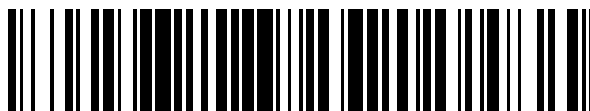


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 422**

51 Int. Cl.:
A61K 47/32 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C08F 220/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02785268 .0**
96 Fecha de presentación: **22.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1499358**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Polímero sensible al pH**

30 Prioridad:
30.04.2002 DE 10219505
07.05.2002 DE 10220470

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2012

73 Titular/es:
EVONIK RÖHM GMBH
KIRSCHENALLEE
64293 DARMSTADT, DE y
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

72 Inventor/es:
PETEREIT, Hans-Ulrich;
MEIER, Christian;
SCHULTES, Klaus;
YESSINE, Marie-Andrée y
LEROUX, Jean-Christophe

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 386 422 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

Polímero sensible al pH.

La invención se refiere a un polímero sensible al pH que tiene propiedades citotóxicas o membranolíticas a valores de pH por debajo de pH 6.5 y que se puede usar como portador de biomoléculas naturales o sintéticas o principios activos.

Estado anterior de la técnica

En los últimos años los polímeros que responden a estímulos han aumentado en importancia. Los polímeros correspondientes presentan propiedades modificadas después de la exposición a una influencia física o química como, por ejemplo, por mencionar sólo algunas, temperatura, solvente o pH. Existe especial interés en este sentido en los polímeros sensibles al pH. Así, por ejemplo, los polímeros que contienen un grupo carboxilo que forman estructuras en espiral hidrófilas a pH altos se pueden convertir a valores de pH bajos en estructuras globulares hidrófobas (véase, por ejemplo, (1)).

La investigación se centra en los polímeros sensibles al pH en relación con la administración de sustancias medicinales. Muchos procesos fisiológicos y patológicos como la endocitosis, el crecimiento tumoral y las inflamaciones se asocian a un cambio en las condiciones del pH. Son ejemplos de polímeros sensibles al pH que están siendo investigados en relación con la administración de sustancias medicinales, por ejemplo, los ácidos α -alquilacrílicos ácidos como poli(ácido 2-etilacrílico) y poli(ácido propilacrílico) (véase 2), poli(amido aminas) (véase 3, 4) y poli(etilenimina), poli (L-lisina isoftalamida) (véase 5)). Los cambios conformacionales inducidos por los cambios de pH influyen sobre las interacciones entre el polímero y las membranas celulares de tal manera que puede producirse una desestabilización. Es posible emplear, polímeros sensibles al pH complejos o conjugados como medios de transporte con un gran número de biomoléculas naturales o sintéticas. Estos pueden formar complejos o conjugados con lípidos (véase 6, 7, 8, 14), proteínas y péptidos (véase 9, 10), ADN (4, 11), inmunotoxinas (12), anticuerpos (13) y/o principios activos (3).

Lista de la literatura citada precedentemente

1. M. Watanabe, Y. Kosaka, K. Sanui, N. Ogata, K. Ogushi y T. Yoden. On the mechanism of polyelectrolyte-induced structural reorganization in thin molecular films. *Macromolecules*, 20: 454-456 (1987).
2. N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirrell, P.S. Stayton y S. Hoffmann. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release*, 61: 137-143 (1999).
3. R. Duncan, P. Ferruti, D. Sgouras, A. Tuboku-Metzger, E. Ranucci y F. Bignotti. A polymer-Triton X-100 conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis: A model system illustrating the possibility of drug delivery within acidic intracellular compartments. *J. Drug Targeting*, 2: 341-347 (1994).
4. S.C. Richardson, N.G. Patrick, Y.K. Stella Man, P. Ferruti y R. Duncan. Poly(amidoamine)s as potential nonviral vectors: ability to form interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro. *Biomacromolecules*, in press (2001).
5. M.E. Eccleston, M. Kuiper, F.M. Gilchrist y N.K.H. Slater. pH-responsive pseudo-peptides for cell membrane disruption. *J. Controlled Release*, 69: 297-307 (2000).
6. T. Chen, L.S. Choi, S. Einstein, M.A. Klippenstein, P. Scherrer y P.R. Cullis. Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, 9: 387-405 (1999).
7. J.L. Thomas y D.A. Tirrell. Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.*, 35: 336-342 (1992).
8. X. Guo y F.C. Szoka Jr. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconjugate Chem.*, 12: 291-300 (2001).
9. C.A. Lackey, N. Murthy, O.W. Press, D.A. Tirrell, A.S. Hoffmann y P.S. Stayton. Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem.*, 10: 401-405 (1999).
10. V. Bulmus, Z. Ding, C.J. Long, P.S. Stayton y A.S. Hoffman. Site-specific polymer-streptavidin bioconjugate for pH-controlled binding and triggered release of biotin. *Bioconjugate Chem.*, 11: 78-83 (2000).
11. P.S. Stayton, N. Murthy, C. Lackey, C. Cheung, R. To, O. Press y A.S. Hoffman. Bioinspired polymers designed to enhance intracellular delivery of biotherapeutics. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 27: 7330 (2000).

12. C.A. Lackey, N. Murthy, P.S. Stayton, O.W. Press, A.S. Hoffman y D.A. Tirrell. Enhancement of endosomal release and toxic activity of ricin A chain by a pH-sensitive polymer. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 26: 815-816 (1999).

5 13. C.A. Lackey, O.W. Press, A.S. Hoffman y P.S. Stayton. pH-sensitive polymer-protein complexes for control of intracellular trafficking of biomolecular therapeutics. *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 84 (2001).

14. K.M. Eum, K.H. Langley y D.A. Tirrell. Quasi-elastic and electrophoretic light scattering studies of the reorganization of dioleoylphosphatidylcholine vesicle membranes by poly(2-ethylacrylic acid). *Macromolecules*, 22: 2755-2760. (1989).

10 WO 97/09068 describe conjugados moleculares interactivos. Estos son en particular moléculas que responden a un estímulo y que tienen la capacidad de unirse a una región celular diana, donde el estímulo influye a su vez en la capacidad de unión. El estímulo puede ser provocado por la temperatura, el pH, iones particulares o fuerzas iónicas, campos eléctricos o solventes.

15 Una molécula, que responde a un estímulo puede ser, por ejemplo, un polímero sensible al pH que se combina con una molécula que se une a un ligando, p. ej. un antígeno, un anticuerpo o un principio activo. El conjugado molecular es capaz de responder a condiciones ambientales alteradas, p. ej. a la alteración del pH desde valores por encima de pH 7.0 en la región de los líquidos corporales extracelulares, por ejemplo, en el torrente sanguíneo, hasta valores por debajo de pH 6.5, que se asocia con la captación en células vivas, por ejemplo por endocitosis.

20 Los polímeros mencionados en general, se basan en monómeros de tipo vinilo que han pasado por una polimerización por radicales libres y tienen pesos moleculares en el rango de 1000 a 30 000. Se sugieren los polímeros con grupos laterales reactivos, p. ej. -OH, -COOH o, preferentemente, -NH₂, para acoplar proteínas o péptidos.

Los copolímeros de met(acrilato) compuestos por unidades de ácido metacrílico y comonómeros como ésteres C₁-C₁₂ alquílicos de ácido (met)acrílico son conocidos en principio y se utilizan en particular como agentes de recubrimiento y aglutinantes para formas farmacéuticas.

25 Son ejemplos conocidos los copolímeros compuestos por 50% en peso de ácido metacrílico y 50% en peso de metacrilato de metilo (EUDRAGIT® L), por 50% en peso de ácido metacrílico y 50% en peso de acrilato de etilo (EUDRAGIT® L100-55), por 30% en peso de ácido metacrílico y 70% en peso de metacrilato de metilo (EUDRAGIT® S). Los copolímeros comerciales tienen pesos moleculares en la región de alrededor de 200 000 g/mol.

