

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 647**

51 Int. Cl.:
A01N 43/04 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04758868 .6**
96 Fecha de presentación: **03.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1610612**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **POLÍMEROS ENDOSOMOLÍTICOS.**

30 Prioridad:
04.04.2003 US 460455 P
01.04.2004 US 816081

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

73 Titular/es:
MIRUS BIO CORPORATION
505 S. ROSA RD.
MADISON, WI 53719, US

72 Inventor/es:
ROZEMA, David, B.;
WAKEFIELD, Darren;
WOLFF, Jon, A.;
HAGSTROM, James, E.;
TRUBETSKOY, Vladimir;
BUDKER, Vladimir, G.;
MONAHAN, Sean, D.;
SLATTUM, Paul, M. y
LOOMIS, Aaron, G.

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 371 647 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polímeros endosomolíticos

Antecedentes de la invención

5 El paradigma actual del desarrollo de vectores no víricos para la entrega de ADN, es presentar una unidad vírica y una transferencia de los genes mediante la incorporación, de manera combinatoria, de grupos funcionales que permiten una unidad particular y unas etapas para la transferencia. Los polímeros o los lípidos catiónicos se utilizan para condensar el ADN en pequeñas partículas similares a virus. Esta etapa de condensación se considera importante por varias razones: a) la protección del ADN frente a la inactivación a través de componentes de la sangre, b) la protección del ADN frente a la degradación con nucleasas extracelulares, c) la extravascularización de la partícula a través de pequeños orificios (fenestraciones) en la barrera endotelial (para las vías de administración intravasculares), y d) la endocitosis celular. Los grupos funcionales se incorporan en vectores sintéticos para mejorar la localización de dianas celulares, el escape endosómico y la localización de dianas nucleares del ADN, que se va a entregar. Estas señales incluyen ligandos en la superficie celular, diseñados para dirigir el vector hasta un tipo particular de célula y/o mejorar la captación endocítica de la partícula mediante adsorción o a través de un receptor. El vector también puede contener moléculas diseñadas para mejorar la liberación de la partícula de ADN fagocitada, dentro del citoplasma celular. Aunque los componentes de un vehículo de entrega de ADN se conocen en teoría, la creación de un vector de entrega eficaz no vírico ha sido difícil en la práctica. Los polímeros o los lípidos catiónicos, que son adecuados para la condensación del ADN, tienden a ser tóxicos o tienen una biodistribución escasa. Del mismo modo, los compuestos que pueden poseer una buena actividad de ruptura endosómica, también son con frecuencia tóxicos.

Aunque los polímeros y los lípidos catiónicos son esenciales para condensar el ADN en nanopartículas, su naturaleza catiónica limita su utilidad más extensa para aplicaciones *in vivo*, no sólo por la baja expresión génica, sino también por la toxicidad. La ruta de administración intravascular, una vía atractiva para la entrega con amplia difusión, está particularmente afectada por la toxicidad, así como por problemas de biodistribución. Una disminución de la eficacia de la transfección *in vivo*, se debe en parte a la interacción de los poliplejos o lipoplejos (complejos de polímero-ADN y de liposoma-ADN) con componentes sanguíneos, tales como las proteínas séricas que inhiben la transfección. Este efecto se atribuye generalmente a la opsonización de los complejos de ADN mediante componentes del suero. Además, los complejos de ADN catiónicos inyectados por vía intravenosa también se tropiezan con tipos de células no deseadas, tales como macrófagos, monocitos, neutrófilos, plaquetas y eritrocitos, que son unos importantes mediadores potenciales de la toxicidad. Las manifestaciones tóxicas de complejos de ADN catiónicos administrados de forma sistémica pueden variar desde una aglutinación de glóbulos rojos hasta una reacción inflamatoria fuerte y elevados niveles séricos de enzimas hepáticas. Varios estudios han tratado de evitar tales interacciones adversas, mediante la inclusión de polietilenglicol (PEG) o proteínas, tales como la albúmina o la transferrina, en los complejos de ADN. Otro método propuesto para disminuir la carga de una partícula de ADN condensada en un policationión y, por tanto, para reducir la interacción con los componentes del suero, es recargar el complejo ADN/policationión mediante la adición de un polianión. Complejos alternos de policationes y polianiones forman estructuras en capas cuando se absorben sobre macrosuperficies de soluciones acuosas. Se ha mostrado que un fenómeno similar tiene lugar en la superficie de partículas de ADN condensadas con policationes, cuando forman complejos adicionales con un polianión de tercera capa (documento de solicitud de patente de los EE.UU. nº de serie 09/328975, incorporado en esta memoria como referencia).

El hígado es uno de los tejidos diana más importante para la terapia génica, dado su papel fundamental en el metabolismo (por ejemplo, metabolismo de las lipoproteínas en diversas hipercolesterolemias) y en la secreción de proteínas circulantes (por ejemplo, factores de coagulación en la hemofilia). Por lo menos se podrían corregir cien trastornos genéticos diferentes, al menos parcialmente, con una terapia génica dirigida hacia el hígado. Su frecuencia acumulada es de aproximadamente uno por ciento de todos los nacimientos. Además, los trastornos adquiridos, tales como la hepatitis crónica y la cirrosis son comunes y también se podrían tratar con terapias hepáticas basadas en polinucleótidos. Las terapias génicas que implican la expresión de genes heterotópicos, ampliaría adicionalmente el número de trastornos tratables mediante la transferencia génica dirigida hacia el hígado. Por ejemplo, la diabetes mellitus se podría tratar mediante la expresión del gen de la insulina en los hepatocitos, cuya fisiología puede permitir la secreción de insulina regulada con glucosa. La terapia génica abarca la entrega deliberada de material genético a las células con el fin de tratar una enfermedad, así como para el estudio o la investigación biomédica. La investigación se puede utilizar para estudiar la función génica o para facilitar el descubrimiento o la validación de fármacos.

Aunque los vectores víricos son la base de la mayoría de los estudios preclínicos y de los ensayos clínicos en humanos, para la entrega de ADN a las células hepáticas, las vías no víricas siguen avanzando. Los poliplejos, los lipoplejos y los lipopoliplejos han sido todos propuestos como vectores de entrega en el hígado. La mayor parte de los estudios de transferencia no vírica en el hígado han utilizado poliplejos que normalmente contienen poli-L-lisina o PEI y ligandos para el receptor de la asialoglicoproteína (ASGPr). También se han descritos liposomas y lipopoliplejos para la transferencia génica en el hígado. Estamos orientados en desarrollar nanopartículas de ADN que sean mejores para salvar dos etapas decisivas: pasar a través del sistema circulatorio para acceder a los hepatocitos y liberar su carga genética desde los endosomas. Las partículas pueden contener ligandos para mejorar la localización de dianas en hepatocitos y la absorción.

Resumen de la invención

En esta memoria se describen polímeros lábiles en función del pH, modificados de forma reversible, partículas para la entrega de polinucleótidos que contienen dichos polímeros y métodos para la generación de dichos polímeros y partículas. Las partículas descritas incorporan químicas endosomolíticas y nanotecnologías para ensamblar nanopartículas capaces de entregar polinucleótidos a las células desde la circulación periférica, con la subsiguiente liberación desde los endosomas.

En una realización preferida, se describen compuestos y partículas que incorporan dichos compuestos para liberar moléculas desde un endosoma en el citoplasma de una célula. Los compuestos comprenden polímeros con actividad membranal inhibidos de forma reversible que se someten a eventos selectivos de escisión química en el medio ácido del endosoma. Antes de entrar en el endosoma, la actividad del polímero con actividad membranal se inhibe por la fijación covalente y reversible de un inhibidor. Tras la exposición a condiciones ácidas, tales como en un endosoma o en un lisosoma acidificado, el enlace que une el inhibidor con el polímero se rompe, desenmascarando la actividad membranal del polímero.

En una realización preferida, se describen nanopartículas para la entrega de un polinucleótido a una célula. Las partículas comprenden un polianión asociado iónicamente con un complejo binario de polinucleótido/policación. El polianión, el polianión, o ambos, consisten en un polímero con actividad membranal. Un polianión con actividad membranal se puede inhibir de forma reversible. El polianión puede ser una poliamina con actividad membranal, modificada de forma reversible. El polianión recarga el complejo para reducir la carga positiva del complejo binario o para aumentar la carga negativa de la nanopartícula. La nanopartícula puede estar cargada positivamente, cargada negativamente o cargada de forma neutra. La partícula puede contener una pluralidad de polinucleótidos, policationes o polianiones. Para incrementar la estabilidad de la partícula, se prefieren policationes y polianiones de peso molecular mayor que aproximadamente 10.000 Dalton. La estabilidad de las partículas se puede incrementar adicionalmente por el entrecruzamiento del polianión con el polianión.

