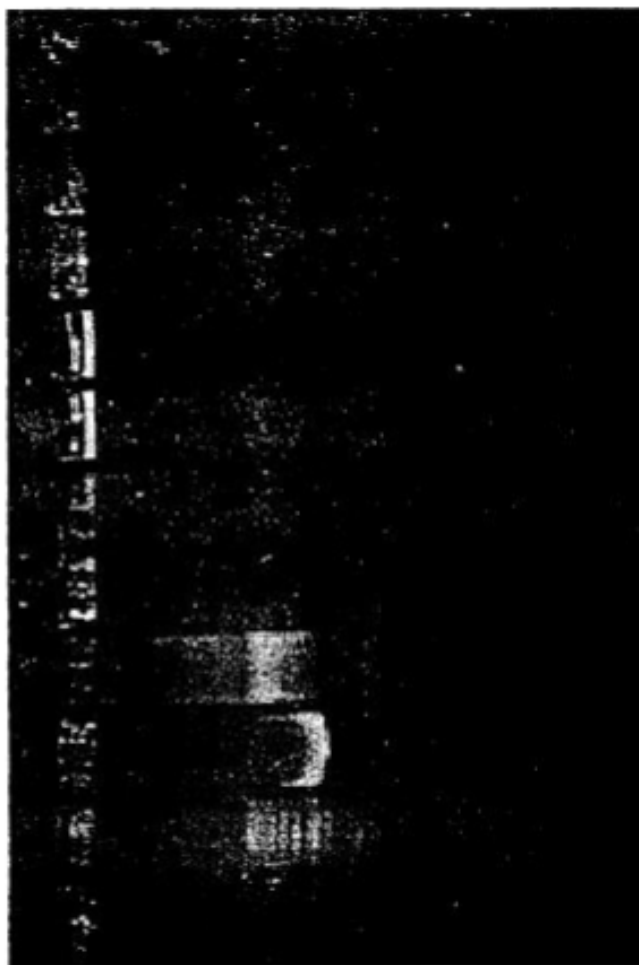
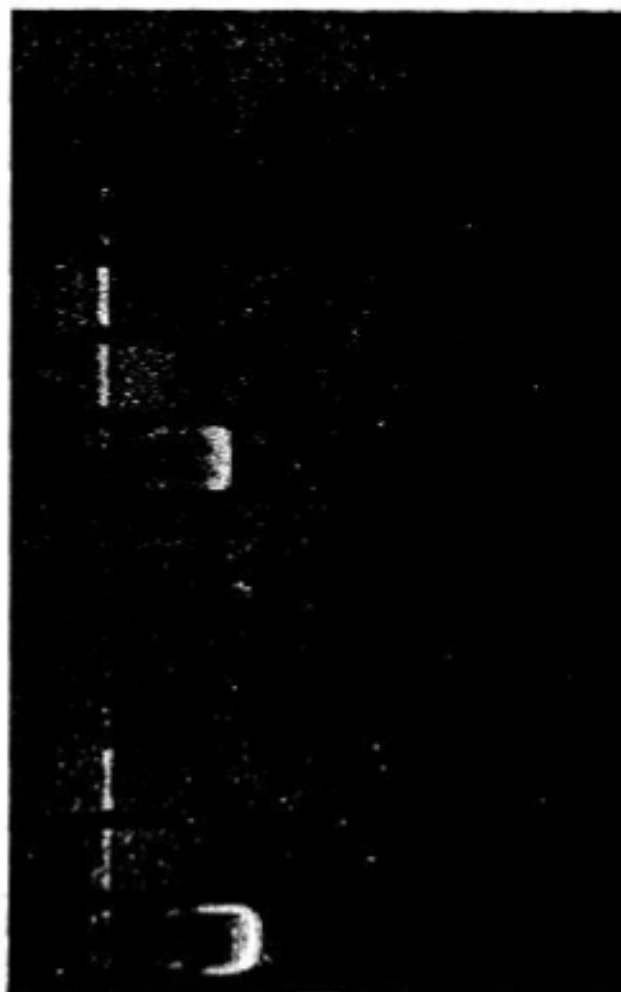