30 US 2001/0007666 A1 describe una composición que se utiliza para aumentar el transporte o la liberación de sustancias a través de las membranas celulares, entre las células, los compartimentos celulares o las membranas lipídicas. La composición consta de un agente de transporte de membrana que entre otros puede ser un polímero sensible al pH y medios físicos para aumentar la eficiencia del agente de transporte de membrana, p. ej. tratamiento con ultrasonido. Los polímeros sensibles al pH particularmente adecuados son los polímeros que contienen un grupo carboxilo p. ej. los que contienen más de 50% de residuos de monómeros con grupos carboxilo. Un ejemplo específico mencionado es poli(ácido 2-etilacrílico) con un peso molecular promedio de 62 000. También se describen copolímeros 50:50 de ácido acrílico con acrilatos de etilo, propilo y butilo. Se estipula que la preparación es mediante polimerización en bloque en presencia de un iniciador AIBN. No se mencionan reguladores del peso molecular. Puesto que los copolímeros se purifican además por precipitación en éter, se debe suponer que los pesos moleculares son altos. Incluso a concentraciones bajas de unos pocos µg, los copolímeros lisan exhaustivamente los eritrocitos a pH 5.5 y en menor medida a pH 7.4 al menos.

45 US 5,804,632 describe un proceso para la preparación de una emulsión acuosa de un polímero, donde el proceso comprende a) preparar un polímero de bajo peso molecular que contenga grupos funcionales ácido mediante un proceso de polimerización por radicales libres que emplea un complejo quelato de un metal de transición que es un complejo quelato de cobalto. Los polímeros del paso a) se introducen en el paso b) en el medio de un proceso de polimerización en emulsión.

EP 857 475 describe adhesivos para prótesis dentales, que comprenden polímeros parcialmente neutralizados de acrilatos o metacrilatos y ácido acrílico o metacrílico.

Problema y solución

50 La introducción de biomoléculas o principios activos en el citoplasma y desde allí posiblemente en el núcleo de la célula a través de endosomas requiere agentes que desestabilicen la membrana (destruyan la membrana) que impidan el tráfico de sustancias (ingreso) a los lisosomas, donde pueden ser degradadas o inactivadas químicamente. Los polímeros de interés, por lo tanto, conducen a la desestabilización (destrucción) de las membranas celulares a valores de pH ligeramente ácidos de alrededor de pH 6.5 o por debajo, como prevalece en los endosomas, pero están sustancialmente desprovistos de (no tienen) efecto membranólítico a valores de pH

fisiológico de alrededor de pH 7.4, como ocurre fuera de las células.

Los copolímeros de ácido acrílico/acrilato de alquilo de US 2001/0007666 A1 tienen la desventaja de que pueden producir citólisis incluso a concentraciones muy bajas. Esto hace que su dosificación sea crítica. Otra desventaja es que puede producirse algo de hemólisis incluso a pH 7.4, de modo que los copolímeros descritos son en general difíciles de controlar y, si se usan en cantidades extremadamente pequeñas, sólo es posible una carga baja con biomoléculas o principios activos. Otra desventaja más es que luego de la administración parenteral, podrían acumularse en el organismo. Cuando el peso molecular de un polímero es demasiado alto, por ejemplo 62 000, se impide la excreción por filtración glomerular.

En relación con el desarrollo de formas farmacéuticas destinadas a mostrar sus efectos específicamente en tipos de células particulares existe, por lo tanto, una necesidad constante de moléculas portadoras poliméricas adecuadas. La intención fue desarrollar polímeros sensibles al pH que no presentaran propiedades citotóxicas ni membranolíticas, o lo hicieran sólo a altas concentraciones en la región de pH 7.0 o ligeramente superior, pero que tuvieran efectos citotóxicos o hemolíticos o membranolíticos incluso a baja concentración, in vivo, por debajo de pH 6.5. Los polímeros están destinados a ser adecuados como portadores (complejos y conjugados) de biomoléculas naturales o sintéticas o principios activos que deban ser liberados dentro de las células a través de la captación en los endosomas y la posterior desestabilización o lisis de los mismos.

Además en la aplicación parenteral de sustancias se debe considerar el problema de la eliminación a fin de evitar una acumulación en el organismo humano o animal y por consiguiente los efectos secundarios tóxicos.

Por lo tanto, se deben proporcionar polímeros sensibles al pH que se puedan aplicar fácilmente a concentraciones en el rango por ejemplo de 20 a 150 µg/ml y que se puedan cargar bien y que en consecuencia sean adecuados como portadores (complejos y conjugados) de biomoléculas de origen natural o sintético. Deberán tener buenas propiedades hemolíticas en este rango de concentración y en el rango de pH 5.5 y por debajo de pH 6.5, mientras que no habrá ningún efecto membranolítico (hemolítico) a pH 7.4. Además no serán eficaces contra células tipo macrófagos por ser tóxicos o inhibirlas. Los polímeros deberán ser bien eliminados a través del riñón y por lo tanto ser adecuados también para aplicaciones parenterales.

El problema se resuelve mediante

un polímero sensible al pH que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por

20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y

80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,

que se caracteriza porque

tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,

y causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos,

donde quedan excluidos los polímeros, que son polimerizados por un proceso de polimerización en emulsión o suspensión acuosa en presencia de un complejo quelato de un metal de transición, que sea un complejo quelato de cobalto.

Debido a que los poli(met)acrilatos, en contraste con otros polímeros utilizados farmacéuticamente, no son biodegradables, la eliminación debe efectuarse por filtración glomerular a través de los riñones. Sin embargo, este proceso está restringido en lo que respecta al peso molecular. Se adopta un límite máximo para las moléculas que pueden ser secretadas por el riñón de 50 000 g/mol (Dalton). Sorprendentemente, los polímeros con pesos moleculares bajos de acuerdo con la presente invención muestran mayor actividad hemolítica que los que tienen pesos moleculares superiores.

Implementación de la invención

Copolímeros de (met)acrilato

La invención se refiere a

un polímero sensible al pH, en particular con propiedades membranolíticas, hemolíticas o citotóxicas a valores de pH por debajo de pH 6.5, que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por

20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y

80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,

Los ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico en particular ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico lineales o ramificados, son, por ejemplo:

5 acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de vinilo, acrilato de propilo, acrilato de butilo, acrilato de hexilo, acrilato de octilo, acrilato de decilo, acrilato de dodecilo, acrilato de miristilo, acrilato de laurilo, acrilato de cetilo, acrilato de estearilo, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, metacrilato de butilo, metacrilato de isobutilo, metacrilato de hexilo, (met)acrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de fenilo, metacrilato de octilo, metacrilato de decilo, metacrilato de dodecilo, metacrilato de miristilo, metacrilato de laurilo, metacrilato de cetilo y metacrilato de estearilo.

Los componentes éster pueden ser ramificados o cíclicos.

10 Se prefieren los ésteres C₁-C₈ alquílicos de ácido acrílico o metacrílico, en particular metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de butilo, metacrilato de 2-etilhexilo, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo y acrilato de 2-etilhexilo.

15 Como regla, el contenido declarado totaliza hasta 100% en peso. Sin embargo, también es posible, sin que esto conduzca necesariamente a un deterioro o alteración de las propiedades esenciales, que estén presentes pequeñas cantidades en el rango de 0 a 10, p. ej. 0.1 a 5, o no más de 2.5, % en peso de otros monómeros copolimerizables con vinilo, que no sean necesariamente (met)acrilatos, por ejemplo acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, metacrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxietilo, metacrilamida o estireno. Como regla no están presentes los monómeros de entrecruzamiento.

Variantes de copolímero de (met)acrilato

20 Son adecuados y se prefieren para los propósitos de la invención los copolímeros de (met)acrilato compuestos por:

40 a 60, en particular 45 a 55, p. ej. 50, % en peso de unidades de ácido metacrílico y 60 a 40, en particular 55 a 45, p. ej. 50, % en peso de unidades de acrilato de etilo (EUDRAGIT ® tipo L100-55).

25 40 a 60, en particular 45 a 55, p. ej. 50, % en peso de unidades de ácido metacrílico y 60 a 30, en particular 45 a 35, p. ej. 50, % en peso de unidades de acrilato de etilo y 2 a 20% en peso, por ejemplo, 10% en peso de metacrilato de butilo.