En una realización preferida, se describen métodos para la formación de nanopartículas competentes para la transfección, que comprenden: la condensación de un polinucleótido con un polianión para formar un complejo binario y la recarga del complejo binario mediante la adición de un polianión para formar un complejo ternario pequeño (<150 nm), estable, que contiene un polinucleótido cargado negativamente. El polianión, el polianión o ambos consisten en polímeros con actividad membranal. Un polianión con actividad membranal se puede inhibir de forma reversible. El polianión puede ser un polímero con actividad membranal modificada/inhibida de forma reversible. La partícula puede contener una pluralidad de polinucleótidos, policationes o polianiones. Para incrementar la estabilidad de la partícula, se prefieren policationes y polianiones de peso molecular superior a aproximadamente 10.000 Dalton. La estabilidad de las partículas se puede incrementar adicionalmente mediante el entrecruzamiento del polianión con el polianión.

En una realización preferida se describe un método para la entrega de una molécula en el citoplasma de la célula que comprende: la asociación de la molécula con un polímero con actividad membranal que se inhibe de forma reversible para formar un complejo y la entrega del complejo a la célula, en donde se fagocita el complejo. Antes de entrar en el endosoma, la actividad membranal del polímero se enmascara por la fijación covalente de un inhibidor. La escisión química selectiva del (de los) inhibidor(es) del polímero con actividad membranal, se produce en el medio ácido del endosoma, restableciendo la actividad del polímero. La rotura de la membrana endosómica facilita a continuación la liberación de la molécula en el citoplasma de la célula. La liberación endosómica es de suma importancia para el suministro de una amplia variedad de moléculas que son incapaces de difundirse a través de las membranas celulares.

En una realización preferida, se describen polianiones grandes escindibles con ácido que tienen una fuerte actividad endosomolítica y que pueden recargar los complejos que contienen polinucleótidos catiónicos, y métodos para la síntesis de los polianiones grandes escindibles con ácido. Las nanopartículas cargadas negativamente son pequeñas y estables en solución salina fisiológica y poseen actividad transfectora.

Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Ilustración de una modificación química reversible, lábil en función del pH, de una molécula que contiene amina con un derivado de anhídrido maleico, para formar un maleamato seguido de la escisión en medio ácido de la modificación. Para los anhídridos maleicos monosustituídos, R_1 o R_2 es hidrógeno y R_2 o R_1 está unido con el anhídrido a través de un enlace carbono-carbono. Para los anhídridos maleicos disustituídos, R_1 y R_2 están unidos al anhídrido a través de enlaces carbono-carbono.

Fig. 2. Ilustración de una modificación química reversible, lábil en función del pH, de una molécula que contiene amina, con el derivado del anhídrido maleico disustituído CDM (anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico).

Fig. 3. Ilustración de la síntesis de policationes anfífilas de poliviniléter.

Fig. 4. Ilustración del enmascaramiento reversible de la actividad membranal del polímero PBAVE a través de la fijación lábil en función del pH, de inhibidores, al polímero.

Fig. 5. Ilustración de la reticulación lábil en función del pH, de dos moléculas que contienen aminas empleando CDM-tioéster.

5 Fig. 6. Ilustraciones de las estructuras químicas de CDM-PEG, CDM₂-PEG y CDM₃-PEG.

Descripción detallada

10 Hemos desarrollado una estrategia para la liberación endosómica de moléculas impermeables a la membrana. Esta estrategia implica la inactivación reversible de un agente con actividad membranal o de lisis de membrana. La inactivación reversible del agente con actividad membranal se logra fijando un inhibidor o una variedad de inhibidores, al agente con actividad membranal mediante un enlace o una variedad de enlaces que se rompen en el medio ácido de un endosoma. El inhibidor impide que el agente lise la membrana citoplasmática y por lo tanto cause la muerte celular. El inhibidor se elimina del agente en el medio ácido del endosoma, por rotura de un enlace lábil, permitiendo así que el agente con actividad membranal destruya la membrana endosómica para que se realice la liberación de los contenidos endosómicos en el citoplasma.

15 Un elemento clave para limitar la actividad membranal en el endosoma, es el enlace lábil, que debe ser estable bajo condiciones extracelulares, pero muy inestable en la vesícula endosómica. En particular, nos hemos centrado en la identificación de enlaces que se rompen en un medio ácido. La acidificación es una característica del medio endosómico que se explota generalmente por los vehículos de entrega víricos y no víricos. Los agentes que dependen de la protonación para convertirse en activos para la membrana, tales como el ácido polipropilacrílico y los derivados peptídicos de la proteína de la envoltura vírica, hemaglutinina, tienen un grave defecto. La activación del agente provoca la destrucción parcial del endosoma, destruyendo de este modo el gradiente de pH y conduciendo a la inactivación del agente con actividad membranal. Este ciclo puede limitar la eficacia del agente con actividad membranal en la entrega de las macromoléculas en el citoplasma celular. Por el contrario, la invención tal y como se describe en esta memoria, da como resultado la reactivación esencialmente irreversible de los agentes con actividad membranal, después de la exposición a un medio con pH ácido.

20 Una consideración importante en la selección de los enlaces lábiles para el uso en sistemas de entrega celulares, es la cinética de la ruptura del enlace después de la exposición del enlace a un pH ácido. Las cinéticas de acidificación del endosoma y de maduración del endosoma en un lisosoma, son muy rápidas en comparación con las tasas de escisión para la mayoría de los enlaces lábiles en medio ácido, descritos en la bibliografía. Una vez que se produce la endocitosis, el pH desciende desde el pH extracelular (alrededor de 7,4) hasta un pH de aproximadamente 5, en cerca de 10 min. Los contenidos endosómicos se exponen rápidamente a enzimas lisosómicas activas y puede tener lugar la degradación de la molécula que se va a entregar. Por lo tanto, se prefieren los enlaces que se rompen en pocos minutos en el intervalo de pH 5-7.

25 Un enlace bien estudiado que es inestable en función del pH, es el enlace maleamato, que se obtiene de la reacción de una amina y un anhídrido maleico o un derivado de anhídrido maleico (Figura 1). La tasa de escisión del maleamato depende de la estructura del anhídrido maleico utilizado para formar el maleamato. En general, los maleamatos disustituidos son más lábiles que los maleamatos monosustituidos, que son más lábiles que los maleamatos no sustituidos. Los maleamatos monosustituidos son los miembros más estudiados de esta familia, y tienen semividas de horas a un pH <5. De acuerdo con la bibliografía, la disustitución del maleamato da como resultado un incremento de aproximadamente dos órdenes de magnitud de la tasa de escisión. Hemos encontrado que el enlace de maleamato disustituido obtenido a partir de anhídrido dimetilmaleico (R_1 y $R_2 = CH_3$ en la Fig. 1) tiene una semivida de aproximadamente 2 minutos a pH 5. Esta tasa está en el mismo orden que la maduración del endosoma. Por el contrario, hemos observado que los enlaces de maleamato monosustituido obtenido a partir de anhídrido metilmaleico ($R_{1 \text{ o } 2} = H$ y $R_{2 \text{ o } 1} = CH_3$ en la Fig. 1), tienen una semivida de escisión de aproximadamente 300 minutos (5 horas) a pH 5. Para aumentar la carga y la solubilidad, se pueden utilizar derivados de anhídridos dimetilmaleicos, tales como anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (Naganawa y col. 1994; *Carboxylated DimethylMaleic anhydride* o CDM) (Fig. 2).

30 La capacidad de un anhídrido maleico disustituido para inhibir de forma reversible la actividad membranal del péptido melitina, hasta alcanzar el medio ácido del endosoma, ha sido descrita por nosotros (Rozema y col. 2003). Hemos demostrado la capacidad de la melitina inhibida de forma reversible, para entregar moléculas impermeables a la membrana, polietilenglicol y un oligonucleótido, en el citoplasma de la célula. En estos ejemplos de entrega, el reactivo de la entrega (melitina modificada con CDM) y el compuesto, no estaban conectados o asociados entre sí, pero se entregaban independientemente a compartimentos endocíticos comunes en la célula. Para la entrega de moléculas impermeables a la membrana, en el citoplasma de células *in vivo*, debe haber una asociación entre la molécula y el agente de entrega. Nosotros proporcionamos ahora agentes con actividad membranal que pueden estar asociados de forma no covalente con la molécula impermeable a la membrana o estar enlazados covalentemente con la misma, para la entrega de la molécula en el citoplasma de una célula.