Figura 4A

Figura 4B



1. PAIN desnudo
2. PEACE:DOPE (1/1)/PAIN (0,5/1, +/-)
3. PEACE:DOPE (1/1)/PAIN (1/1, +/-)
4. PEACE:DOPE (1/1)/PAIN (2/1, +/-)
5. PEACE:DOPE (1/1)/PAIN (3/1, +/-)
6. PEACE:DOPE (1/1)/PAIN (5/1, +/-)
7. PAIN desnudo
8. PEACE:DOPE (1/2)/PAIN (0,5/1, +/-)
9. PEACE:DOPE (1/2)/PAIN (1/1, +/-)
10. PEACE:DOPE (1/2)/PAIN (2/1, +/-)
11. PEACE:DOPE (1/2)/PAIN (3/1, +/-)
12. PEACE:DOPE (1/2)/PAIN (5/1, +/-)

Figura 5

1.	Marcador de ADN (100 pb)	
	2/9:PEACE/pADN	
2.	pCMV-Luc	
3.	Tiempo de incubación: 0 min	
4.	: 5 min	
5.	: 10 min	
6.	: 15 min	
7.	: 30 min	
8.	: 60 min	
	: 120 min	
	10/12: ADN desnudo	
	: 0 min	
	: 5 min	
	: 10 min	
		Cantidad de DNasa: 3 unidades