30 40 a 60, en particular 45 a 55, p. ej. 50, % en peso de unidades de ácido metacrílico y 60 a 40, en particular 55 a 45, p. ej. 50, % en peso de unidades de acrilato de etilo y 0.1 a 2% en peso de un éster C₈ a C₁₆, preferiblemente C₈ - C₁₂-alquílico de ácido acrílico o metacrílico, preferentemente metacrilato de dodecilo. El copolímero se puede preparar preferentemente en presencia de 5 a 15% en peso de dodecil mercaptano o 2 a 10% en peso de tioglicolato de 2-etilhexilo y varía de conformidad con sus propiedades.

20 a 40, en particular 25 a 35, p. ej. 30, % en peso de unidades de ácido metacrílico, 25 a 45, en particular 30 a 40, p. ej. 35, % en peso de unidades de metacrilato de metilo, 25 a 45, en particular 30 a 40, p. ej. 35, % en peso de unidades de acrilato de etilo.

35 Como regla, el contenido declarado totalizará hasta 100% en peso. Sin embargo, también es posible, sin que esto conduzca necesariamente a un deterioro o alteración de las propiedades esenciales, que estén presentes pequeñas cantidades en el rango de 0 a 10, p. ej. 0.1 a 5, o no más de 2.5, % en peso de otros monómeros copolimerizables con vinilo, que no sean necesariamente (met)acrilatos. Por ejemplo, pueden mencionarse acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, metacrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxietilo, metacrilamida o estireno

Peso molecular

40 El peso molecular se puede determinar por viscosimetría o cromatografía de exclusión en gel (GPC). Los valores viscosimétricos (número de viscosidad limitante) se pueden determinar en cloroformo o en DMF (dimetilformamida) a 23 °C y deben estar preferentemente en el rango de 1 a 25, preferentemente de 10 a 20, $n_{\text{spec}/c}$ (cm³/g). Los números de viscosidad se pueden medir por ejemplo según se especifica en ISO 1628-6. Los pesos moleculares de acuerdo con esta invención se deben determinar por viscosimetría según DIN 1628-6, modificada con DMF como solvente.

45 Los números de viscosidad se correlacionan con el peso molecular (peso promedio, PM) utilizando patrones de polimetacrilato de metilo (PMMA). El peso molecular (peso promedio) del copolímero de (met)acrilato está en el rango de 1000 a 50 000 g/mol, preferentemente en el rango de 50 00 a 40 000 g/mol, en particular en el rango de 10 000 a 30 000 o muy preferentemente en el rango de 15 000 a 25 000.

50 La tabla siguiente se puede usar como guía para calcular los pesos moleculares a partir de los valores de viscosidad (VZ), según la fórmula general pueden $VZ = 4.976 \cdot 10^{-3} \cdot PM^{0.796}$.

Número de viscosidad (VZ)	Peso molecular (PM)
1	780
3	3110
5	5910
10	14 110
15	23 490
20	33 720
30	56 110
50	106 600

Efecto hemolítico

5 Si la actividad hemolítica (hemólisis) excede el 5% se dice que es un efecto citotóxico. La actividad hemolítica debe ser inferior al 5% a pH 7.4 y ser alta y ser, por ejemplo, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o al menos 60, % a pH 5.5. Es beneficioso si este efecto se alcanza con concentraciones de copolímero fácilmente dosificadas de 20 a 300, preferentemente de 50 a 250, en particular de 100 a 200 µg de copolímero/ml basadas en una concentración de eritrocitos de 1×10^8 GR/ml.

Muy preferidas son las concentraciones de copolímero de 10 a 150, preferentemente de 15 a 110, en particular, de 20 a 80 µg copolímero/ml.

10 En un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos, el copolímero (met)acrílico a una concentración de 150 µg/ml causa al menos 60%, preferentemente al menos 80%, de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5%, preferentemente menos de 2.5, en particular preferentemente menos de 1, % de hemólisis a pH 7.4.

15 El ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos (eritrocitos) se puede llevar a cabo mediante un método basado en el de Murthy et al.: N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirrell, P.S. Stayton y S. Hoffman. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. J. Controlled Release, 61: 137-143 (1999).

20 Esto implica glóbulos rojos (GR) humanos obtenidos de sangre fresca que se separan por centrifugación en presencia de K3 EDTA. En este caso las células se sedimentan a 200 g y 4 °C durante 5 min y posteriormente se lavan tres veces por centrifugación renovada y se toman en solución salina amortiguada con fosfato (tampón PBS, 34 mM, pH 7.4, 0.9% de NaCl peso/volumen (75 mM)). El recuento de células en la suspensión resultante se puede determinar usando un hemocitómetro.

La prueba de hemólisis se lleva a cabo mediante la adición de glóbulos rojos (GR) humanos en el medio particular, a una suspensión del copolímero a una concentración de células de 1×10^8 GR/ml. La mezcla se incuba a 37 °C durante 20 minutos.

Efecto citotóxico sobre las células tipo macrófagos

25 En contraposición a los glóbulos rojos, donde presumiblemente tiene lugar la citólisis, principalmente a través de una interacción de los copolímeros con la membrana externa de la célula, las células tipo macrófagos son capaces de captación activa de los copolímeros, por lo que se debe suponer que en este caso otras interacciones pueden causar citólisis. Los copolímeros de (met)acrilato preferidos son aquellos que demuestran baja o cero citólisis o toxicidad en la prueba del MTT o en la prueba de la LDH (prueba de la lactato deshidrogenasa) con las células de ratón tipo macrófagos J774A.1 (véase ejemplo 5). La línea celular J774A.1 se puede obtener, por ejemplo, de la colección pública de cepas ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108) con el N° TIB-67 (células de ratón J774A.1; células tipo macrófagos inmortalizadas (no tumorales); véase también: Ralph P et al. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. J. Exp. Med. 143: 1528-1533, 1976 PubMed: 76192838.

35 Prueba del MTT (inhibición de células de una línea celular tipo macrófagos):

La prueba colorimétrica detecta células vivas que reducen el colorante amarillo de MTT (MTT = bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a un producto de formazano azul oscuro. La prueba es adecuada para la detección de citotoxicidad, proliferación celular y activación celular (véase, por ejemplo, T. Mosmann. Rapid

colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Meth. 65:55-63 (1983)).

5 La magnitud de la eliminación de células macrófagos es indicada por la liberación de LDH (NC. Phillips, L. Gagné, N. Ivanoff, G. Riveau. (1996) *Vaccine* 14(9), 898-904. La prueba de la lactato deshidrogenasa para medir la LDH liberada (véase P.G. Cabaud y F. Wroblewski en *Am J Clin Pathol* (1958) 30, 234-236) se puede llevar a cabo con kits de prueba comerciales, por ejemplo, el kit de Sigma (Nº de procedimiento 500).

La toxicidad inducida por los copolímeros contra las células tipo macrófagos debe ser tan baja como sea posible a pH fisiológico (neutro).

10 Los copolímeros de (met)acrilato preferidos son por consiguiente, los que, a una concentración en la región de 0.03125 mg/ml, producen en la prueba del MTT con las células tipo macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) un valor porcentual de supervivencia celular de al menos 25%, preferentemente de al menos el 60%, basado en una tasa de supervivencia de 100% en el experimento de control.

15 Los copolímeros de (met)acrilato preferidos son por consiguiente, los que, a una concentración en la región de 0.03125 mg/ml, producen en la prueba de la LDH con las células tipo macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) un valor de liberación de LDH de no más de 40%, preferentemente de no más de 20%, basados en una citólisis (toxicidad) de 100% en el experimento de control.

Preparación de los polímeros sensibles al pH o copolímeros de (met)acrilato

20 Los polímeros sensibles al pH se preparan mediante polimerización por radicales libres de los monómeros en presencia de iniciadores de la polimerización y reguladores del peso molecular mediante polimerización en bloque, perla o emulsión, y descarga del polímero. Otros métodos de preparación que son adecuados en principio son también de polimerización por transferencia de grupo (GTP) o polimerización radical controlada por transferencia de átomos (ATRP) (véase, por ejemplo, Matyjaszewski, K. et al., *Chem.Rev.*2001, 101, 2921-2990). Las estructuras poliméricas resultantes son copolímeros aleatorios o copolímeros en bloque.