Recarga de las partículas de ADN:

El ADN se puede condensar con un exceso de poliacetilación en soluciones acuosas, para formar nanopartículas con carga superficial positiva. Este fenómeno es fundamental, no sólo para la unidad de la cromatina y los virus, sino que también es importante en la construcción de vehículos para la entrega de genes. El excedente de carga positiva contenida en un complejo de ADN condensado y poliacetilación, se puede utilizar para depositar una capa de polianiones sobre la superficie del complejo ADN/poliación, lo que da como resultado partículas cargadas negativamente (o complejos) en un proceso denominado de recarga (documento de solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/328.975). Las partículas cargadas negativamente pueden reducir las interacciones no específicas que tienen las partículas catiónicas con las proteínas del suero, las superficies celulares y la matriz extracelular. La recarga es un proceso en dos etapas. En la primera etapa, el ADN u otro polinucleótido se condensa por la adición de un exceso de poliacetilación para formar una nanopartícula de polinucleótido cargada positivamente. Las formulaciones de entrega típicas de polinucleótidos se detienen en este punto y añaden la nanopartícula a la célula. En el proceso de recarga, un tercer polión (un polianión) se añade a la partícula de poliacetilación/polinucleótido cargada positivamente, para formar un complejo ternario que tiene una carga superficial de neutra a negativa. En condiciones de formulación adecuadas, las partículas son pequeñas (<150 nm), y se denominan nanopartículas.

Los complejos cargados negativamente deben estar en mejores condiciones para circular y dirigirse hacia una diana en células específicas *in vivo*, mediante la reducción de las interacciones no específicas con superficies celulares cargadas negativamente, proteínas del suero y la matriz extracelular.

Polímeros con actividad membranal para la formulación de partículas con polinucleótidos:

A fin de que el agente con actividad membranal, enmascarado de forma reversible facilite la entrega de polinucleótidos o de otras moléculas impermeables a la membrana, a las células, el agente con actividad membranal enmascarado debe estar asociado con la molécula. Agentes pequeños con actividad membranal, de carga general baja, tales como el péptido lítico de la membrana, melitina, pueden formar partículas con polinucleótidos. Sin embargo, estas partículas son grandes (> 150 nm) e inestables (es decir, que aumentan de tamaño, en presencia de concentraciones fisiológicas de sal). Polímeros de mayor tamaño con actividad membranal, se pueden utilizar para formar pequeñas partículas estables, con polinucleótidos. Previamente hemos sintetizado polímeros con actividad membranal compuestos de aminas y de grupos alquilo, a través de la copolimerización de varios éteres alquil vinílicos, con un monómero con la amina protegida (poliacetilaciones anfifílicas de poliviniléter; Fig. 3 y el documento de solicitud de patente de los EE.UU. n° de serie 10/772.502, incorporado en esta memoria como referencia). A modo de ejemplo, una mezcla 50:50 de grupos alquilo y aminas produce polímeros que contienen grupos etilo (PEAVE), propilo (PPAVE) y butilo (PBAVE), utilizando éterato de trifluoruro como iniciador. La desprotección de los grupos ftalimida protectores de amina, da como resultado polímeros solubles en agua con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Dalton.

El polímero PBAVE que contiene butilo se encontró que era aproximadamente 60% tan hemolítico como la melitina, cuando se sometía a ensayo la actividad lítica de los glóbulos rojos. La inhibición reversible de PBAVE se puede lograr mediante la modificación de CDM. La incubación del polímero modificado a pH 5, restablecía la capacidad lítica con una semivida de aproximadamente 10 minutos. Por lo tanto, la actividad membranal del polímero PBAVE se puede controlar modificando el polímero con CDM. En condiciones básicas, el polímero no produce la lisis de la membrana. Después de la acidificación, el inhibidor de CDM se escinde del polímero y se restablece la actividad membranal del polímero (Fig. 4). La actividad endosomolítica de CDM-PBAVE se demuestra por su capacidad para entregar un polinucleótido a las células (véase el ejemplo 5 más abajo). El CDM y los derivados de CDM se pueden utilizar para modificar cualquier polímero con actividad membranal que contenga amina.

Recarga de nanopartículas con polímeros con actividad membranal inhibida de forma reversible:

Además de enmascarar la actividad membranal de un polímero que contiene amina, la modificación de un polímero con el derivado de anhídrido maleico CDM, convierte de forma reversible adicionalmente las cargas positivas en el polímero, en grupos carboxilo cargados negativamente. Por lo tanto, un poliacetilación se puede convertir en un polianión. Después de la condensación de un polinucleótido con un primer poliacetilación para formar un complejo binario o una partícula de menor tamaño, se puede utilizar entonces un polianión para recargar el complejo binario y formar un complejo o una partícula ternaria que tenga una carga de superficie menos positiva o más negativa que el complejo binario. En la recarga de una partícula que contiene un polinucleótido, con un segundo poliacetilación modificado con CDM, la capa de la recarga es lábil en un medio ácido.

La exposición de esta nanopartícula recargada a condiciones ácidas, da como resultado la escisión de los grupos CDM del polianión, con la consiguiente pérdida de la carga negativa del polímero de recarga. La reversión del polianión a un poliacetilación con actividad membranal (segundo poliacetilación) puede tener varios efectos que incluyen: la desestabilización de la partícula, la liberación del agente con actividad membranal en la vesícula endocítica y el aumento de la interacción del primer poliacetilación con la membrana de la vesícula endocítica. El primer poliacetilación también puede ser un polímero con actividad membranal y podría ser de la misma especie que el segundo poliacetilación con actividad membranal. La rotura del endosoma mediante el(los) polímero(s) con actividad membranal, da como resultado la entrega en el citoplasma del polinucleótido o de otra molécula presente originalmente en la partícula recargada.

Transfección con nanopartículas pequeñas, cargadas negativamente, inestables frente a ácido:

Se ha demostrado que la endosomolisis se puede lograr modificando de forma reversible un péptido con actividad membranal, tal como melitina, con derivados de anhídrido maleico (Rozema y col. 2003; documento de solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/444.662). Se ha mostrado la capacidad de CDM-melitina para entregar macromoléculas de polietilenglicol y un análogo oligonucleótido sin carga. Sin embargo, con el fin de incorporar agentes enmascarados con actividad membranal en vectores de entrega de polinucleótidos, sintetizamos polímeros de tamaño y carga suficientes para que se formulen en forma de nanopartículas estables que contienen polinucleótidos. A modo de ejemplo, el polication PBAVE se sintetizó y se demostró que tenía actividad membranal y la capacidad para formar pequeñas partículas estables con ADN. El enmascaramiento de la actividad membranal de PBAVE mediante la reacción con CDM, daba como resultado un polianión que se puede utilizar para recargar partículas de ADN/polication para producir nanopartículas pequeñas con carga negativa e inestables en medio ácido.

Las nanopartículas compuestas de ADN:PBAVE:CDM-PBAVE se formularon en una relación en peso de 10:20:80 y se aplicaron a cultivos de células hepáticas de ratón (Hepa-1c1c7) en cultivo de tejidos, en presencia de DMEM y 10% de suero. El ADN utilizado en las formulaciones de entrega era pCILuc, que contiene un gen que codifica luciferasa. La capacidad de transfección de los complejos se determinó con la medición de las unidades relativas de luz de la luciferasa, producidas por las células que se habían tratado con nanopartículas que contenían pCILuc. Como testigo para el polímero con actividad membranal inhibida de forma reversible (CDM-PBAVE), las partículas también se construyeron utilizando PBAVE-succinilado (PBAVE-S) y PBAVE *cis*-aconitilado (PBAVE-A). El anhídrido *cis*-aconítico es un derivado monosustituido del anhídrido maleico que tiene un sustituyente de carboxilato (CH₂CO₂H) en el anhídrido maleico. La succinilación es irreversible y la aconitilación en *cis* se escinde con una semivida de aproximadamente 300 minutos a pH 5.