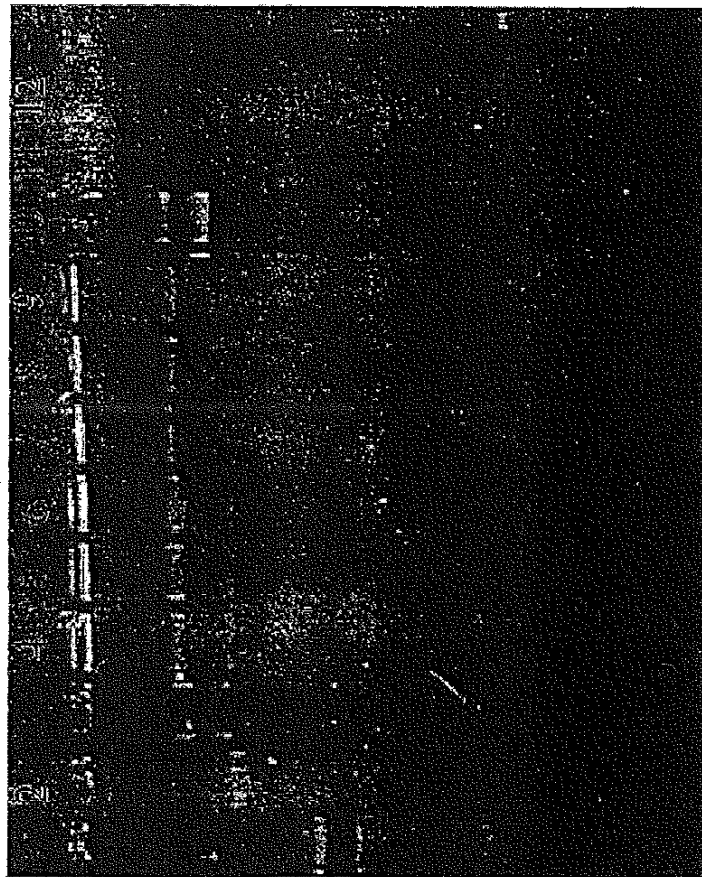


Figura 6A

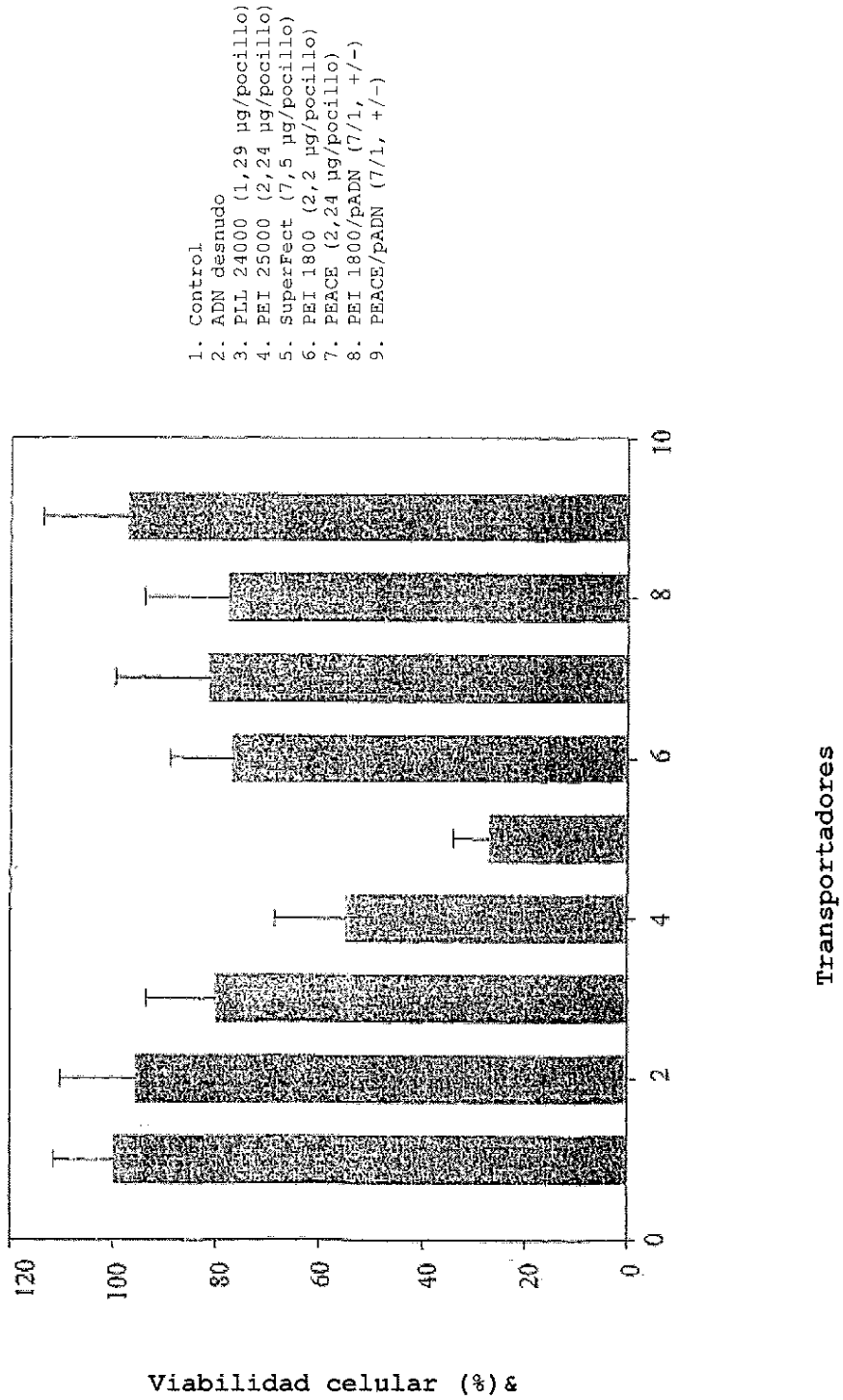


Figura 6B

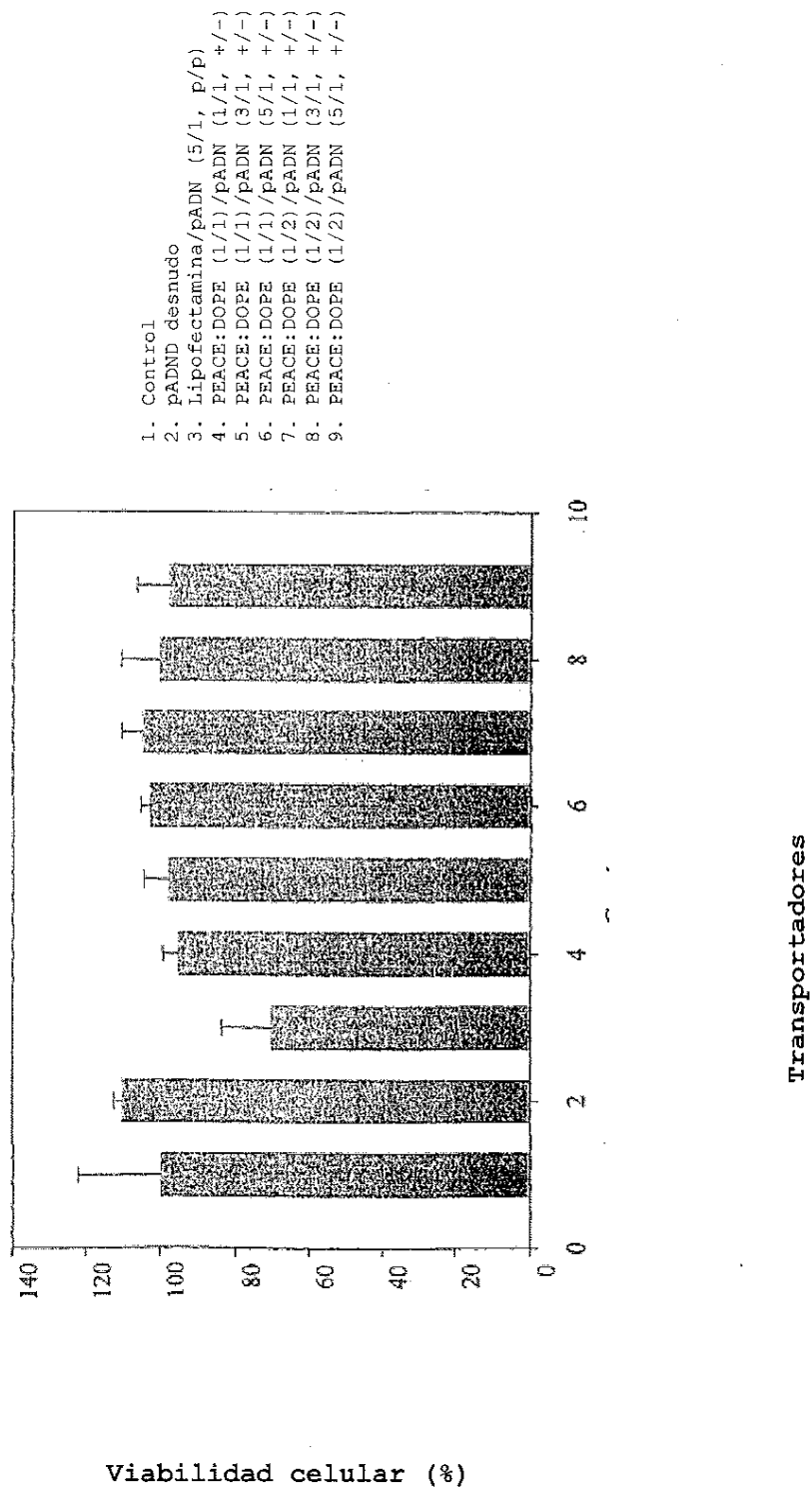


Figura 7A

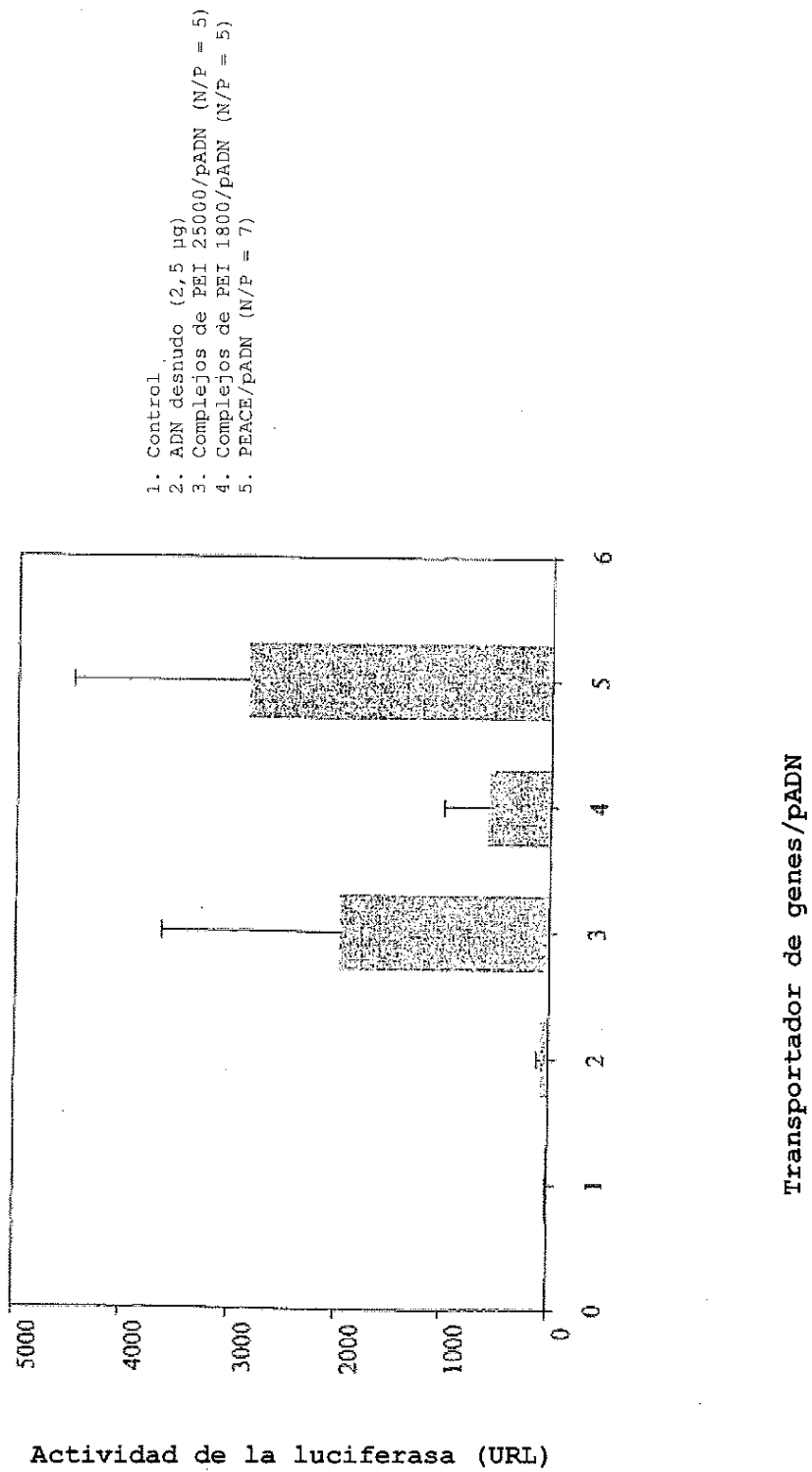