25 Se prefiere la polimerización en emulsión en presencia de 2 a 15% en peso de reguladores del peso molecular, un contenido de emulsionante en el rango de 0.1 a 2% en peso, una cantidad de iniciador de la polimerización en el rango de 0.02 a 0.4% en peso y a una temperatura entre 65 y 90 °C. Se prefiere una mezcla de emulsionante compuesta preferentemente de laurilsulfato de sodio, por ejemplo 0.1 a 0.5% en peso y monooleato de polioxietileno 20 sorbitán, p. ej. 0.4 a 1.5% en peso. Son iniciadores particularmente adecuados peroxodisulfato de sodio o peroxodisulfato de amonio. Es posible preparar de esta manera, por ejemplo, una dispersión con un contenido de sólidos de 20 a 40% en peso, y el copolímero se puede aislar, preferentemente mediante secado por aspersion o coagulación y expulsión del agua en una extrusora. Luego el polímero se disuelve, preferentemente en un solvente orgánico, se purifica, preferentemente por diálisis múltiples contra agua y se seca, preferentemente se liofiliza.

35 Los ejemplos de iniciadores de la polimerización que se pueden mencionar son: compuestos azo, como 2,2'-azobis(isobutironitrilo) o 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo), sistemas redox, como por ejemplo, la combinación de aminas terciarias con peróxidos o, preferentemente, peróxidos (sobre esto, véase, por ejemplo, H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer, Heidelberg, 1967 or Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 1, páginas 386 y sig., J. Wiley, Nueva York, 1978). Son ejemplos de iniciadores de la polimerización peróxidos adecuados el peróxido de dilauroilo, peroxoato de terc-butilo, perisononanoato de terc-butilo, peroxidicarbonato de dicitlohexilo, peróxido de dibenzoilo o 2,2-bis(terc-butilperoxi)butano.

40 También es posible y se prefiere que la polimerización se lleve a cabo con una mezcla de varios iniciadores de la polimerización que difieran en su semivida por ejemplo, peróxido de dilauroilo y 2,2-bis(terc-butilperoxi)butano, con el fin de mantener constante el flujo de radicales libres, durante la polimerización y a temperaturas de polimerización diferentes. Las cantidades de iniciador de la polimerización empleadas son generalmente de 0.01 hasta un máximo de 1% en peso, basadas en la mezcla de monómeros.

45 Los pesos moleculares de los copolímeros (CP) se ajustan polimerizando la mezcla de monómeros en presencia de reguladores del peso molecular, como, en particular, de mercaptanos conocidos para este propósito, como, por ejemplo, n-butil mercaptano, n-dodecil mercaptano, 2-mercaptoetanol o tioglicolato de 2-etilhexilo, generalmente empleando los reguladores de peso molecular en cantidades de 0.05 a 15% en peso, basadas en la mezcla de monómeros, preferentemente en cantidades de 0.1 a 10% en peso y en particular preferentemente en cantidades de 2 a 12% en peso de la mezcla de monómeros (véase, por ejemplo, H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer, Heidelberg, 1967; Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Vol. XIV/1, página 66, Georg Thieme, Stuttgart, 1961 or Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 1, páginas 296 y sig., J. Wiley, Nueva York, 1978). El regulador de peso molecular empleado preferentemente es n-dodecil mercaptano o tioglicolato de 2-etilhexilo. El tioglicolato de etilhexilo tiene la ventaja de que la hidrofobicidad del copolímero de (met)acrilato puede ser influida porque el regulador está incluido en la molécula al final. Las cantidades que se emplean preferentemente son 5 a 15% en peso de dodecil mercaptano o 2 a 10% en peso de

tioglicolato de 2-etilhexilo.

Conjugados/complejos

5 El polímero sensible al pH puede ser diseñado en forma de un conjugado o complejo con una biomolécula natural o sintética farmacéuticamente eficaz o un principio activo. El conjugado o complejo se puede preparar reversible o irreversiblemente covalentemente por enlace químico o a través de valencias secundarias mediante fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o enlace hidrófobo.

Usos

10 Los polímeros sensibles al pH se pueden utilizar como portadores, conjugados/complejos de biomoléculas naturales o sintéticas o principios activos que deban ser liberados dentro de las células a través de la captación en endosomas y la posterior desestabilización o lisis de los mismos.

15 Los polímeros sensibles al pH se pueden usar para la formación de complejos o como conjugados con lípidos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (ADN y ARN), en particular oligonucleótidos, ADN antisentido o ARN antisentido, ADN plasmídico, nucleótidos, hormonas, toxinas, inmunotoxinas, anticuerpos o fragmentos de los mismos o principios activos. La formación de complejos o conjugados puede tener lugar reversible o irreversiblemente covalentemente por enlace químico o a través de valencias secundarias mediante fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o enlace hidrófobo. El complejo resultante se puede utilizar como principio activo para producir una forma farmacéutica, en particular una forma farmacéutica dérmica, transdérmica, parenteral, nasal, pulmonar, vaginal u oral.

20 Los polímeros sensibles al pH y los conjugados pueden ser, cuando corresponda, un constituyente de micropartículas, nanopartículas, liposomas, emulsiones y/o vesículas de lípidos.

25 Dicho uso como portador, conjugado/complejo es posible y se prefiere para los principios activos de las clases de principios activos como analgésicos, antialérgicos, antirreumáticos, antibióticos, antiinfecciosos, antiparkinsonianos, antipsoriásicos, antitumorales, productos dermatológicos, remedios para la gota, inmunoreguladores, agentes gastrointestinales, neurotrópicos, productos oftalmológicos y citostáticos.

Posibles trastornos:

30 cáncer, infecciones (incluida por VIH), trastornos cardiovasculares (p. ej. arterioesclerosis), artritis, enfermedades neurodegenerativas (parkinsonismo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer), trastornos genéticamente relacionados con deficiencia de enzimas, hepatitis B y C, mucoviscidosis, hipercolesterolemia, síndrome de Down, distrofia muscular, enfermedades autoinmunitarias, herpes y herpes zoster, psoriasis, retinitis CMV, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes.

Las sustancias medicinales empleadas con el propósito de la invención están destinadas a utilizarse en el organismo humano o animal para

1. curar, aliviar, prevenir o diagnosticar trastornos, enfermedades, daño físico o síntomas patológicos.
2. poner al descubierto la enfermedad, el estado o las funciones del organismo o estados mentales.
- 35 3. reemplazar las sustancias activas o fluidos corporales producidos por el organismo humano o animal.
4. detener, eliminar o tornar inofensivos patógenos, parásitos o sustancias exógenas, o
5. incidir sobre la enfermedad, el estado o las funciones del organismo o estados mentales.

Las sustancias medicinales en uso se encuentran en obras de referencia como, por ejemplo, la Rote Liste o el Merck Index .

40 Se debe hacer particular mención de los principio activos anfotericina B, arabinósido de citosina y adriamicina. La forma liposómica de la adriamicina también podría ser un buen modelo, porque su rápida liberación en los endosomas se podría utilizar para vencer la resistencia multifármaco. Otros principios activos de interés podrían ser oligonucleótidos antisentido, ADN plasmídico y péptidos (leuprolida, calcitonina, etc.).

45 La forma farmacéutica se puede usar por ejemplo para el tratamiento de tumores, trastornos cardiovasculares o artritis reumatoide. La terapia génica de trastornos genéticos o el tratamiento profiláctico de dichos trastornos con ayuda de los polímeros sensibles al pH de acuerdo con la invención, como ingredientes de las formas farmacéuticas adecuadas, es asimismo concebible en el futuro. En comparación con los sistemas virales para la transferencia de ácidos nucleicos a células vivas, los sistemas no virales tienen la ventaja general de que se pueden preparar más fácilmente, no está implicada la replicación del vector, y el riesgo de reacciones inmunológicas es menor.