Existe una dependencia de la transfección, de la labilidad del grupo usado para modificar/inhibir el agente con actividad membranal PBAVE. Los polímeros con actividad membranal, enmascarados de forma reversible, CDM-PBAVE y PBAVE-A fueron capaces de transfectar células, mientras que el polímero modificado de manera irreversible (PBAVE-S) era inactivo. Además, las nanopartículas que contenían CDM-PBAVE (enlaces de maleamato disustituidos) tenían 30 veces más actividad transfectora que las nanopartículas formadas con PBAVE-A (enlaces de maleamato monosustituidos). El aumento de la capacidad de transfección de las partículas que contienen CDM-PBAVE está relacionado más probablemente con la mayor labilidad del derivado de anhídrido maleico disustituido con CDM, con respecto al derivado de anhídrido maleico monosustituido *cis*-aconítico. Se esperan resultados similares para otros polímeros con actividad membranal que contienen amina.

Estabilidad de las partículas incrementada por la unión covalente entre polímeros:

Además de la estabilidad de las partículas debida a las fuerzas electrostáticas entre polication y polianión, la estabilidad de la partícula también se puede mejorar por la formación de enlaces covalentes, es decir, entrecruzamiento entre los polímeros. Sin embargo, el entrecruzamiento irreversible del polication y el polianión da como resultado partículas que son ineficaces para la entrega de ácidos nucleicos biológicamente activos. Con el fin de proveer a las partículas con estabilidad del entrecruzamiento, sin dejar de proporcionar a las partículas una inestabilidad intracelular, el polication y el polianión de una nanopartícula se pueden unir covalentemente a través de una pluralidad de enlaces de maleamato inestables en medio ácido. Con el fin de acoplar un polianión a base de CDM con una poliamina, es necesario utilizar un grupo de reticulación que pueda reaccionar con aminas sólo después de que el anhídrido haya reaccionado para formar el grupo maleamato basado en CDM. Esta selectividad de la reacción es necesaria porque tanto la formación del maleamato como el entrecruzamiento entre el polianión y el polication, implican reacciones con aminas. Como consecuencia de ello, para acoplar de forma selectiva un polianión basado en CDM y una poliamina, debe haber selectividad en las reacciones de la amina. Un método para llevar a cabo esta selectividad, es proporcionar, sobre un derivado de CDM, un grupo funcional para el entrecruzamiento que sea menos reactivo que el grupo anhídrido implicado en la formación del maleamato. Un ejemplo de un grupo funcional tal, es un tioéster. Un tioéster es moderadamente reactivo con una amina en relación con un anhídrido. Empleando un derivado de tioéster de CDM, es posible conectar dos aminas entre sí, a través de un enlace de maleamato inestable en función del pH (Fig. 5).

Además del enlace del maleamato, se pueden incorporar otros enlaces inestables en función del pH, en los reactivos de entrecruzamiento que incluyen los acetales, los éteres de enol y las hidrazonas. En particular, los acetales obtenidos a partir de benzaldehído y derivados de benzaldehído, son muy inestables en función del pH.

Aumento de la estabilidad de las partículas por la fijación covalente de polietilenglicol:

Además de incrementar la estabilidad en presencia de una sal, la localización de dianas con partículas *in vivo* requiere la reducción de interacciones no específicas, con componentes del suero y con células que no sean diana. Con el fin de reducir dichas interacciones con los vehículos de entrega, muchos investigadores han fijado polietilenglicol (PEG) (Kircheis y col. 2001; Woodle y col. 1992), un polímero sin carga hidrosoluble, a partículas que contienen ácido nucleico. Sin embargo, el PEG también disminuye la capacidad de transfección de las partículas. Con el fin de obtener los beneficios de la PEGilación, manteniendo la capacidad de transfección, se han sintetizado una serie de reactivos de PEGilación obtenidos a partir de anhídrido dimetilmaleico. La fijación de una pluralidad de gru-

pos de anhídrido dimetilmaleico a un solo grupo de PEG, permite la formación de una pluralidad de enlaces covalentes reversibles, incrementando de este modo con la partícula la estabilidad de una partícula (Fig. 6). Una pluralidad de grupos de PEG se pueden fijar covalentemente a una partícula.

- 5 *Actividad membranal* - Polímeros o compuestos con actividad membranal son moléculas que son capaces de alterar la estructura de la membrana. Este cambio en la estructura se puede observar con el compuesto, que induce uno o varios de los siguientes efectos sobre una membrana: una alteración que permite la permeabilidad de pequeñas moléculas, la formación de poros en la membrana, una fusión y/o fisión de membranas, una alteración que permite la permeabilidad de moléculas grandes, o una disolución de la membrana. Esta alteración se puede definir funcionalmente por la actividad del compuesto en al menos uno de los siguientes ensayos: lisis de glóbulos rojos (hemólisis), fuga de liposomas, fusión de liposomas, fusión de células, lisis celular y entrega de endosomas.

10 *Polímero* - Un polímero es una molécula formada por la unión entre sí repetitiva, de unidades más pequeñas llamadas monómeros. Un polímero puede ser de tipo lineal, de red ramificada, en forma de estrella, de peine o de escalera. Un polímero puede ser un homopolímero en el que se utiliza un solo monómero o puede ser un copolímero en el que se utilizan dos o más monómeros.

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

20 *Policación* - Un policación puede ser un polímero que posee una carga neta positiva, por ejemplo, bromhidrato de poli-L-lisina o una histona. El policación polimérico puede contener unidades de monómeros que están cargadas positivamente, de carga neutra o cargadas negativamente, sin embargo, la carga neta del polímero debe ser positiva. Un policación también puede ser una molécula no polimérica que contiene dos o más cargas positivas.

- 25 *Polianión* - Un polianión puede ser un polímero que contiene una carga neta negativa, por ejemplo, poli(ácido glutámico). El polianión polimérico puede contener unidades de monómeros que se cargan negativamente, de carga neutra o cargadas positivamente, sin embargo, la carga neta del polímero debe ser negativa. Un polianión también puede ser una molécula no polimérica que contiene dos o más cargas negativas.

- 30 Otros componentes de los monómeros y polímeros: los polímeros pueden tener grupos funcionales que potencian su utilidad. Estos grupos se pueden incorporar en los monómeros antes de la formación de polímeros o se pueden fijar al polímero después de su formación. Los grupos funcionales se pueden seleccionar a partir de la lista que consiste en: grupos localizadores de la diana, modificadores de la interacción, estabilizadores estéricos y compuestos con actividad membranal, grupos de afinidad y grupos reactivos.

- 35 *Grupos localizadores de la diana* - Los grupos localizadores de la diana o ligandos, se utilizan para localizar la diana con el polímero o con los polímeros complejos en células, en células específicas, en tejidos o en lugares específicos en una célula. Los grupos localizadores de la diana mejoran la asociación de moléculas con una célula. Ejemplos de grupos localizadores de la diana incluyen los que se dirigen a la diana del receptor de la asialoglicoproteína, empleando asialoglicoproteínas o residuos de galactosa. Otras proteínas, tales como la insulina, el EGF o la transferrina se pueden utilizar para la localización de una diana. Otros grupos localizadores de dianas incluyen moléculas que interaccionan con membranas, tales como ácidos grasos, colesterol, compuestos de dansilo y derivados de anfotericina. Se ha empleado una variedad de ligandos para dirigir fármacos y genes a células y a receptores celulares específicos. El ligando puede buscar una diana dentro de la membrana celular, sobre la membrana celular o cerca de una célula. La unión de un ligando con un receptor puede iniciar la endocitosis.

- 45 *Estabilizador estérico* - Un estabilizador estérico es un grupo hidrófilo de cadena larga que impide la agregación del polímero final mediante una partícula que impide estéricamente las interacciones electrostáticas de partículas. Algunos ejemplos incluyen: los grupos alquilo, las cadenas de PEG, los polisacáridos, las moléculas de hidrógeno, las alquil aminas.

- 50 *Modificador de la interacción* - Un modificador de la interacción cambia la forma en que una molécula interacciona consigo misma o con otras moléculas, en relación con la molécula que no contiene ningún modificador de la interacción. El resultado de esta modificación es que la autointeracción o las interacciones con otras moléculas, aumentan o disminuyen. Por ejemplo las señales para la localización de dianas celulares son modificadoras de la interacción con un cambio de la interacción entre una molécula y una célula o un componente celular. El polietilenglicol es un modificador de la interacción que disminuye las interacciones entre moléculas y consigo mismos y con otras moléculas.

- 55 Una unión inestable es un compuesto químico que contiene un enlace inestable y proporciona una unión o un espaciador entre otros dos grupos. Los grupos que están unidos se pueden elegir a partir de compuestos tales como compuestos biológicamente activos, compuestos con actividad membranal, compuestos que inhiben la actividad membranal, grupos funcionales reactivos, monómeros y señales localizadoras de una diana celular. El grupo espa-

ciador puede contener restos químicos escogidos entre un grupo que incluye alcanos, alquenos, ésteres, éteres, glicerol, amida, sacáridos, polisacáridos y heteroátomos, tales como oxígeno, azufre o nitrógeno. El espaciador puede ser electrónicamente neutro, puede tener una carga positiva o negativa, o puede tener cargas positivas y negativas con una carga total neutra, positiva o negativa.

- 5 Lábil en función del pH se refiere a la rotura selectiva de un enlace covalente en condiciones ácidas (pH <7). Es decir, el enlace inestable en función del pH puede romperse bajo condiciones ácidas en presencia de otros enlaces covalentes que no se rompen. La expresión lábil en función del pH incluye tanto las uniones como los enlaces que son inestables en función del pH, muy inestables en función del pH y extremadamente inestables en función del pH.

- 10 *Grupos localizadores de la diana* – Los grupos localizadores de la diana o ligandos, se utilizan para localizar la diana del polímero o de los polímeros complejos en células, en células específicas, en tejidos o en lugares específicos en una célula. Los grupos localizadores de la diana mejoran la asociación de las moléculas con una célula. Ejemplos de grupos localizadores de la diana incluyen los que se dirigen a la diana del receptor de la asialoglicoproteína, empleando asialoglicoproteínas o residuos de galactosa. Otras proteínas, tales como la insulina, el EGF o la transferrina se pueden utilizar para la localización de una diana. Otros grupos localizadores de la diana incluyen moléculas que interactúan con membranas, tales como ácidos grasos, colesterol, compuestos de dansilo y derivados de anfotericina. Se ha empleado una variedad de ligandos para dirigir fármacos y genes hasta células y receptores celulares específicos. El ligando puede buscar una diana dentro de la membrana celular, sobre la membrana celular o cerca de una célula. La unión de un ligando con un receptor puede iniciar la endocitosis.

- 20 *Polinucleótido* – El término polinucleótido, o ácido nucleico o poli(ácido nucleico), es un término técnico que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos son las unidades monómeras de polímeros polinucleótidos. Los polinucleótidos con menos de 120 unidades monómeras se denominan frecuentemente oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales tienen una cadena principal de desoxirribosa o de ribosa-fosfato. Un polinucleótido artificial o sintético es cualquier polinucleótido que se polimeriza *in vitro* o en un sistema exento de células y que contiene las mismas bases o similares, pero puede contener una cadena principal de un tipo distinto a la cadena principal natural de ribosa-fosfato. Estas cadenas principales incluyen: PNAs (ácidos nucleicos peptídicos), fosforotioatos, fosforodiamidatos, morfolinós y otras variantes de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos naturales. Las bases incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen además los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales. Los derivados sintéticos de las purinas y las pirimidinas incluyen modificaciones, pero no se limitan a las mismas, que colocan nuevos grupos reactivos, tales como, pero no limitados a los mismos, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo. El término base abarca cualquiera de los análogos conocidos de bases de ADN y ARN. El término polinucleótido incluye el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) y las combinaciones de ADN, ARN y otros nucleótidos naturales y sintéticos.

- 35 Un polinucleótido se puede entregar a una célula para expresar una secuencia de nucleótidos exógena, para inhibir, eliminar, aumentar o alterar la expresión de una secuencia de nucleótidos endógena, o para afectar a una característica fisiológica específica que no está asociada naturalmente con la célula.

- 40 Un inhibidor de la expresión génica a base de polinucleótido comprende cualquier polinucleótido que contiene una secuencia cuya presencia o expresión en una célula provoca la degradación o inhibe la función, de la transcripción o la traducción de un gen de una forma específica de la secuencia. Los inhibidores de la expresión basados en polinucleótidos se pueden seleccionar entre el grupo que comprende: ARNsi, microARN, ARN de interferencia o ARNi, ARNds, ribozimas, polinucleótidos no codificantes y casetes de expresión de ADN que codifican siARN, microARN, ARNds, ribozimas o ácidos nucleicos no codificantes. El ARNsi comprende una estructura bicatenaria que contiene típicamente 15-50 pares de bases y, preferentemente, 19-25 pares de bases, y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a la de un gen o un ARN diana expresado dentro de la célula. Un ARNsi puede estar compuesto por dos polinucleótidos reasociados o un solo polinucleótido que forma una estructura de horquilla. Los microARNs (miARNs) son polinucleótidos pequeños no codificantes, con aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que dirigen la destrucción o reprimen la traducción de sus dianas de ARNm. Los polinucleótidos no codificantes comprenden la secuencia que es complementaria a un gen o a un ARNm. Los polinucleótidos no codificantes incluyen, pero no se limitan a los mismos: morfolinós, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares. El inhibidor de la expresión basado en polinucleótidos se puede polimerizar *in vitro*, puede ser recombinante, contener secuencias quiméricas, o puede ser un derivado de estos grupos. El inhibidor de la expresión basado en polinucleótidos puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o cualquier combinación adecuada de manera que el ARN y/o el gen diana estén inhibidos.

- 55 *Transfección* - El proceso de entrega de un polinucleótido a una célula se ha denominado comúnmente transfección o el proceso de transfección y también se ha denominado transformación. El término transfección, tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a la introducción en las células de un polinucleótido u otro compuesto biológicamente activo. El polinucleótido se puede utilizar para fines investigativos o para producir un cambio en una célula que puede ser terapéutico. La entrega de un polinucleótido puede conducir a la modificación del material genético presente en la célula diana. Un reactivo de transfección o un vehículo de entrega es un compuesto o compuestos que se une(n) o forma(n) un complejo con oligonucleótidos y polinucleótidos, y es un mediador de su entrada en las células.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (anhídrido carboxidimetilmaleico o CDM).

A una suspensión de hidruro de sodio (0,58 g, 25 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano anhidro, se añadió 2-fosfonopropionato de trietilo (7,1 g, 30 mmol). Cuando se detuvo la evolución de gas hidrógeno, se añadió 2-oxoglutarato de dimetilo (3,5 g, 20 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro y se agitó durante 30 minutos. A continuación se añadió agua, 10 ml, y el tetrahidrofurano se eliminó por evaporación rotatoria. La mezcla resultante de sólidos y agua se extrajo con 3 x 50 ml de éter etílico. Las extracciones de éter se combinaron, se secaron con sulfato de magnesio, y se concentraron hasta obtener un aceite de color amarillo claro. El aceite se purificó por elución con cromatografía en gel de sílice, con 2:1 de éter:hexano, para producir 4 g (82% de rendimiento) de triéster puro. El anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico se formó a continuación, disolviendo este triéster en 50 ml de una mezcla 50/50 de agua y etanol, que contenía 4,5 g (5 equivalentes) de hidróxido de potasio. Esta solución se calentó a reflujo durante 1 hora. El etanol se eliminó después por evaporación giratoria y la solución se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico. Esta solución acuosa se extrajo luego con 200 ml de acetato de etilo, que se aisló, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró hasta obtener un sólido blanco. Este sólido se recrystalizó a continuación en diclorometano y hexano para producir 2 g (80%) de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico.

Ejemplo 2. Síntesis de tioéster de CDM.

A una solución de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (30 mg, 0,16 mmol) en 5 ml de cloruro de metileno, se añadió cloruro de oxalilo (200 mg, 10 eq) y dimetilformamida (1 µL). La reacción se dejó transcurrir durante una noche, en la cual el exceso de cloruro de oxalilo y de cloruro de metileno se eliminó por evaporación rotatoria, para obtener el cloruro de ácido, un aceite transparente. El cloruro de ácido se disolvió en 1 ml de cloruro de metileno. A esta solución se añadieron 2 equivalentes de ácido tioglicólico y piridina (20 µL, 1,5 eq) en 10 ml de cloruro de metileno. La solución se agitó después durante una noche. El disolvente se eliminó a continuación y el sólido resultante se disolvió en 5 ml de agua y se purificó mediante HPLC de fase inversa, utilizando un gradiente de TFA al 0,1% en agua/acetronitrilo.

Ejemplo 3. Síntesis de poli(éteres de vinilo).

Se añadió 2-viniloxi etil ftalimida (1 g, 4,6 mmol) a un matraz de base redonda secado en un horno, bajo un manto de nitrógeno en diclorometano anhidro, a esta solución se añadió éter etil vinílico (0,332 g, 4,6 mmol), éter propil vinílico (0,396 g, 4,6 mmol) o éter butil vinílico (0,460 g, 4,6 mmol). Estas soluciones se llevaron a continuación a -78°C y se añadió BF₃•OEt₂ (0,065 g, 0,46 mmol) y la reacción se dejó transcurrir durante 2 horas a -78°C. La polimerización se detuvo a continuación por la adición de una mezcla 50/50 de hidróxido de amonio en metanol. Los disolventes se eliminaron después por evaporación giratoria. El polímero se disolvió a continuación en 30 ml de 1,4-dioxano/metanol (2/1). A esta solución se añadió hidrazina (0,147 g, 46 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. Los disolventes se eliminaron a continuación, por evaporación rotatoria y el sólido resultante se completó luego hasta 20 ml de HCl 0,5 M y se sometió a reflujo durante 15 minutos, se diluyó con 20 ml de agua destilada, y se mantuvo a reflujo durante una hora adicional. Esta solución se neutralizó después con NaOH, se enfrió hasta temperatura ambiente y se transfirió a un tubo de celulosa de peso molecular 3.500 y se dializó durante 24 horas (2 x 20 L) frente a agua destilada, y se liofilizó.

Ejemplo 4. Hemólisis mediante melitina, PEAVE, PPAVE, PBAVE y PBAVE modificado con CDM.

La actividad membranal de los polímeros catiónicos anfífilicos se sometió a ensayo según el procedimiento publicado. Se añadieron 10⁸ glóbulos rojos a 500 µl de tampón fosfato. A esta solución, se añadieron 20 g de melitina, PEAVE, PPAVE, PBAVE o CDM-PBAVE, que se había preparado por acilación de PBAVE con 2 eq. de CDM en relación con las aminas. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37°C, después se centrifugaron durante 1 minuto a 15.000 RCF. La lisis se determinó midiendo la absorbancia del material sobrenadante a 541 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó suponiendo que la absorbancia de hemoglobina liberada después de la adición de agua destilada era el 100% de lisis. Se determinó que todos los polímeros que eran hemolíticos, siendo PBAVE y melitina los más líticos. El polímero PBAVE modificado con CDM no era hemolítico hasta la acidificación.

Ejemplo 5. Inducción de luciferasa después de la entrega del oligonucleótido.

Células HeLa Luc/705 (Gene Tools, Philomath OR) se cultivaron con las condiciones utilizadas para las células HeLa. Las células se extendieron en placas de cultivo con 24 pocillos, a una densidad de 3 x 10⁶ células/pocillo y se incubaron durante 24 horas. Los medios se sustituyeron con 1,0 ml de DMEM con 10% de suero de ternera fetal y PMO 2,5 nmol (CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A, SEQ ID 1, Gene Tools, Philomath, OR) con o sin 20 µg de PBAVE modificado con CDM. Las células se incubaron a continuación durante 48 horas en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Las células se recogieron y se analizaron los lisados para estudiar la expresión de luciferasa, usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La adición de PBAVE modificado con CDM daba como resultado un incremento de 2-3 veces de la actividad luciferasa.

Ejemplo 6. Transfección con partículas de ADN inestables en medio ácido:

Células Hepa (una línea celular de hepatocitos de ratón) se cultivaron en 1 ml de medio Eagle modificado con Dulbecco que contenía 10% de suero de ternera fetal, utilizando placas de 12 pocillos. Las nanopartículas de PBAVE se formularon de acuerdo con las proporciones mencionadas, con ADN plasmídico pCiluc (10 µg/ml, pCiluc, preparado según el procedimiento publicado en 0,5 mL de HEPES 5 mM pH 7,5). Como testigos para la modificación con CDM inestable en función del pH, se generaron polianiones a partir de las poliaminas usando anhídrido succínico que modifica irreversiblemente la amina, y anhídrido aconítico que modifica de forma reversible la amina, pero es mucho más lento para escindir que CDM, para formar PBAVE-S y PBAVE-A, respectivamente. Las nanopartículas, 2 µg de ADN, se añadieron a continuación (200 µL) a las células. Las células se incubaron durante 48 h. Las células se recogieron y se sometió a ensayo la expresión de luciferasa, tal y como se ha informado anteriormente. Se utilizó un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de transfección es la transfección promedio de dos pocillos celulares separados. La cantidad de luciferasa en picogramos = $5,1 \times 10^{-5}$ (URL) +3,683.

Formulación	Unidades Relativas de Luz
ADN: PBVE:CDM-PBAVE 10:20:80 µg/ml	1.875.801
ADN:PBVE:PBAVE-S 10:20:80 µg/ml	195
ADN:PBVE:PBAVE-A 10:20:80 µg/ml	68.549
ADN desnudo	200

Ejemplo 7. Transfección con partículas recargadas inestables en medio ácido in vivo.

Nanopartículas de PBAVE se formularon de acuerdo con las proporciones mencionadas con ADN plasmídico pCiluc (30 µg/ml, pCiluc; preparado según el procedimiento publicado, en 0,5 mL de HEPES 5 mM pH 7,5). Las nanopartículas, 9 µg de ADN, se inyectaron a continuación en la vena de la cola (300 µL) de los ratones. Veinticuatro horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados, se extirparon sus hígados y se analizó la expresión de luciferasa, tal y como se ha informado anteriormente. Se empleó un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de transfección es la transfección promedio de un grupo de tres ratones. La cantidad de luciferasa en picogramos = $5,1 \times 10^{-5}$ (URL) +3,683.

Formulación	Unidades Relativas de Luz
ADN: PBVE:CDM-PBAVE 30:60:240 µg/ml	30.123
ADN desnudo	1.021

Ejemplo 8. Tamaño de la partícula en ausencia y en presencia de sal y medición del potencial z.

Nanopartículas entre ADN y PEAVE y CDM/PEAVE modificado con tioéster de CDM se formularon en tampón HEPES 20 mM pH 7,5, de acuerdo con las proporciones en peso presentadas anteriormente, con una concentración de ADN de 10 µg/ml. Para los polímeros modificados con CDM/tioéster de CDM, el tioéster de CDM se mezcló con CDM en una proporción en peso de 9:1, antes de la mezcla con el polímero. El tamaño de las nanopartículas y el potencial z se determinaron por la dispersión de la luz a 532 nm, utilizando un medidor de partículas 190 ZetaPlus de Brookhaven Instruments Corporation. La estabilidad de las nanopartículas frente a una sal, se determinó mediante la adición de cloruro de sodio hasta 150 mM y la medición del tamaño después de 10 min.

Partículas prop. en peso del polímero (µg/ml)	Tamaño (nm) en HEPES 20 mM pH 7,5	Tamaño (nm) en NaCl 150 mM
ADN: PEAVE: CDM-PEAVE		
10:20:100	90-110	> 1000
5:10:100	90-130	> 1000
ADN:PEAVE:CDM/CDMtioester-PEAVE		
10:20:100	90-110	114
5:10:100	90-130	118

Ejemplo 9. Transfección de partículas de ADN entrecruzadas con CDM-tioéster.

Células Hepa (una línea celular de hepatocitos de ratón) se cultivaron en 1 ml de medio Eagle modificado con Dulbecco que contenía 10% de suero de ternera fetal, utilizando placas de 12 pocillos. Las nanopartículas de PBAVE se formularon de acuerdo con las proporciones mencionadas con ADN plasmídico pCiluc (10 µg/ml, pCiluc; preparado según el procedimiento publicado en 0,5 mL de HEPES 5 mM pH 7,5). Para los polímeros modificados con CDM/tioéster de CDM, el tioéster de CDM se mezcló con CDM en una proporción en peso de 9:1, antes de la mezcla con el polímero. Las nanopartículas, 2 µg de ADN, se añadieron después (200 µL) a las células. Las células se incu-

baron durante 48 h. Las células se recogieron y se analizó la expresión de luciferasa, tal y como se ha informado anteriormente. Se utilizó un luminómetro de Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de transfección es el promedio de transfección para dos pocillos celulares separados. La cantidad de luciferasa en picogramos = $5,1 \times 10^{-5}$ (URL) + 3,683.

Formulación	Unidades Relativas de Luz
ADN: PBAVE:CDM-PBAVE 10:40:100 µg/ml	774.432
ADN:PBAVE:CDM-PBAVE 10:20:50 µg/ml	4.967.879
ADN:PBAVE:CDM/CDM-tioéster-PBAVE 10:40:100 µg/ml	1.040.076
ADN: PBAVE:CDM/CDM-tioéster-PBAVE 10:20:50 µg/ml	2.276.733

5 *Ejemplo 10. Síntesis de éteres monometílicos de amino polietilenglicol.*

10 A una solución de 10% en peso de éter monometílico de PEG de diferentes pesos moleculares en cloruro de metileno, se añaden 3 equivalentes de cloruro de mesilo y trietilamina. Después de agitar durante una noche, la solución se lava con un volumen igual de agua saturada con NaHCO₃. La capa orgánica se seca a continuación con sulfato de sodio y el PEG precipita en la solución, mediante la adición de 9 equivalentes en volumen de éter dietílico. Se permite la precipitación de mesilato de PEG durante una noche a -78°C. El mesilato de PEG se disuelve a continuación hasta 15% en peso en agua y 10 equivalentes de amina (etilendiamina o Tris(2-aminoetil)amina). La reacción se deja transcurrir durante 48 horas y el PEG modificado con amina se purifica utilizando HPLC de fase inversa con un gradiente de TFA al 0,1% en agua/acetonitrilo.

15 *Ejemplo 11. Síntesis de derivados de CDM-PEG.*

20 A una solución de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (30 mg, 0,16 mmol) en 5 ml de cloruro de metileno, se añadió cloruro de oxalilo (200 mg, 10 eq) y dimetilformamida (1 µL). La reacción se dejó transcurrir durante una noche en la cual el exceso de cloruro de oxalilo y de cloruro de metileno se eliminó por evaporación rotatoria, para obtener el cloruro de ácido, un aceite transparente. El cloruro de ácido se disolvió en 1 ml de cloruro de metileno. A esta solución se añadieron 2 equivalentes de éter monometílico de amino polietilenglicol, de diferentes pesos moleculares, y piridina (20 µL, 1,5 eq) en 10 ml de cloruro de metileno. La solución se agitó a continuación durante una noche. El disolvente se eliminó después y el sólido resultante se disolvió en 5 ml de agua y se purificó empleando HPLC de fase inversa con un gradiente de TFA al 0,1% en agua/acetonitrilo.

25 *Ejemplo 12. Tamaño de las partículas en ausencia y en presencia de sal y medición del potencial z.*

30 Las nanopartículas entre 10 µg/ml de ADN y 20 µg/ml de PBAVE se formularon en tampón HEPES 20 mM pH 7,5. A esta solución no se añadió nada o 100 µg de CDM-PEG₂ (el peso molecular del PEG era 1100). El tamaño de las nanopartículas se determinó por la dispersión de luz a 532 nm, utilizando un medidor de partículas 190 ZetaPlus de Brookhaven Instruments Corporation. La estabilidad de las nanopartículas frente a la sal se determinó mediante la adición de cloruro de sodio hasta 150 mM y la medición del tamaño después de 10 min. Sin adición de CDM-PEG₂, las partículas de ADN/polición crecían desde 100 hasta > 1000 nm después de la adición de cloruro de sodio. Después de una modificación con CDM-PEG₂, este incremento del tamaño de las partículas no tenía lugar en presencia de sal.

35 *Ejemplo 13. Condensación y descondensación del ADN después de la adición de sal y ácido poliacrílico.*

40 El ADN se marcó con el reactivo para marcar ADN con tetrametilrodamina LabelIT (Mirus Corporation) con una proporción en peso de 1:1 de ADN:LabelIT, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una solución de 1 µg/ml de ADN marcado con tetrametilrodamina se condensó mediante la adición de 10 µg/ml de PBAVE en presencia del tampón TAPS a pH 9. A esta solución se añadieron diversas cantidades de CDM-PEG₂ y CDM-PEG₃. A continuación, se añadió a la solución NaCl para llevar la concentración hasta 150 mM. Finalmente se añadió poli(ácido acrílico) hasta 100 µg/ml. Después de la adición de cada reactivo, la fluorescencia de la rodamina se midió utilizando un espectrofluorómetro Varian estimulando a 555 nm y midiendo la emisión a 575 nm. Una disminución de la fluorescencia es un indicador de la condensación del ADN, mientras que un aumento indica una descondensación del ADN.

Muestra	Fluorescencia relativa
ADN solo	1,0
+ PBAVE	0,2
+ 40 µg de PEG(1100)-CDM ₂	0,3
+ NaCl 150 mM	0,3
+ 100 µg/ml de PACAC	0,75
ADN solo	1,0
+ PBAVE	0,2

Muestra	Fluorescencia relativa
+ 40 µg de PEG(1100)-CDM ₃	0,3
+ NaCl 150 mM	0,3
+ 100 µg/ml de PACAC	0,79
ADN solo	1,0
+ PBAVE	0,2
+ 150 µg de PEG(1100)-CDM ₃	0,3
+ NaCl 150 mM	0,3
+ 100 µg/ml de PACAC	0,56
ADN solo	1,0
+ PBAVE	0,2
+ NaCl 150 mM	0,3
+ 100 µg/ml de PACAC	0,95

Lo anterior se considera solo ilustrativo de los principios de la invención. Además, dado que los expertos en la técnica realizarán numerosas modificaciones y cambios, no se desea limitar la invención a la construcción y el funcionamiento exactos, mostrados y descritos. Por lo tanto, todas las modificaciones y los equivalentes adecuados están dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una nanopartícula para entregar un polinucleótido a una célula que comprende: dicho polinucleótido asociado con un polímero con actividad membranal inhibida de forma reversible, en donde dicho polímero con actividad membranal inhibida de forma reversible consiste en una pluralidad de inhibidores con actividad membranal, ligados de forma reversible a una poliamina con actividad membranal a través de un enlace lábil en función del pH, en donde dichos inhibidores se seleccionan entre el grupo consistente en: derivados de anhídrido maleico disustituidos, y en donde la nanopartícula comprende adicionalmente un policatión.
- 5 2.- La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polímero con actividad membranal inhibida de forma reversible está asociado con dicho polinucleótido a través de una interacción electroestática.
- 10 3.- La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho policatión es un polímero con actividad membranal.
- 4.- La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho policatión se selecciona entre PBAVE, PPAVE o PBAVE.
- 15 5.- La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho policatión está entrecruzado con dicha poliamina con actividad membranal inhibida de forma reversible, a través de un enlace lábil en función del pH.
- 6.- La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dichos derivados de anhídrido maleico disustituidos se seleccionan entre los grupos consistentes en CDM, CDM-tioéster y CDM-PEG.
- 20 7.- La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la nanopartícula consiste en una nanopartícula estable frente a una sal.
- 8.- La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polímero con actividad membranal tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10.000 Dalton.
- 9.- La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho polímero con actividad membranal inhibida de forma reversible rompe una membrana endocítica, proporcionando de este modo la entrega de dicho polinucleótido en el citoplasma de la célula.
- 25 10.- Un método para la entrega *in vitro* de una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el citoplasma de una célula que comprende: cultivar células de mamífero en un medio de cultivo adecuado, añadir dicha nanopartícula a dichas células cultivadas e incubar las células durante un periodo de tiempo adecuado.
- 30 11.- Uso para la entrega *in vivo* de una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el citoplasma de una célula.

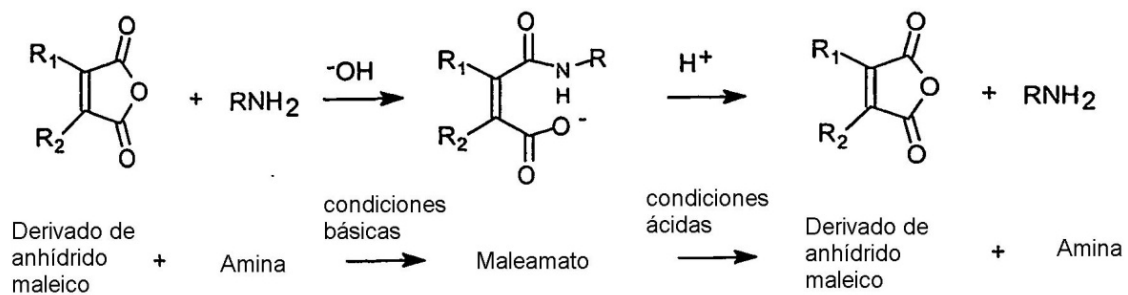


FIG. 1.

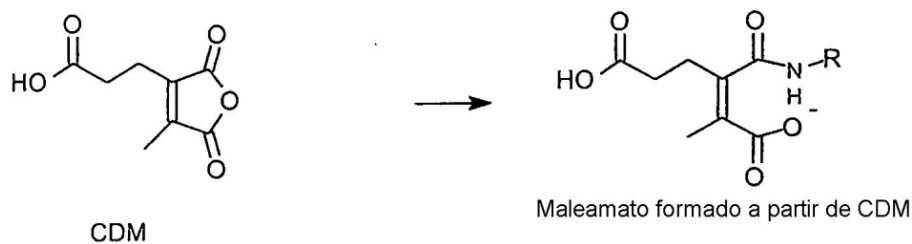


FIG. 2.

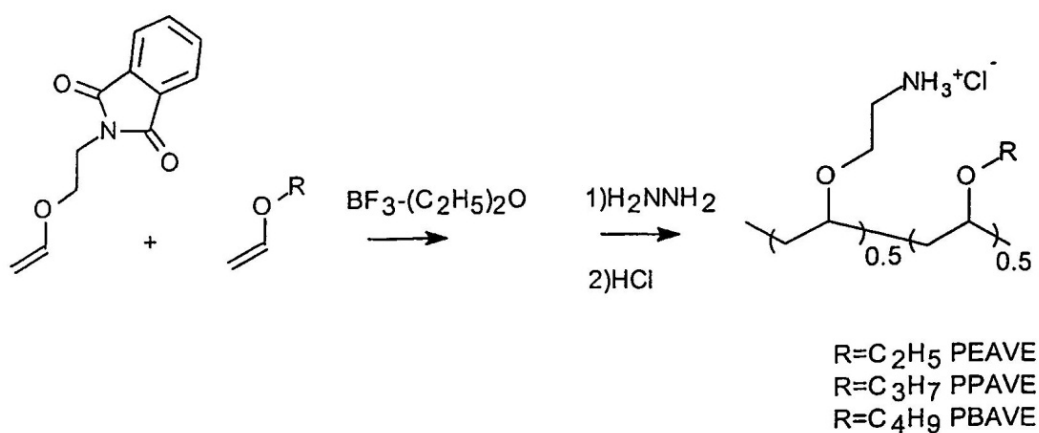


FIG. 3

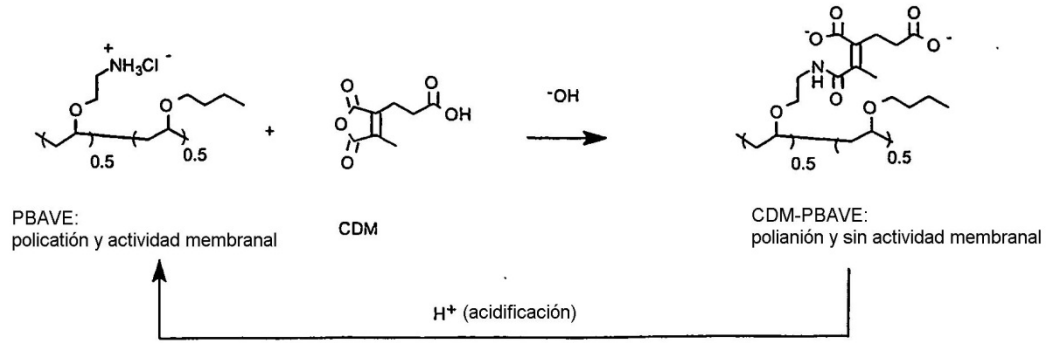


FIG. 4

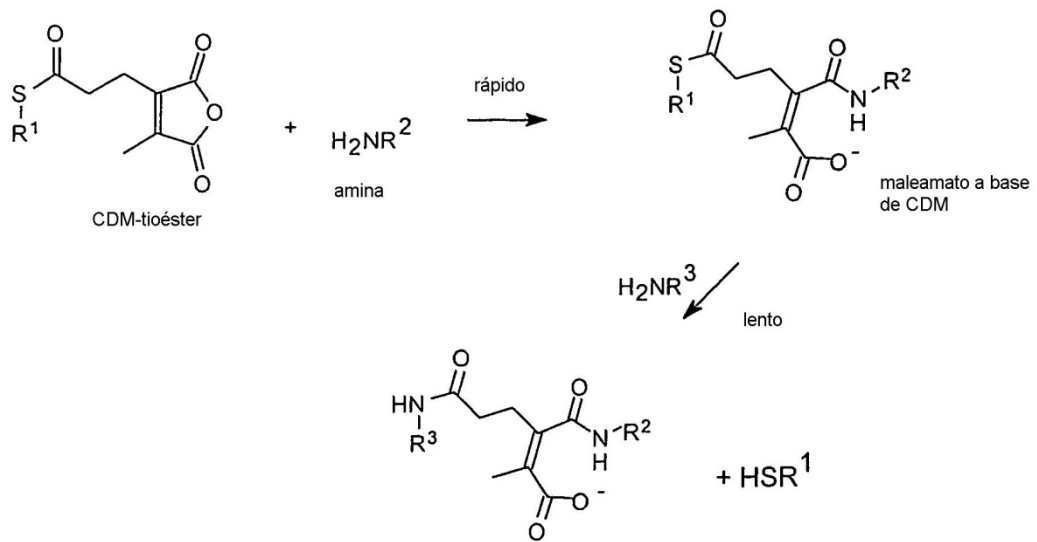


FIG. 5

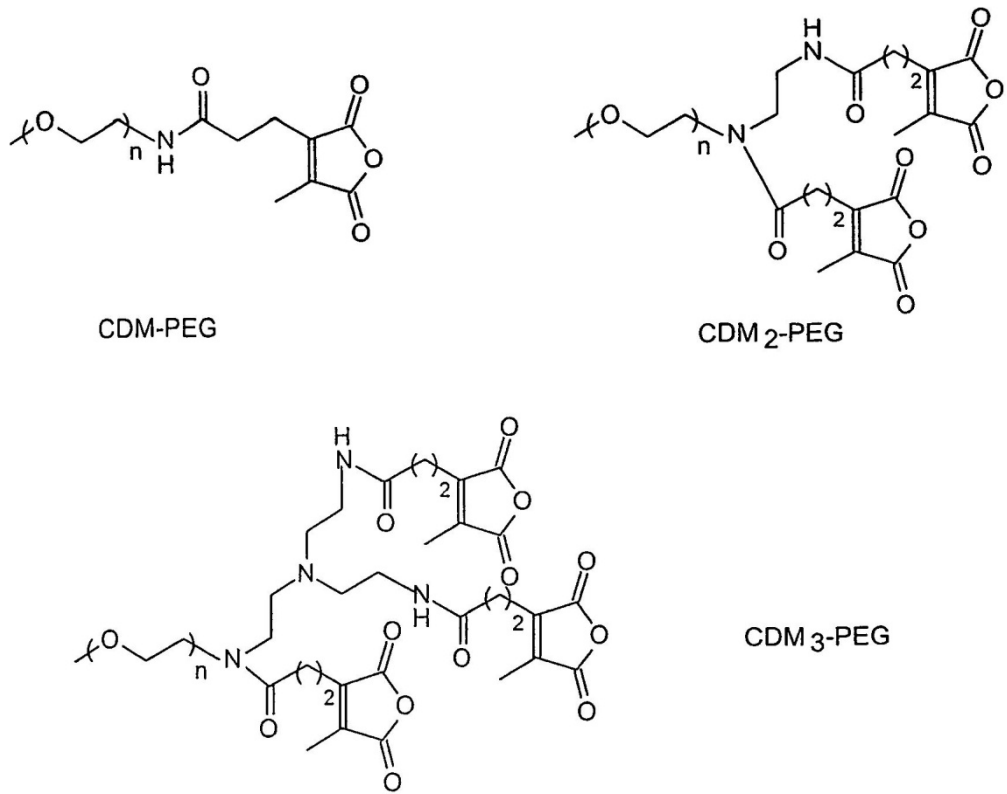


FIG. 6