Figura 7B

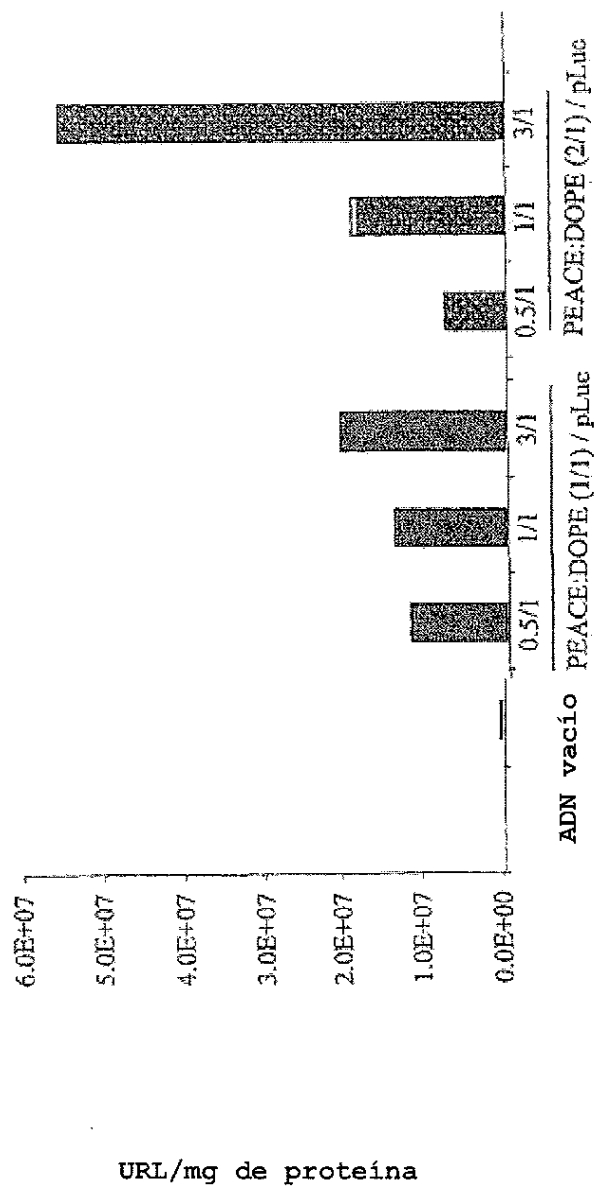
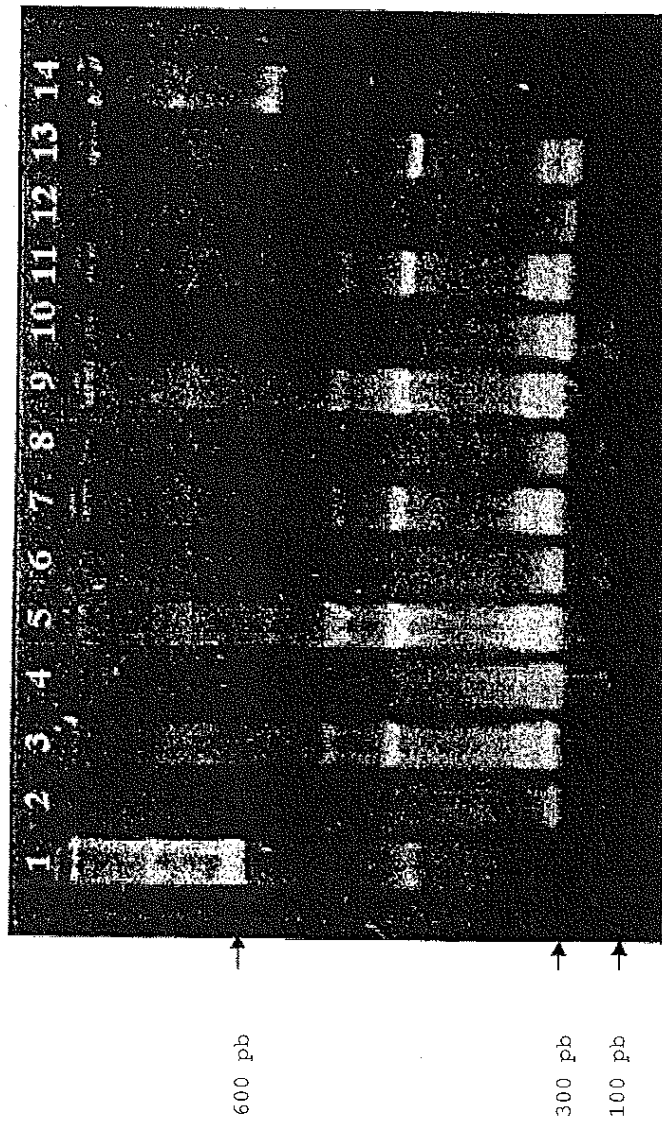


Figura 8



Calle 1: escalera de 100 pb, calles 2 y 4: PEACE:DOPE (1/1)/pmIL-12 (1/1, +/-) β-actina, calles 3 y 5: PEACE:DOPE (1/1)/pmIL-12 (1/1, +/-) MIL-12 p35, calles 6 y 8: PEACE:DOPE (1/1)/pmIL-12 (5/1, +/-) β-actina, calles 7 y 9: PEACE:DOPE (1/1)/pmIL-12 (5/1, +/-) MIL-12 p35, calles 10 y 12: PEACE:DOPE (2/1)/pmIL-12 (3/1, +/-) β-actina, calles 11 y 13: PEACE:DOPE (2/1)/pmIL-12 (3/1, +/-) MIL-12 p35, calle 14: escalera de 100 pb.