Modificaciones de las propiedades

a) Influencia sobre la conformación mediante la unión de otras moléculas

5 Las propiedades, por ejemplo, la actividad tóxica o membranolítica, de los copolímeros de (met)acrilato sobre los glóbulos rojos y/o células tipo macrófagos o sus propiedades físicas se pueden modificar por acoplamiento covalente o de valencia secundaria con otras moléculas, en particular agentes que alteren la conformación, p. ej. colorantes, en particular colorantes hidrófobos, p. ej. con rodamina B. Los métodos de acoplamiento adecuados para copolímeros de (met)acrilato que contienen un grupo carboxilo son conocidos por los expertos.

Es posible obtener, por ejemplo, un copolímero de (met)acrilato compuesto por

25 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y

10 75 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₂ alquílicos de ácido (met)acrílico,

que se modifica o acopla con un colorante, preferentemente un colorante hidrófobo, en particular con rodamina B.

Se prefiere un copolímero de (met)acrilato compuesto por

40 a 60% en peso de unidades de ácido metacrílico y

60 a 40% en peso de unidades de acrilato de etilo,

15 que se modifica con un colorante, preferentemente con un colorante en particular hidrófobo, en particular con rodamina B.

Se prefiere una relación de acoplamiento determinada teóricamente en la que 5 a 100%, preferentemente 5 a 20%, de las moléculas de los copolímeros están acopladas con una molécula de colorante.

20 El acoplamiento tiene la ventaja por ejemplo de que se pueden modificar las características de solubilidad. Es posible, por ejemplo, lograr un aumento pronunciado en la insolubilidad en la región por debajo de pH 6.5, p. ej. en el rango de pH 6.0 a pH 5.0 (véase ejemplo 6).

b) Producción de complejos por entrecruzamiento intermolecular

25 Los grupos carboxilo de los copolímeros de (met)acrilato son químicamente reactivos y son adecuados para la modificación con el objetivo de producir complejos por entrecruzamiento intermolecular. Así, por ejemplo, los grupos SH se pueden introducir con relativa facilidad en los copolímeros de (met)acrilato por modificación química con NH₂-CH₂-CH₂-SH.

Es igualmente fácil introducir grupos SH en el ADN y el ARN, en particular en oligonucleótidos, ADN antisentido o ARN antisentido, a través de los grupos OH 5'-y 3'- terminales de los ácidos nucleicos por medio de COOH-CH₂-CH₂-SH.

30 Los copolímeros de (met)acrilato modificados con SH y los ácidos nucleicos modificados con SH se pueden entrecruzar mediante la formación de puentes S-S para dar complejos. El aumento en el peso molecular y la menor solubilidad hace que los complejos estén disponibles en forma de gránulos en particular para las células fagocíticas, lo que puede ser ventajoso en el tratamiento de ciertas patologías, como, por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias.

35 La reducción del puente disulfuro in vivo liberaría la forma activa de la molécula transportada. Los complejos también podrían ser internalizados por otros tipos de células después de injertar ligandos de vectorización adecuados.

40 Los polímeros de acuerdo con la invención se emplean en combinación con principios activos y forman un sistema de liberación de fármacos que, como regla, es particulado. Es posible para este propósito unir el principio activo al polímero a través de un espaciador biodegradable. Sin embargo, también se da preferencia a conjugados/complejos con peso molecular catiónico bajo o sustancias poliméricas y principios activos. Se debe hacer mención de los lípidos catiónicos como lipofectina, polilisina, polietilenimina, poliamino (met)acrilato o espermina y espermidinas, y sus derivados. Este complejo también puede ser un liposoma catiónico o aniónico. El polímero y el principio activo también se pueden encapsular en, o unir a, un liposoma catiónico, aniónico o neutro.

45 Los agentes que forman complejos que son conocidos en sí mismos, pueden mostrar efectos de mejora de la acción de diversas maneras (p. ej. polietilenimina).

Otros constituyentes de los complejos pueden ser polímeros hidrófilos (polietilenglicol, polivinilpirrolidona, poliláctidos, poliglicólidos, polisacáridos y sus derivados). Esas sustancias protegen los principios activos de las

interacciones con los constituyentes de la sangre y prolongan la circulación en la sangre.

Se pueden utilizar ligandos de vectorización, como anticuerpos contra antígenos específicos de la célula para vectorizar células específicas.

- 5 Los sistemas de liberación particulados se producen por técnicas convencionales, por ejemplo de formación directa de complejos en solución, secado de soluciones que contienen lípidos y redispersión en agua, usando ultrasonido u homogeneización cuando corresponda.

Principio activo de una forma farmacéutica que corresponde a la técnica habitual del uso al que está destinado y permite un tratamiento seguro y tolerado. La estabilidad puede ser extendida mediante liofilización o secado por aspersion de las formas farmacéuticas.

10 Ejemplos

1. Copolímeros de los ejemplos 1 a 7

Copolímero A:

- 15 Copolímero de
50% en peso de ácido metacrílico y
50% en peso de metacrilato de metilo.
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 25 000.

Copolímero B:

- 20 Copolímero de
50% en peso de ácido metacrílico y
50% en peso de acrilato de etilo.
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 25 000.

Copolímero C:

- 25 Copolímero de
30% en peso de ácido metacrílico,
35% en peso de acrilato de etilo y
35% en peso de acrilato de metilo
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 25 000.

Copolímero D:

- 30 Copolímero de
30% en peso de ácido metacrílico,
70% en peso de metacrilato de metilo.
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 25 000.

Copolímero E (no acorde con la invención)

- 35 Copolímero de
10% en peso de ácido metacrílico,
45% en peso metacrilato de metilo y
45% en peso de acrilato de metilo
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 25 000.

Copolímero L-100 (EUDRAGIT® L, no acorde con la invención)

- 40 Copolímero de
50% en peso de ácido metacrílico y
50% en peso de metacrilato de metilo.
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 100 000.

Copolímero L-100-55 (EUDRAGIT® L100-55, no acorde con la invención)

- 45 Copolímero de
50% en peso de ácido metacrílico y
50% en peso de acrilato de etilo.
Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 250 000.

Copolímero S-100 (EUDRAGIT® S100, no acorde con la invención)

Copolímero de
30% en peso de ácido metacrílico y
70% en peso de metacrilato de metilo.

5 Peso promedio del peso molecular = PM aproximadamente 100 000.

Ejemplo 1:

Rangos de transición del pH (soluble a insoluble).

10 La intención fue investigar, midiendo la luz dispersada a 37 °C a valores de pH de 3.0 a 7.5 en tampón de fosfato, los rangos de pH a los cuales los copolímeros están presentes en forma insoluble. La intensidad de la dispersión de la luz aumenta a medida que el polímero precipita.

Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación

Tabla 1

Copolímero	Ácido metacrílico [% en peso]	Metacrilato de metilo [% en peso]	Acrilato de etilo [% en peso]	Acrilato de metilo [% en peso]	PM × 10 ³ [mol/g]	rango de pH en el cual precipita el copolímero
A	50	50	-	-	25	3.8-4.5
B	50		50		25	4.7-5.1
C	30	-	35	35	25	5.0-5.6
D	30	70	-	-	25	4.8-5.3
E	10	45	-	45	25	4.5-7.0
L-100	50	50	-	-	100	3.7-4.3
L-100-55	50	-	50	-	250	4.6-5.0
S-100	30	70	-	-	100	4.7-5.2

Resultados:

15 Los copolímeros de (met)acrilato, excepto el copolímero E, tienen rangos de transición relativamente estrechos de 0.4 a 0.7 unidades de pH.

El copolímero E parece tener, debido a su bajo contenido de 10% en peso de monómeros con residuos de grupo carboxilo, un rango de transición de pH más amplio de 2.5 unidades de pH.

20 El peso molecular parece no tener prácticamente ningún efecto sobre las características de solubilidad de los copolímeros.

Ejemplo 2:

Actividad hemolítica dependiente de la concentración a pH 7.4

25 Se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos mediante un método basado en el de Murthy et al. (N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirrell, P.S. Stayton y S.Hoffman. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. J. Controlled Release, 61: 137-143 (1999)).

30 Esto implica la separación de los glóbulos rojos (GR) humanos por centrifugación en presencia de K3 EDTA. En este caso las células se sedimentan a 200 g y 4 °C durante 5 min y posteriormente se lavan tres veces por centrifugación renovada y se toman en solución salina amortiguada con fosfato (tampón PBS, 34 mM, pH 7.4, 0.9% de NaCl peso/volumen (75 mM)). El recuento de células en la suspensión resultante se puede determinar usando un hemocitómetro.

La prueba de hemólisis se lleva a cabo agregando glóbulos rojos (GR) humanos en el medio particular, a una suspensión de copolímero a una concentración de células de 1 × 10⁸ GR/ml. La mezcla se incuba a 37 °C durante

20 minutos. El grado de hemólisis se midió por determinación espectrométrica de la hemoglobina liberada de las células lisadas en el sobrenadante de la centrifugación a 541 nm.

Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación

Tabla 2

Copolímero	PM × 10 ³ [mol/g]	Actividad hemolítica [%] a pH 7.4 con una concentración de copolímero en [µg/ml]				
		150	250	500	2 500	10 000
A	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
B	25	< 5	5	8	25	100
C	25	< 5	< 5	5	100	100
D	25	< 5	< 5	< 5	100	100
E	25	< 5	< 5	< 5	12	20
L-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100-55	250	< 5	< 5	< 5	< 5	30
S-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

5

Resultado:

Los copolímeros B y C muestran una actividad hemolítica de 5% o más (umbral de toxicidad) a pH 7.4 a 500 µg/ml y por encima. Los copolímeros B, C, D y E muestran actividades hemolíticas de más de 5% a 2 500 µg/ml. La actividad hemolítica del copolímero B es en este caso menor que la de C y D.

- 10 Los copolímeros A, L-100, L-100-55 y S-100 no tienen ninguna actividad hemolítica, ni siquiera a altas concentraciones hasta de 10 000 µg/ml. El copolímero L-100-55, que es idéntico al copolímero B aparte de su peso molecular y el copolímero E muestran una ligera actividad hemolítica a 10 000 µg/ml.

- 15 Los copolímeros A y B tienen un contenido de ácido metacrílico 50% en peso idéntico y difieren sólo en el comonomero: metacrilato de metilo y acrilato de etilo, respectivamente. El copolímero B algo más hidrófobo es hemolítico incluso a 250 µg/ml. Por el contrario, el copolímero A no es hemolítico ni siquiera a 10 000 µg/ml.

Ejemplo 3:

Efecto hemolítico de los copolímeros B y C a diferentes concentraciones a pH 5.0 y pH 5.5.

Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Copolímero	pH	Actividad hemolítica [%] a una concentración de copolímero en [µg/ml]				
		25	50	100	150	250
B	5,0	10	80	80	80	80
B	5,5	50	90	95	90	90
L-100-55	5,0	< 5	80	80	80	80
L-100-55	5,5	5	55	75	90	90
C	5,0	< 5	< 5	10	60	80
C	5,5	5	50	80	85	85

Resultado:

El copolímero B es más hemolítico que el copolímero C a pH 5.0 y pH 5.5, especialmente a bajas concentraciones de 25 y 50 µg/ml. Ambos copolímeros son muy activos a pH 5.5 y 150 µg/ml.

5 El copolímero L-100-55 difiere del copolímero B por su mayor peso molecular. La actividad hemolítica del copolímero B es mayor que la del copolímero L-100-55 a pH 5.0 y pH 5.5 a 25 y 50 µg/ml, así como a pH 5.5 y 100 µg/ml.

Ejemplo 4:

Efecto hemolítico a una concentración de copolímero de 150 µg/ml y distintos valores de pH.

Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Copolímero	PM × 10 ³ [mol/g]	Actividad hemolítica [%] a una concentración de copolímero de 150 [µg/ml]				
		pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
A	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
B	25	80	55	< 5	< 5	< 5
C	25	90	55	< 5	< 5	< 5
D	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
E	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100-55	250	95	80	< 5	< 5	< 5
S-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

10

Resultado:

Los copolímeros B, C y L 100-55 muestran una fuerte actividad hemolítica a una concentración de 150 µg/ml en el rango de pH de 5.5 a 6.0. Todos los copolímeros contienen acrilato de etilo como comonomero. Sin embargo el PM de L 100-55 es demasiado alto para las aplicaciones.

15 Ejemplo 5:

La intención fue investigar el efecto de los copolímeros sobre células tipo macrófagos. A diferencia de los glóbulos rojos, con los cuales tiene lugar presumiblemente la citólisis, principalmente a través de una interacción de los copolímeros con la membrana celular externa, las células tipo macrófagos son capaces de captación activa de los copolímeros, por lo cual se debe suponer que otras interacciones son capaces de causar citólisis u otros efectos tóxicos en este caso. Puesto que la determinación de la citólisis u otros efectos tóxicos es relativamente inexacta, se combinan dos sistemas de ensayo: el ensayo del MTT para acceder a la proliferación celular y el ensayo de la LDH para acceder a la necrosis celular (la prueba del MTT para las células supervivientes y la prueba de la LDH para las células muertas).

20

Prueba del MTT

25 La prueba del MTT (inhibición de la proliferación celular de una línea celular tipo macrófagos). La prueba colorimétrica detecta células vivas que reducen el colorante amarillo MTT a un producto de formazano azul oscuro. La prueba es adecuada para la detección de citotoxicidad, proliferación celular y activación celular (véase, por ejemplo, T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Meth. 65: 55-63 (1983)).

30 Se suspenden células de ratón tipo macrófagos 774 J en medio DMEM que contiene 10% vol/vol de suero de feto de ternero (pretratado a 56 °C, 30 min) y 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se distribuyen en porciones de 100 µl que contienen 5 × 10³ células en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incuban en una atmósfera saturada de H₂O que contiene 5% de CO₂ a 37 °C, durante 24 h. Se añaden 20 µl de solución estéril de copolímero en tampón de fosfato, y se realizan diluciones seriadas de 0.5 a 0.003125 mg/ml (los

controles reciben tampón de fosfato sin copolímero. Después la incubación se continúa durante 48 h.

- 5 Se colocan en cada pocillo 10 µg de una solución estéril de MTT (MTT = bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en tampón de fosfato (5 mg/ml) y se incuban a 37 °C durante otras 3 h. Después se agregan 100 µl de una solución de dodecilsulfato de sodio al 10% peso/volumen (SDS) en HCl 0.01 M para solubilizar el MTT reducido. La absorción a 570 nm se mide en un espectrómetro después de 24 h y se evalúa en relación a una tasa de supervivencia del 100% en el experimento de control sin adición de copolímero.

Prueba de la LDH

- 10 La prueba colorimétrica detecta actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células muertas. La prueba se lleva a cabo análogamente a la prueba del MTT con células J774 en placas de microtitulación. Después de la incubación durante 48 h, se analiza la actividad de LDH en porciones de 4 µl del sobrenadante con un kit de prueba de LDH comercial. La evaluación se realiza en relación con el 100% de citólisis (toxicidad) en el experimento de control sin adición de copolímero. En este caso se determina el valor del 100% después de la incubación de una alícuota de células en presencia de Tritón X-100 para la citólisis completa.

Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación.

- 15 Tabla 5

Copolímero	MAA	MMA	EA	MA	Prueba del MTT % de supervivencia celular		Prueba de la LDH % de LDH liberada	
					0.03125 [mg/ml]	0.5 [mg/ml]	0.03125 [mg/ml]	0.5 [mg/ml]
A	50	50	-	-	90	100	< 5	< 5
B	50		50		30	20	35	40
C	30	-	35	35	100	80	< 5	15
D	30	70	-	-	100	100	< 5	< 5
E	10	45	-	45	100	< 5	< 5	40

MAA = ácido metacrílico [% en peso]
MMA = metacrilato de metilo [% en peso]
EA = acrilato de etilo [% en peso]
MA = acrilato de metilo [% en peso]

Resultado:

- 20 Las mediciones obtenidas en la prueba del MTT y la prueba de la LDH concuerdan cualitativamente. El copolímero B es el más tóxico para J774 incluso a baja concentración. No se detectó ningún efecto tóxico de los copolímeros A y D. El copolímero E, que causa una hemólisis limitada de los glóbulos rojos en el ejemplo 4, demostró ser tóxico para las células J774 a una concentración de 0.5 mg/ml. El copolímero C es ligeramente tóxico para las células J774 a una concentración de 0.5 mg/ml.

Ejemplo 6

Cambio conformacional (transición) dependiente del pH de los copolímeros A a E.

- 25 Fluorescencia del pireno

El colorante fluorescente pireno se puede utilizar para seguir la transición de los polímeros sensibles al pH a diferentes valores de pH (véase, por ejemplo: K. Kalyanasundaram y J.K. Thomas. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. J. Am. Chem. Soc. 99:2039-2044 (1977)).

- 30 Las transiciones de las estructuras en espiral hidrófilas (bobina) a estructuras globulares hidrófobas se asocian a una disminución en la proporción del primer (372 nm) y tercer (383 nm) picos en el espectro de emisión (relación I_1/I_3). Para la medición, simplemente se agrega pireno a la solución de copolímero.

Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Copolímero	MAA	MMA	EA	MA	Emisión del pireno ($I_{372\text{ nm}}/I_{383\text{ nm}}$)			
					pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.4
A	50	50	-	-	1.32	1.39	1.45	1.52
B	50		50		1.25	1.39	1.46	1.48
C	30	-	35	35	1.27	1.31	1.35	1.46
D	30	70	-	-	1.22	1.23	1.27	1.36
E	10	45	-	45	1.27	1.26	1.26	1.26

Resultado:

- 5 Los copolímeros A y B (50% en peso de ácido metacrílico) muestran la transición más pronunciada entre pH 7.4 y pH 5.5, seguida de copolímeros de C y D (30% en peso de ácido metacrílico). El copolímero E (10% en peso de ácido metacrílico) no muestra prácticamente ningún comportamiento de transición. El comportamiento de transición parece correlacionarse con el contenido de ácido metacrílico de los copolímeros pero no con la actividad hemolítica de los copolímeros (véanse ejemplos 2 y 4).

Ejemplo 7

- 10 Acoplamiento del copolímero B con el colorante Lisamina ® (rodamina B)

La prueba se lleva a cabo como se describe en K. Abdellaoui, M. Boustta, M. Vert, H. Morjani, M. Manfait. (1998) Eur J Pharm Sci 6, 61-73, con las modificaciones siguientes. El activador del grupo carboxilo N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) fue remplazado por 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPC). Se agregan 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y trietilamina en cantidades catalíticas. La reacción se lleva a cabo durante 4 días.

- 15 250 mg de copolímero B se disolvieron en 1 ml de tetrahidrofurano (THF) destilado previamente. Después se agregaron 0,5 mg/ml (3×10^{-3} mmol) 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPC) para activar los grupos carboxilo. Después de 30 min, se disolvieron cantidades catalíticas de trietilamina y 4-(dimetilamino)piridina y Lisamina ® rodamina B etilendiamina (1 mg/ml, 1.5×10^{-3} mmol), disueltas en N,N-dimetilformamida anhidra. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad en atmósfera de argón durante 96 h.

- 20 La mezcla de reacción se pasó a través de un filtro de 0.2 μm para quitar el subproducto DIPC precipitado. El THF presente se eliminó al vacío. Al producto crudo que aún contenía THF se le agregó una mezcla de cloroformo/metanol (85/15 vol/vol) y la solución se eluyó en una columna de gel de sílice para eliminar la rodamina libre. En este caso, el proceso de elución se controló por cromatografía en capa delgada. Se combinaron las fracciones adecuadas y el solvente se eliminó al vacío. El residuo se tomó en THF y se dializó contra agua/metanol (50/50) usando una membrana de 3500 Dalton durante 3 días para separar los residuos de rodamina B enlazada no covalentemente. Después se continuó la diálisis contra tampón de fosfato de pH 9 durante 2 días y contra agua destilada durante 2 días más. El producto resultante se liofilizó durante 72 h.

Se determinó el contenido de rodamina B en el copolímero mediante espectrofluorometría en metanol a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{exc}} = 560\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580\text{ nm}$).

- 30 El rendimiento de copolímero de color carmesí fue de 83%. La unión de rodamina B resultó ser de 0.04 mol%, lo que significa que teóricamente una de 9 moléculas de copolímero se acopla a una molécula de rodamina.

Se pretendió analizar las características de solubilidad a distintos valores de pH, comparando con el copolímero B no acoplado a la rodamina B.

Los resultados se muestran en la tabla 7 a continuación.

35

Tabla 7

	Insolubilidad (precipitación) en [%] a pH					
pH	4.2	4.5	5.3	5.6	6.0	7.0

	Insolubilidad (precipitación) en [%] a pH					
Copolímero B	100	70	5	< 5	< 5	< 5
Copolímero B rodamina B	70	70	100	10	< 5	< 5

Resultado:

- 5 El acoplamiento de rodamina al copolímero B causa un marcado cambio en las características de solubilidad. Hay un aumento pronunciado desde alrededor de pH 5.6 a 100% de insolubilidad a pH 5.3. En contraste, el copolímero B sin acoplar no muestra 100% de insolubilidad hasta que el pH es de 4.2. El aumento en esta región tiene lugar claramente menos abruptamente desde alrededor de pH 5.3.

Ejemplo 8

Procesos de preparación: se da un ejemplo para cada uno de los procesos de preparación 1 y 2. Las cantidades proporcionales pueden modificarse como se indica en la tabla en la página 16.

- 10 El peso promedio del peso molecular (PM) se puede calcular aproximadamente a partir de las mediciones de la viscosidad $n_{\text{spec}/c}$ (cm^3/g) en relación con la viscosidad del polimetil metacrilato (PMMA) a 25 °C en DMF (dimetilformamida). La fórmula siguiente encontrada empíricamente se utiliza para este propósito:

$$M = \left(\frac{[\eta]}{4.976 \cdot 10^{-3}} \right)^{\frac{1}{0.78}}$$

Proceso de preparación 1

- 15 Se introdujeron 1430 g de agua destilada, 3.78 g de laurilsulfato de sodio, 12.6 g de monooleato de polioxietileno 20 sorbitán y 1.26 g de peroxodisulfato de amonio, disueltos en 20 g de agua destilada, en un recipiente de reacción con una capacidad de 2 L, equipado con un condensador de reflujo, agitador y recipiente de alimentación. A 81 °C, una mezcla de monómero que consistía en:

270 g de acrilato de etilo

- 20 270 g de ácido metacrílico

27 g de tioglicolato de 2-etilhexilo

se dosificó en una solución en el transcurso de 2.5 horas.

- 25 Una vez que se completó la alimentación, la mezcla se mantuvo a 81 °C durante 2 horas más, se agregó una mezcla de 0.176 g de emulsión antiespumante de silicona SE-2MC y 10 g de agua destilada y se eliminaron 95.42 g de agua destilada al vacío a unos 300 mbar, y se enfrió hasta temperatura ambiente. La dispersión tuvo un contenido de sólidos de 30%.

Proceso de preparación 2

- 30 Se introdujeron 774 g de agua destilada, 1092 g de laurilsulfato de sodio y 1.4 g de peroxodisulfato de sodio, disueltos en 10 g de agua destilada, en un recipiente de reacción con una capacidad de 2 L, equipado con condensador de reflujo, agitador y recipiente de alimentación. A 75 °C, una emulsión que consistía en:

390 g de acrilato de metilo

150 g de metacrilato de metilo

60 g de ácido metacrílico

1.008 g de laurilsulfato de sodio

- 35 7 g de monooleato de polioxietileno 20 sorbitán

30 g de tioglicolato de 2-etilhexilo

ES 2 386 422 T3

820.99 g de agua destilada

se dosificó en esta solución en el transcurso de 4 horas.

Una vez que se completó la alimentación, la mezcla se mantuvo a 75 °C durante otras 2 horas, se agregó una mezcla de 0.21 g de emulsión antiespumante de silicona SE-2MC y 10 g de agua destilada, y se eliminaron 120 g de agua destilada a unos 300 mbar, y se enfrió hasta temperatura ambiente. La dispersión tuvo un contenido de sólidos de 30%.

5

Nº de lote	Composición del polímero (% en peso)	Regulador (partes)	Proceso de preparación	Temp del polím. (°C)	Emulsionante (partes)	Iniciador (partes)	Contenido de sólidos (%)	$n_{\text{spec/c}}$ (cm ³ /g)	PM calc.****
1	A-B-C = 65-25-10	4 &	2	75	0,15 l	0,1 l	30	10	14 114
					0,5 k				
2*	B-C = 51-49	3 G	2	80	0,125 l	0.125 j	40	17.7	28 918
3	D-C = 50-50	4 &	1	81	0,3 l	0,1 j	30	13	19 624
					1 K				
4**	B-C = 70.7-29,3	4 &	2	80	0,125 l	0,13 j	40	10.2	14 469
5	A-D-C = 40-30-30	4 &	2	75	0,15 l	0,1 l	30	11.7	17 191
6	D-C = 50-50	4 &	1	81	0,3 l	0,1 j	30	13.7	20 961
					1 K				
7	D-E-C = 49.5-0.5-50	4 &	1	81	0,3 l	0,1 j	30	13.9	21 346
					1 K				
8	D-E-C = 49-1-50	4 &	1	81	0,3 l	0,1 j	30	13.9	21 346
					1 K				
9	D-E-C = 49.5-0.5-50	10 H	1	81	0,3 l	0,1 j	30	12.3	18 306
					1 K				
10	D-E-C = 49-1-50	10 H	1	81	0,3 l	0,1 j	30	12	17 747
					1 K				
11	D-F-C = 40-10-50	10 H	1	81	0,3 l	0,1 j	30	12	17 747
					1 K				

ES 2 386 422 T3

Nº de lote	Composición del polímero (% en peso)	Regulador (partes)	Proceso de preparación	Temp del polím. (°C)	Emulsionante (partes)	Iniciador (partes)	Contenido de sólidos (%)	$n_{spec/c}$ (cm ³ /g)	PM calc.****
<p>* Polimerización final con 0.01 parte de disulfito de sodio, 0.0007 parte de sulfato de hierro (II), 0.05 parte de peroxodisulfato de amonio</p> <p>** Polimerización final con 0.01 parte de disulfito de sodio, 0.0007 parte de sulfato de hierro (II), 0.055 parte de peroxodisulfato de amonio</p> $M = \left(\frac{[\eta]}{4.976 \cdot 10^{-4}} \right)^{\frac{1}{0.74}}$ <p>**** peso molecular (PM) calculado con respecto a PMMA a 25 °C/DMF</p> <p>A = acrilato de metilo B = metacrilato de metilo C = ácido metacrílico D = acrilato de etilo E = metacrilato de dodecilo F = metacrilato de butilo G = tioglicolato de 2-etilhexilo H = dodecil mercaptano I = laurilsulfato de sodio J = peroxodisulfato de amonio K = monooleato de polioxietilen 20 sorbitán L = peroxodisulfato de sodio</p>									

REIVINDICACIONES

1. Un polímero sensible al pH que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 5 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y
 80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,
- que se caracteriza porque
- 10 tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,
- y causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos,
- 15 donde quedan excluidos los polímeros, que son polimerizados por un proceso de polimerización en emulsión o suspensión acuosa en presencia de un complejo quelato de un metal de transición, que sea un complejo quelato de cobalto.
2. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por ser un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 40 a 60% en peso de unidades de ácido metacrílico y
- 20 60 a 40% en peso de unidades de acrilato de etilo.
3. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por ser un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 20 a 40% en peso de unidades de ácido metacrílico y
- 25 25 a 45% en peso de unidades de acrilato de metilo,
 25 a 45% en peso de unidades de acrilato de etilo.
4. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por ser un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 30 40 a 60% en peso de unidades de ácido metacrílico,
 60 a 30% en peso de unidades de acrilato de etilo y
 2 a 20% en peso de metacrilato de butilo.
5. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por ser un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 35 40 a 60% en peso de unidades de ácido metacrílico,
 60 a 40% en peso de unidades de acrilato de etilo y
 0.1 a 2% en peso de unidades de un éster C₉-C₁₆ alquílico de ácido acrílico o metacrílico.
- 40 6. Un polímero sensible al pH de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza porque a una concentración de 0.03125 mg/ml, da lugar en la prueba del MTT con células de ratón tipo macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) un valor porcentual de supervivencia de las células de al menos 25%, basado en una tasa de supervivencia de 100% en el experimento de control.
7. Un polímero sensible al pH de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza porque a

una concentración de 0.03125 mg/ml da lugar en la prueba de la LDH con células de ratón tipo macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) un valor de liberación de LDH de no más de 40%, basado en 100% de citólisis (toxicidad) en el experimento de control.

- 5 8. Un polímero sensible al pH que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y
80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,
- 10 que tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,
y causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en una prueba de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos.
- que se caracteriza por estar en forma de un conjugado o un complejo con una biomolécula natural o sintética farmacéuticamente eficaz o un principio activo.
- 15 9. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 8 que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y
80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,
- 20 que tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,
- 25 y causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos,
- que se caracteriza porque se acopla a un agente que altera la conformación.
10. Un polímero sensible al pH de acuerdo con la reivindicación 8 que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 30 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y
80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,
- que tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,
- 35 y causa al menos 50% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos,
- que se caracteriza por ser un constituyente de un complejo entrecruzado por medio de los ácidos nucleicos después de la modificación química.
- 40 11. Un proceso para preparar un polímero sensible al pH de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7 mediante polimerización por radicales libres de los monómeros en presencia de iniciadores de la polimerización y reguladores del peso molecular, mediante polimerización en bloque, perla o emulsión, polimerización por transferencia de grupo (GTP), polimerización radical controlada por transferencia de átomos (ATRP) y descarga del polímero, que se caracteriza porque el polímero se disuelve, se purifica y luego se seca.
- 45 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, que se caracteriza porque se emplea dodecil mercaptano y/o tioglicolato de 2-etilhexilo como regulador del peso molecular.
13. El uso de un polímero sensible al pH, que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por
- 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y

ES 2 386 422 T3

80 a 35% en peso de unidades de ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico

que tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,

5 y que causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos, como portador, conjugado o complejo con biomoléculas naturales o sintéticas o principios activos, cuando corresponda como constituyente de micropartículas, nanopartículas, liposomas, emulsiones y/o vesículas de lípidos.

10 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 como portador, conjugado o complejo en combinación con lípidos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (ADN y ARN), en particular oligonucleótidos, nucleósidos, ADN antisentido o ARN antisentido, nucleótidos, toxinas, inmunotoxinas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o sus combinaciones.

15 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 como portador, conjugado o complejo en combinación con principios activos de las clases de principios activos como analgésicos, antialérgicos; antirreumáticos, antibióticos, antiinfecciosos, antiparkinsonianos, antipsoriásicos, antitumorales, productos dermatológicos, remedios para la gota, inmunoreguladores, agentes gastrointestinales, neurotrópicos, productos oftalmológicos y citostáticos.

16. El uso de un polímero sensible al pH, que es un copolímero de (met)acrilato compuesto por

20 20 a 65% en peso de unidades de ácido metacrílico y
80 a 35% en peso de unidades ésteres C₁-C₁₈ alquílicos de ácido (met)acrílico,

que tiene un peso molecular en el rango de 1000 a 50 000 g/mol,

25 y que causa al menos 60% de hemólisis a pH 5.5 y menos de 5% de hemólisis a pH 7.4, a una concentración de 150 µg/ml en un ensayo de citotoxicidad con glóbulos rojos humanos, como ingrediente para la producción de una forma farmacéutica dérmica, transdérmica, parenteral, nasal, pulmonar, vaginal u oral.

30 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 en una forma farmacéutica para el tratamiento de cáncer, infecciones (incluida por VIH), trastornos cardiovasculares (p. ej. arterioesclerosis), artritis, trastornos neurodegenerativos (parkinsonismo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer), trastornos genéticamente relacionados con deficiencia de enzimas, hepatitis B y C, mucoviscidosis, hipercolesterolemia, síndrome de Down, distrofia muscular, enfermedades autoinmunitarias, herpes y herpes zoster, psoriasis, retinitis CMV, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes.