

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 875**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A01N 43/04** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04712281 .7**  
96 Fecha de presentación: **18.02.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1594977**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Unión reversible de un polímero activo en la membrana a un polinucleótido**

30 Prioridad:  
**18.02.2003 US 448209 P**  
**17.02.2004 US 780848**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.11.2012**

73 Titular/es:  
**ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION**  
**(100.0%)**  
**225 South Lake Avenue, 3rd Floor**  
**Pasadena, CA 91101, US**

72 Inventor/es:  
**ROZEMA, DAVID, B. y**  
**WAKEFIELD, DARREN**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 390 875 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

Unión reversible de un polímero activo en la membrana a un polinucleótido.

CAMPO DE LA INVENCION.

5 Esta patente se refiere al suministro de polinucleótidos a células *in vitro* o células en mamíferos post-natales, utilizando conjugados moleculares reversibles.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

10 La vía de entrada celular para la mayoría de los fármacos convencionales es la difusión a través de la membrana biológica. Por esta razón, los fármacos tienden a ser pequeños ( $MW < 500$ ) y anfipáticos, conteniendo funcionalidades tanto hidrófobas como hidrófilas. Estas características dan lugar a moléculas con solubilidad en agua, permitiéndolas al mismo tiempo cruzar la bicapa lipídica no polar de la membrana celular. En cambio, los fármacos utilizados en terapias antisentido y génicas son polímeros hidrófilos relativamente grandes y frecuentemente están también muy cargados negativamente. Ambas características físicas impiden su difusión directa a través de la membrana celular. Por esta razón, la principal barrera para la terapia génica y la terapia antisentido es el suministro del fármaco al interior de la célula. Esta situación contrasta con el desarrollo de fármacos estándar, en el que la identificación del fármaco es la barrera principal en el desarrollo.

15 La transferencia de genes o polinucleótidos a las células es una importante técnica para la investigación biológica y médica, así como para aplicaciones potencialmente terapéuticas. El polinucleótido precisa ser transferido a través de la membrana celular y al interior de la célula. Los métodos de transferencia génica que se están estudiando actualmente incluyen vectores virales y los métodos no virales.

20 Los polímeros pueden facilitar la entrada celular de oligonucleótidos. Por ejemplo, se ha postulado que algunos polímeros, tales como la polietilenimina, interrumpen la función endosómica/lisosómica a través de un efecto de esponja de protones. La interrupción de la función endosómica/lisosómica se ha logrado también uniendo agentes endosómicos o de rotura de la membrana, tales como péptidos de fusión o adenovirus, en el polímero o complejo.

25 Los polímeros que son sensibles al pH han encontrado una amplia aplicación en el área del suministro de fármacos a causa de su capacidad para explotar diferentes gradientes de pH fisiológicos e intracelulares para el propósito de la liberación controlada de fármacos. La sensibilidad al pH puede ser ampliamente definida como cualquier cambio en las propiedades físico-químicas de polímeros sobre un intervalo de pH. Definiciones más estrechas demandan cambios significativos en la capacidad del polímero para retener o liberar una sustancia bioactiva en un intervalo de pH tolerado fisiológicamente (típicamente pH 5,5 - 8).

30 SUMARIO DE LA INVENCION.

La presente invención es lo siguiente:

- 35 1. Composición para el suministro de un oligonucleótido a una célula, que comprende: un conjugado de poliamina activa en la membrana - oligonucleótido, en el que la poliamina está unida al oligonucleótido por medio de un enlace covalente sensible al pH o lábil a disulfuro y las aminas en la poliamina están modificadas reversiblemente mediante anhídridos maleicos disustituidos.
2. Composición según 1, en la que los anhídridos maleicos disustituidos son anhídridos dimetil maleicos sustituidos con carboxilato (CDM).
3. Composición según 1 o 2, en la que la poliamina y el oligonucleótido están unidos covalentemente por medio de un tioéster de anhídrido dimetilmaleico sustituido con carboxilato (CDM).
- 40 4. Composición según cualquiera de los apartados 1 a 3, en la que el oligonucleótido se elige entre el grupo que consiste en dsRNA, siRNA, microRNA, casete de expresión de siRNA, oligonucleótido antisentido y ribozima.
5. Composición según cualquiera de los apartados 1 a 4, en la que el oligonucleótido se modifica para contener un grupo reactivo en el término 3' o 5'.
- 45 6. Composición según cualquiera de los apartados 1 a 5, en la que el oligonucleótido es un oligonucleótido modificado con amina o con cisteína.
7. Composición según 1, en la que dos o más oligonucleótidos están unidos covalentemente a la poliamina.
8. Composición según cualquiera de los apartados 1 a 7, en la que la poliamina se elige entre el grupo que consiste en poliamina anfipática, polivinil éter anfipático, y péptido activo en la membrana.
- 50 9. Composición según el apartado 8, en la que el péptido activo en la membrana comprende pardaxina.

10. Método *in vitro* para suministrar un polinucleótido a una célula, que comprende:

- (a) formar un conjugado de poliamina activa en la membrana - polinucleótido en el que la poliamina está unida al polinucleótido por medio de un enlace covalente sensible al pH o lábil a disulfuro;
- (b) modificar reversiblemente las aminas del polímero por reacción con anhídridos maleicos disustituidos, preferentemente anhídridos dimetilmaleicos sustituidos con carboxilato (CDM); y
- (c) poner en contacto la célula con el conjugado.

11. Método según el apartado 10, en el que la poliamina y el oligonucleótido están unidos covalentemente por medio de un tioéster de anhídrido dimetilmaleico sustituido con carboxilato (CDM).

12. Composición según cualquiera de los apartados 1 a 9 para el tratamiento mediante terapia génica o terapia antisentido.

Los autores de la presente invención describen conjugados de polímero activo en la membrana - polinucleótido covalentes escindibles, para el suministro de polinucleótidos a las células. El polinucleótido puede ser ADN, ARN, o polinucleótidos sintéticos u oligonucleótidos. La célula puede estar *in vitro* o *in vivo*. Un polímero preferido es un poliviniléter anfifílico. Un polímero de poliviniléter puede contener subunidades monómeras elegidas en la lista que comprende alquil vinil éteres, vinil éteres cargados positivamente, vinil éteres cargados negativamente, aril vinil éteres y vinil éteres que contienen polietilenglicol y sacárido. El enlace covalente escindible entre el polímero activo en la membrana y el polinucleótido puede ser reactivo en presencia de ácido o tioles. El polímero activo en la membrana puede favorecer la entrada de polinucleótido en una célula a través de la membrana plasmática o a través de la rotura de las membranas endocíticas.

Los autores de la presente invención describen agentes de transfección de polinucleótidos que comprenden: conjugados moleculares de polinucleótidos y polímeros activos en la membrana en los que el polímero activo en la membrana está unido al polinucleótido por medio de un enlace lábil o escindible. El polímero activo en la membrana puede ser elegido entre las listas que consisten en: polímero anfipático, poliviniléter anfipático, y péptido activo en la membrana. El enlace lábil o escindible puede ser elegido entre la lista que consiste en: enlaces lábiles al pH, maleamato, acetal, éter enólico y enlace disulfuro. El polinucleótido puede ser elegido entre la lista que consiste en: polinucleótido monocatenario, polinucleótido bicatenario, DNA, RNA, oligonucleótido, vector de expresión, siRNA, microRNA, ribozima, polinucleótido antisentido y polinucleótido sintético.

Los autores de la presente invención describen la modificación reversible de conjugados de polímero activo en la membrana - polinucleótido catiónicos para formar conjugados de polímero - polinucleótido aniónicos que comprenden: formar un conjugado de poliamina - polinucleótido y modificar las aminas en el polímero mediante reacción con anhídridos maleicos. La modificación de aminas en el polímero mediante reacción con anhídridos maleicos puede reducir la actividad de membrana del polímero. Una poliamina preferida es un polivinil éter. Un anhídrido maleico preferido es un anhídrido maleico disustituido. Un anhídrido maleico disustituido preferido es el anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico. La exposición al ácido de la poliamina modificada, tal como en un endosoma, tiene por resultado la escisión del anhídrido y la modificación y regeneración de la amina. Si la modificación reduce la actividad de membrana del polímero, la regeneración de las aminas restablece la actividad en la membrana.

La funcionalidad del polímero activo en la membrana unido al polinucleótido puede ser modificada o potenciada por unión covalente de uno o más grupos funcionales. Los grupos funcionales se pueden añadir al polímero mediante copolimerización o mediante reacción con un grupo reactivo, tal como una amina, en el polímero.

Los autores de la presente invención describen un procedimiento para suministrar un polinucleótido a una célula, que comprende la unión covalente del polinucleótido a un polímero activo en la membrana por medio de un enlace lábil o escindible y la puesta en contacto de la célula con el conjugado de polinucleótido - polímero. Los polímeros activos en la membrana que contienen amina, están modificados reversiblemente por reacción con un anhídrido maleico. La reacción con un anhídrido maleico puede reducir o alterar la carga en el polímero o añadir un grupo funcional al polímero. La modificación de una o más aminas en el polímero activo en la membrana puede inhibir reversiblemente la actividad del polímero en la membrana. Un enlace preferido entre el polinucleótido y el polímero es a través de un tioéster de anhídrido maleico.

Los objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue cuando se toma junto con los dibujos adjuntos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

FIG. 1. Ilustración de la reacción entre el anhídrido carboxil dimetilmaleico y una amina.

FIG. 2. Ilustración de la unión reversible CDM - tioéster de un polinucleótido a un polímero.

FIG. 3. Ilustración de la conjugación reversible de un polinucleótido y polivinil éter mediante un enlace disulfuro.

FIG. 4. Ilustración de la conjugación de un polinucleótido modificado con cisteína para dar una poliamina a través de una unión lábil en medio ácido CDM - tioéster.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Los métodos anteriores para el suministro de oligonucleótidos, incluyendo siRNA, a las células se ha basado en la complejación del oligonucleótido aniónico con un agente de suministro catiónico tal como un polímero catiónico o un lípido catiónico. Sin embargo, a causa del pequeño tamaño de los oligonucleótidos, los complejos entre los oligonucleótidos y los policationes son inherentemente inestables. Un método más eficaz para el empaquetado de los oligonucleótidos es unir covalentemente el oligonucleótido al vehículo de suministro. Sin embargo, para que el oligonucleótido sea activo, debe ser liberado desde el vehículo de suministro. Esta liberación requiere un enlace lábil entre el oligonucleótido y el polímero, que se rompe después de que el polinucleótido se ha suministrado a la célula.

10 Los derivados de anhídrido maleico disustituidos pueden ser utilizados eficazmente para proporcionar uniones covalentes reversibles lábiles en medio ácido entre los polinucleótidos y las moléculas de agente de suministro. Un derivado de anhídrido maleico disustituido, anhídrido dimetilmaleico sustituido con carboxilato (CDM), se puede utilizar para convertir reversiblemente una amina en un carboxilato (FIG. 1). El CDM contiene un grupo funcional anhídrido maleico que se puede convertir en un grupo maleamato lábil al pH, y un grupo carboxilato, que puede ser usado para la conjugación.

15 Con el fin de conjugar selectivamente con el grupo carboxilato de CDM, debe ser activado selectivamente de tal manera que reaccione sin reacción del anhídrido (o viceversa). Esta activación se consigue utilizando un grupo éster tioéster. En comparación con un anhídrido, el grupo tioéster es relativamente no reactivo frente al agua y a las aminas. Usando un tioéster derivado de CDM (FIG. 2), es posible hacer reaccionar selectivamente el grupo funcional anhídrido con una amina, seguido por la reacción con una amina o bien con un grupo cisteína amino terminal. De esta forma, dos moléculas se unen por medio de un enlace maleamato lábil en medio ácido. Más específicamente, los polinucleótidos modificados con amina se pueden hacer reaccionar con un tioéster de CDM y luego acoplarlos a una poliamina.

20 Otro tipo de enlace escindible es un enlace disulfuro. Un polinucleótido que contiene amina puede ser modificado con un reactivo, tal como N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), que une un tioéster al polinucleótido. El polímero, una poliamina, es modificado por la unión de un grupo que contiene enlaces disulfuro altamente reactivos, tal como 2-piridilditio (PDP). Este grupo se elige de forma tal que el tioéster del polinucleótido modificado formará fácilmente un enlace disulfuro con el polímero. En el ejemplo concreto que se ilustra en la FIG. 3, la adición de siRNA modificado con SATA a una poliamina tiene por resultado la escisión del tioéster por reacción con grupos amina. Esta reacción tiene por resultado la acilación de una amina y la producción de un grupo tiol libre en el siRNA. El siRNA modificado con tiol resultante reacciona con el grupo PDP en el polímero, dando como resultado la conjugación de siRNA y polímero mediante un enlace disulfuro.

25 Después de la conjugación de un polinucleótido con una poliamina activa en la membrana, bien sea por enlace de CDM o disulfuro, cualquier amina restante en el polímero puede hacerse reaccionar con CDM para convertir la poliamina catiónica en un poliácido sensible al pH (FIG. 1). Los vehículos de suministro sintéticos diseñados para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos contienen frecuentemente polímeros catiónicos y/o lípidos. Sin embargo, los agentes cargados positivamente tienen una tendencia a ser tóxicos después de su administración sistémica y muestran bajas eficiencias de transfección cuando se usan para suministrar construcciones de expresión génica. Las manifestaciones tóxicas de los complejos catiónicos de ácido nucleico administrados sistémicamente pueden variar entre una aglutinación de los glóbulos rojos y una reacción inflamatoria potente y aumento de los niveles en suero de las enzimas hepáticas. Los complejos catiónicos también tienden a agregarse en condiciones fisiológicas y pueden acumularse en los lechos capilares de los pulmones con un resultado letal. Además, complejos catiónicos de ácido nucleico inyectados por vía intravenosa encuentran también células tales como macrófagos, monocitos, neutrófilos, plaquetas y hematíes, que son importantes mediadores potenciales de la inmunidad.

30 Los polinucleótidos son incapaces de atravesar las membranas biológicas. Para que estos compuestos entren en las células, las células deben absorberlos por endocitosis, en los endosomas, o bien debe haber una rotura de la membrana celular para permitir que el compuesto la atraviese. En el caso de una entrada endosómica, la membrana endosómica debe romperse para permitir la entrada del polinucleótido al interior de la célula. La unión covalente de un polinucleótido a un polímero activo en la membrana proporciona el co-suministro del polinucleótido a la célula junto con un compuesto activo en la membrana. Además, dado que el polinucleótido está unido al polímero mediante un enlace lábil, el polinucleótido que se suministra a la celda se libera del polímero y tiene actividad en la célula.

35 La presente invención proporciona el suministro de polinucleótidos a células de mamífero mediante la conjugación del polinucleótido con un polímero activo en la membrana, por medio de un enlace reversible. Los grupos de unión lábiles se seleccionan de manera que experimentan una transformación química (por ejemplo, la escisión) cuando están presentes en ciertas condiciones fisiológicas. La transformación química puede ser iniciada por la adición de un compuesto a la célula o puede ocurrir de forma espontánea cuando se introduce en entornos intra y/o extracelulares (por ejemplo, las condiciones de pH más bajo de un endosoma o el espacio extracelular alrededor de los tumores). Se sabe en la técnica, que las condiciones bajo las cuales un grupo lábil experimentará la

transformación pueden ser controladas alterando los constituyentes químicos de la molécula que contiene el grupo lábil. Por ejemplo, la adición de restos químicos particulares (p. ej. aceptores o donantes de electrones) cerca del grupo lábil, puede afectar a las condiciones particulares (p. ej. el pH) bajo las cuales ocurrirá la transformación.

5 La presente invención proporciona conjugados de polinucleótido-polímero que son suficientemente estables químicamente en soluciones aceptables farmacológicamente. Por consiguiente, los conjugados pueden prepararse y administrarse a las células en una solución que no sea tóxica para las células. Los conjugados pueden ser añadidos a los medios en los que se cultivan las células *in vitro*. Alternativamente, los conjugados se pueden inyectar en un mamífero para el suministro de los polinucleótidos a las células *in vivo*. Para la inyección de los conjugados en un mamífero, los conjugados se pueden introducir en un vaso o directamente en un tejido. También se permiten otras  
10 vías de administración. Bajo las condiciones apropiadas, los enlaces lábiles presentes en el conjugado polímero-polinucleótido experimentan una transformación química cuyo resultado es la rotura del enlace. En algunas realizaciones de la presente invención, los polinucleótidos son suministrados a las células mediante conjugados de polímero - polinucleótido que experimentan una transformación química cuando se exponen al entorno de pH bajo de un endosoma. La escisión de los enlaces tiene por resultado la liberación del polinucleótido desde el polímero. La  
15 escisión de los enlaces también puede tener como resultado la reactivación de la actividad de membrana del polímero.

La ultrafiltración renal es una de las principales vías de eliminación de la sangre de las proteínas hidrófilas, polímeros y conjugados polímero-proteína. Entre los parámetros que afectan a este proceso están la composición química, el tamaño, y la carga. En particular, el aumento de tamaño retarda la ultrafiltración renal y favorece la  
20 acumulación en los tejidos permeables por la permeación pasiva mejorada y el mecanismo de retención. Se considera que el valor de corte o valor límite del peso molecular para la eliminación por el riñón de proteínas globulares nativas es de aproximadamente 70 kDa, que es próximo al peso molecular de la seroalbúmina. El PEG es un polímero no globular para el cual se ha estudiado el aclaramiento renal. La ultrafiltración de PEGs con peso molecular inferior a 8 kDa no está restringida, mientras que la eliminación de PEGs en el intervalo de 8 a 30 kDa  
25 está gobernada por el tamaño molecular. Con un peso molecular que sobrepasa los 30 kDa, la eliminación de PEG es drásticamente más lenta. Por esta razón, los conjugados de polímero - polinucleótido en los que el polímero es mayor que aproximadamente 10.000 daltons pueden ser lo más eficaces para el suministro de polinucleótidos a las células *in vivo*. También, se ha encontrado que las macromoléculas aniónicas son aclaradas por ultrafiltración renal y otras vías más lentamente que lo que la modificación reversible neutra o positiva de grupos cargados  
30 positivamente en el polímero puede ser ventajosa para el suministro a las células *in vivo*.

La inclusión de enlaces lábiles en polímeros activos en la membrana aumenta su versatilidad en diversas formas. Puede reducir su toxicidad al permitir que su actividad de membrana se exprese en tejidos específicos, tales como los tumores y las articulaciones inflamadas, localizaciones subcelulares específicas tales como endosomas y lisosomas, o bajo condiciones específicas, tales como un entorno reductor. En una realización de la invención, los  
35 enlaces lábiles son sensibles al pH por cuanto los enlaces se rompen o se escinden cuando el pH de su microentorno cae por debajo del pH fisiológico de 7,4, o por debajo de un pH de 6,5, o por debajo de un pH de 5,5. En otra realización, los enlaces lábiles son disulfuros que son lábiles bajo condiciones fisiológicas o que se escinden mediante la adición de un agente reductor exógeno. Entre los ejemplos de enlaces lábiles se incluyen: acetales, cetales, éteres enólicos, ésteres enólicos, amidas de ácido maleámico 2,3-disustituido (maleamatos), iminas, iminiums y enaminas, éteres de sililo y silil éteres enólicos.  
40

La invención específica compuestos de la estructura general A-B-C, en la que A es un oligonucleótidos, B es un enlace lábil que es sensible al pH o un enlace disulfuro lábil, y C es una poliamina activa en la membrana. A puede ser modificado para permitir la unión del enlace lábil en el compuesto. A puede ser modificado para que contenga un grupo reactivo en el término 3' o 5'. Alternativamente, A puede ser modificado mediante alquilación para que  
45 contenga un grupo reactivo. Las mostazas de nitrógeno y de azufre pueden ser utilizadas para alquilar A. A puede ser antisentido, ribozima, siRNA. Los enlaces lábiles al pH se pueden seleccionar de la lista que comprende: acetales, cetales, éteres enólicos, ésteres enólicos, amidas de ácidos maleámicos 2,3-disustituidos, iminas, iminiums y enaminas, silil éteres y silil éteres enólicos.

Definiciones:

50 *Enlace lábil* - Un enlace lábil es un enlace covalente que es capaz de romperse selectivamente. Esto es, el enlace lábil puede romperse en presencia de otros enlaces covalentes sin que se rompan los otros enlaces covalentes. Por ejemplo, un enlace disulfuro es capaz de ser roto en presencia de tioles sin que se escindan otros enlaces que también pueden estar presentes en la molécula, tales como los enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-azufre y carbono-nitrógeno.

55 La sensibilidad al pH puede definirse ampliamente como cualquier cambio en las propiedades físico-químicas del polímero sobre un intervalo definido de pH. Una definición más estrecha exige cambios significativos en el polímero en un intervalo de pH tolerado fisiológicamente (generalmente pH 5,5 a 8). Los polímeros se pueden dividir en tres categorías basadas en su capacidad de donar o aceptar protones en soluciones acuosas: poliácidos, polibases y polianfolitos. El uso de poliácidos sensibles al pH en aplicaciones de suministro de fármacos se basa por lo general  
60 en su capacidad para hacerse solubles con un aumento de pH (conversión ácido/sal), para formar complejos con

otros polímeros sobre un cambio de pH, o para experimentar un cambio significativo en el equilibrio o balance hidrófobo/hidrófilo. También son posibles las combinaciones de los tres factores anteriores.

5 *Enlaces y uniones lábiles al pH* - lábil al pH se refiere a la rotura selectiva de un enlace covalente en condiciones ácidas ( $\text{pH} < 7$ ). Esto es, el enlace lábil al pH puede romperse bajo condiciones ácidas en presencia de otros enlaces covalentes que se rompen. El término lábil al pH incluye tanto los enlaces como las uniones que son lábiles al pH, muy lábiles al pH, y extremadamente lábiles al pH.

*Enlaces y uniones muy lábiles al pH* - Un subconjunto de uniones lábiles al pH es muy lábil al pH. Para los propósitos de la presente invención, un enlace se considera muy lábil al pH si la vida mitad para la escisión a pH 5 es inferior a 45 minutos.

10 *Enlaces y uniones extremadamente lábiles al pH* - Un subconjunto de uniones lábiles al pH es extremadamente lábil al pH. Para los propósitos de la presente invención, se considera que un enlace es extremadamente lábil al pH si la vida mitad para la escisión a pH 5 es inferior a 15 minutos.

15 *Compuestos anfífilicos y anfipáticos* - Los compuestos anfipáticos, o anfífilicos, tienen partes tanto hidrófilas (solubles en agua) como hidrófobas (insolubles en agua). Los grupos hidrófilos en términos cualitativos indican que el resto químico prefiere el agua. Típicamente, tales grupos químicos son solubles en agua, y son donantes de enlaces de hidrógeno o aceptores con agua. Los ejemplos de grupos hidrófilos incluyen compuestos con los restos químicos siguientes: carbohidratos, polioxietileno, péptidos, oligonucleótidos y grupos que contienen aminas, amidas, alcoxi amidas, ácidos carboxílicos, sulfuros o hidroxilos. Los grupos hidrófobos indican en términos cualitativos que el resto químico evita el agua. Típicamente, tales grupos químicos no son soluble en agua, y no tienden a enlaces de hidrógeno. Los hidrocarburos son grupos hidrófobos.

*Polímero* - Un polímero es una molécula construida por la unión repetida de unidades más pequeñas llamadas monómeros. Un polímero puede ser de los tipos lineal, ramificado, en estrella, en peine, o en 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.

25 La cadena principal de un polímero se compone de los átomos cuyos enlaces se precisan para la propagación de la longitud del polímero. Por ejemplo, en la poli-L-lisina, los grupos carbono carbonilo,  $\alpha$ -carbono, y  $\alpha$ -amina son necesarios para la longitud del polímero y por tanto son átomos de la cadena principal. La cadena secundaria de un polímero se compone de los átomos cuyos enlaces no son necesarios para la propagación de la longitud del polímero.

30 Otros componentes de monómeros y polímeros: Los polímeros pueden tener grupos funcionales que potencien su utilidad. Estos grupos se pueden incorporar en monómeros antes de la formación del polímero o pueden unirse al polímero después de su formación. Los grupos funcionales se pueden seleccionar de la lista que consiste en: grupos diana, modificadores de interacción, estabilizantes estéricos, y compuestos activos en la membrana, y grupos de afinidad.

35 *Grupos targeting* (de señalamiento como diana) - Los grupos de señalamiento como diana, o ligandos, se utilizan para señalar como diana un polímero o complejo de polímero a células, a células específicas, a tejidos o en lugares específicos en una célula. Los grupos de señalamiento como diana potencian la asociación de moléculas con una célula. Los ejemplos de grupos de señalamiento como diana incluyen aquellos que señalan como diana al receptor de asialoglicoproteína usando asialoglicoproteínas o restos de galactosa. Otras proteínas como la insulina, EGF, o transferrina pueden ser utilizadas para el señalamiento como diana. Otros grupos de señalamiento como diana incluyen moléculas que interaccionan con membranas, tales como ácidos grasos, colesterol, compuestos de dansilo, y derivados de anfotericina. Una variedad de ligandos se han utilizado para dirigir fármacos y genes a células y a receptores celulares específicos. El ligando puede buscar una diana dentro de la membrana celular, en la membrana celular o en las proximidades de una célula. La unión de un ligando a un receptor puede iniciar la endocitosis.

45 *Estabilizante estérico* - Un estabilizante estérico es un grupo hidrófilo de cadena larga que impide la agregación del polímero mediante el impedimento estérico de las interacciones electrostáticas de partícula con partícula. Los ejemplos incluyen: grupos alquilo, cadenas de PEG, polisacáridos, moléculas de hidrógeno y alquil-aminas.

50 *Modificador de interacción* - Un modificador de interacción cambia la forma en que una molécula interacciona consigo misma o con otras moléculas, con relación a la molécula que no contiene ningún modificador de interacción. El resultado de esta modificación es que las auto-interacciones o interacciones con otras moléculas aumentan o disminuyen. Por ejemplo, el polietilenglicol es un modificador de interacción que hace disminuir las interacciones entre las moléculas y ellos mismos y con otras moléculas.

55 *Activo en la membrana* - Los polímeros o compuestos activos en la membrana son moléculas que son capaces de inducir uno o más de los efectos siguientes sobre una membrana biológica: una alteración que permite la permeabilidad de moléculas pequeñas, 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 puede ser definida funcionalmente por la actividad del compuesto en al menos uno de los ensayos

siguientes: lisis de los glóbulos rojos (hemólisis), fuga de liposomas, fusión de liposomas, fusión celular, lisis celular y liberación endosómica. Más específicamente los compuestos activos en la membrana permiten el transporte de moléculas con peso molecular mayor que 50 unidades de masa atómica, para cruzar una membrana. Este transporte puede realizarse bien sea por la pérdida de estructura de la membrana o bien por la formación de orificios o poros en la membrana.

Los polímeros activos en la membrana incluyen toxinas activas en la membrana tales como pardaxina, melitina, cecropina, magainina, PGLa, indolicidina, y dermaseptina; péptidos anfipáticos sintéticos; y polímeros anfipáticos tales como butil polivinil éter. Existe una escasa o nula homología o similitud estructural entre todos los péptidos activos en la membrana diferentes. Por lo tanto, se definen por su actividad en la membrana.

**Poli-ión** - Un poli-ión (o polielectrolito), es un polímero que posee carga, esto es, el polímero contiene un grupo (o grupos) que ha ganado o bien ha perdido uno o más electrones. El término poli-ión incluye policationes, polianiones, polímeros zwitteriónicos y polímeros neutros. El término zwitteriónico o ión neutro se refiere al producto de la reacción (sal) entre un grupo ácido y un grupo básico que son parte de la misma molécula. Las sales son compuestos iónicos que se disocian en cationes y aniones cuando se disuelven en la solución. Las sales aumentan la fuerza iónica de una solución, y en consecuencia reducen las interacciones entre los ácidos nucleicos con otros cationes. Un polímero cargado es un polímero que contiene restos, monómeros, grupos o partes con una carga positiva o negativa, y cuya carga neta puede ser neutra, positiva o negativa.

**Policación** - Un policación puede ser un polímero que posee carga neta positiva. Un policación polimérico puede contener unidades de monómero que son carga positiva, carga neutra o carga negativa, si bien la carga neta del polímero ha de ser positiva. Un policación también puede ser una molécula no polimérica que contiene dos o más cargas positivas.

**Polianión** - Un polianión puede ser un polímero que contiene una carga negativa neta. Un polianión polimérico puede contener unidades de monómero que son carga negativa, carga neutra o carga positiva, si bien la carga neta en el polímero ha de ser negativa. Un polianión puede ser también una molécula no polimérica que contiene dos o más cargas negativas.

**Polinucleótido** - El término polinucleótido, o ácido nucleico o ácido polinucleico, es un término de la técnica que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos son las unidades monómeras de los polímeros polinucleótidos. Los polinucleótidos con menos de 120 unidades monómeras se denominan frecuentemente oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales tienen una columna vertebral de desoxirribosa- o ribosa-fosfato. Un polinucleótido artificial o sintético es cualquier polinucleótido que se polimeriza *in vitro* o en un sistema libre de células, y contiene las mismas bases o bases similares, pero puede contener una columna vertebral de un tipo distinto de la columna vertebral de ribosa-fosfato natural. Estas columnas vertebrales incluyen: PNAS (ácidos nucleicos peptídicos), fosforotioatos, fosforodiamidatos, morfolinós y otras variantes de la columna vertebral de fosfato de los ácidos nucleicos nativos. 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 purinas y pirimidinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, modificaciones que ponen nuevos grupos reactivos tales como, pero sin limitarse a ellos, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos, y haluros de alquilo. El término base abarca cualquiera de los análogos de bases conocidas de DNA y RNA. El término polinucleótido incluye ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA) y combinaciones de DNA, RNA y otros nucleótidos naturales y sintéticos.

Un polinucleótido puede ser suministrado 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 una característica fisiológica específica no asociada naturalmente con la célula.

Un inhibidor de la expresión génica basado en polinucleótido comprende cualquier polinucleótido que contiene una secuencia cuya presencia o expresión en una célula provoca la degradación o la inhibición de la función, la transcripción o traducción de un gen de una manera específica de la secuencia. Los inhibidores de expresión basados en polinucleótido pueden ser elegidos entre el grupo que comprende: siRNA, microRNA, RNA de interferencia o RNAi, dsRNA, ribozimas, polinucleótidos antisentido, y casetes de expresión de DNA que codifican RNAsi, microRNA, dsRNA, ribozimas o ácidos nucleicos antisentido. El siRNA comprende una estructura bicatenaria que típicamente contiene 15 a 50 pares de bases y preferiblemente 19 a 25 pares de bases, y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen diana expresado o RNA dentro de la célula. Un siRNA puede estar compuesto de dos polinucleótidos hibridados o un polinucleótido único que forma una estructura en horquilla. Los microRNAs (miRNA) son pequeños polinucleótidos no codificadores, de aproximadamente unos 22 nucleótidos de longitud, que dirigen la destrucción directa o la represión traduccional de sus mRNA diana. Los polinucleótidos antisentido comprenden una secuencia que es complementaria de un gen o mRNA. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero sin limitarse a ellos: morfolinós, 2'-O-metil polinucleótidos, DNA, RNA y similares. El inhibidor de la expresión basado en polinucleótido puede ser polimerizado *in vitro*, recombinante, contener secuencias quiméricas, o derivados de estos grupos. El inhibidor de la expresión basado en polinucleótido puede contener ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos, o cualquier combinación adecuada, de forma que se inhibe el RNA y/o gen diana.

*Compuesto biológicamente activo* - Un compuesto biológicamente activo es un compuesto que tiene potencial para reaccionar con los componentes biológicos. Más en particular, los compuestos biológicamente activos utilizados en esta memoria están diseñados para cambiar los procesos naturales asociados con una célula viva. Un proceso celular natural es un proceso que está asociado con una célula antes del suministro de un compuesto biológicamente activo. Los compuestos biológicamente activos incluyen productos farmacéuticos, proteínas, péptidos, polipéptidos, hormonas, citocinas, antígenos, virus, oligonucleótidos, y ácidos nucleicos.

*Transfección* - El proceso de suministro de un polinucleótido a una célula ha sido llamado comúnmente transfección, o proceso de transfección, y también se ha denominado transformación. El término transfectar se refiere a la introducción en las células de un polinucleótido u otro compuesto biológicamente activo. El polinucleótido puede ser suministrado a la célula con fines de investigación o para producir un cambio en una célula que puede ser terapéutico. El suministro de un polinucleótido para fines terapéuticos se denomina comúnmente terapia génica. La terapia génica es el suministro deliberado de material genético a células somáticas con el fin de tratar una enfermedad o de realizar una investigación biomédica. El suministro de un polinucleótido puede conducir a la modificación del material genético presente en la célula diana. La expresión transfección estable o transfectada establemente se refiere generalmente a la introducción e integración de un polinucleótido exógeno en el genoma de la célula transfectada. La expresión transfectante estable se refiere a una célula que ha integrado establemente el polinucleótido en el DNA genómico. La transfección estable puede obtenerse también usando vectores episomales que se replican durante la división celular eucariota (por ejemplo, vectores de DNA de plásmido que contienen un origen de replicación del virus de papiloma, cromosomas artificiales). La expresión transfección transitoria o transfectada transitoriamente se refiere a la introducción de un polinucleótido en una célula en la que el polinucleótido no se integra en el genoma de la célula transfectada. Si el polinucleótido contiene un gen expresable, entonces el casete de expresión se somete a los controles reguladores que gobiernan la expresión de genes endógenos en los cromosomas. La expresión transfectante transitorio se refiere a una célula que ha absorbido un polinucleótido, pero no ha integrado el polinucleótido en su DNA genómico.

## **Ejemplos**

*Ejemplo 1. Síntesis de un monómero de vinil éter.* Se preparó 2- viniloxi etil ftalimida por medio de la reacción de 2-cloroetil vinil éter (25 g, 0,24 mol) y ftalimida potásica (25 g, 0,135 mol) en DMF a 100 °C (75 ml) utilizando bromuro de tetra-n-butil amonio (0,5 g) como catalizador de transferencia de fase. Esta solución se calentó durante seis horas y luego se vertió súbitamente en agua y se filtró. Este sólido se recrystalizó después dos veces en metanol para dar cristales blancos.

*Ejemplo 2. Síntesis general de polímeros de polivinil éter activos en la membrana.* X% en moles de viniléter protegido con amina (por ejemplo, 2-etil viniloxi ftalimida) se añadieron a un matraz de fondo redondo secado en estufa bajo una protección con nitrógeno en diclorometano anhidro. A esta solución se añadió Y moles % de alquil (por ejemplo, etil, propil, butil, viniléter, seguido por Z% en moles de alquil (dodecil, octadecil) viniléter. Aunque los polímeros detallados se derivan de 2-3 monómeros diferentes, la invención no se limita a una composición específica de monómeros de vinil éter. Polímeros que comprenden más monómeros o monómeros diferentes se imaginaron fácilmente. La solución se llevó a 78 °C en un baño de acetona en hielo seco. A esta solución se añadió 10% en moles de BF<sub>3</sub>EtOEt y se dejó proceder la reacción durante 2 a 3 horas a 78 °C, y después se apagó con una solución de hidróxido amónico en metanol. El polímero se llevó a sequedad bajo presión reducida y después se llevó en 30 ml de 1,4-dioxano/metanol (2/1). Se añadieron 20 eq. mol de hidrazina por ftalimida para eliminar el grupo protector de la amina. La solución se calentó a reflujo durante 3 horas, y después se llevó a sequedad bajo presión reducida. El sólido se puso en 20 ml de HCl 0,5 M, se calentó a reflujo durante 15 minutos, se diluyó con 20 ml de agua destilada, y se calentó a reflujo durante una hora más. La solución se neutralizó después con NaOH, se enfrió a temperatura ambiente, se transfirió a tubos de celulosa de 3.500 molecular, se dializó durante 24 horas (2 x 20 L) frente a agua destilada, y se liofilizó. El peso molecular de los polímeros se estimó utilizando columnas analíticas de exclusión de tamaños de acuerdo con procedimientos estándar. Aunque los polímeros que contienen los monómeros de vinil éter indicados se describen en estos ejemplos, la presente invención no está limitada a estos monómeros particulares.

Después de la eliminación de los grupos ftalimida por tratamiento secuencial con hidrazina y HCl, los polímeros fueron transferidos a tubos de celulosa de 3.500 molecular y se dializaron durante 24 h (2 x 20 L) frente a agua destilada, y se liofilizaron. Los polímeros se disolvieron después en agua y se pusieron en una columna Sephadex G-15. Los polímeros que fueron excluidos de la columna de Sephadex G-15 se aislaron y se concentraron por liofilización. Los pesos moleculares de los polímeros se determinaron entonces mediante GPC usando columnas Eprogen Inc. CATSEC100, CATSEC300 y CATSEC1000 en serie. El tampón de desarrollo era NaCl 50 mM, 0,1% de TFA, y 10% de MeOH. Se utilizaron patrones de polivinilpiridina como curva de calibración. Los pesos moleculares de los polímeros estaban en el intervalo de 10.000 a 100.000, con la mayoría de los preparados de polímero por encima de 20.000.

*Ejemplo 3. Síntesis de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (anhídrido carboxidimetilmaleico o CDM).* A una suspensión de hidruro sódico (0,58 g, 25 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano anhidro se añadió trietil-2-fosfonopropionato (7,1 g, 30 mmol). Una vez que hubo cesado el desprendimiento de gas hidrógeno, se añadió dimetil-2-oxoglutarato (3,5 g, 20 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro, y se agitó durante 30 minutos. Se

añadió a continuación agua, 10 ml, y el tetrahidrofurano se eliminó en un evaporador rotatorio. La mezcla de sólido y agua resultante se extrajo con 3 x 50 ml de etil éter. Los extractos en éter se reunieron, se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron para dar un aceite amarillo claro. El aceite se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con éter:hexano 2:1 para dar 4 g (82% de rendimiento) de triéster puro. El anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico se formó después disolviendo este triéster en 50 ml de una mezcla 50/50 de agua y etanol que contiene 4,5 g (5 equivalentes) de hidróxido potásico. Esta solución se calentó a reflujo durante 1 hora. El etanol se separó después en un evaporador rotatorio y la solución se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico. Esta solución acuosa se extrajo después con 200 mL de acetato de etilo, que se aisló, se secó con sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido blanco. Este sólido se recristalizó después en diclorometano y hexano para dar 2 g (80% de rendimiento) de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico.

Los tioésteres, ésteres y amidas se pueden sintetizar a partir de CDM mediante la conversión de CDM en su cloruro de ácido con cloruro de oxalilo, seguida por la adición de un tiol, éster o amina y piridina.

*Ejemplo 4: Suministro de siRNA mediante la conjugación con polímero activo en la membrana por medio de un enlace lábil CDM o disulfuro.*

Conjugado de disulfuro: Se hacen reaccionar 50 ng de siRNA dirigido contra luciferasa que tenía un grupo 5'-amino en la cadena sentido, con 1 µg de N-succinimidil-S-acetiltioacetato en presencia de HEPES base pH 7,5. Separadamente, se hicieron reaccionar 50 µg de un polivinil éter sintetizado a partir de una mezcla 50/50 de amina protegida y monómeros de vinil butil éter con 5 µg de N-hidroxisuccinimida éster del ácido 3-(2-piridilditio) propiónico en presencia de HEPES pH 7,5. El siRNA modificado y el polímero modificado se reunieron entonces para permitir la unión covalente del siRNA al polímero. Después de 6 a 24 horas, el conjugado de polímero-siRNA se hizo reaccionar con 200 µg de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico en presencia de base HEPES. Las partículas fueron añadidas a una línea de células HEPA de hepatocitos de ratón que expresa de forma estable el gen de la luciferasa. Como testigo, se añadieron a las células muestras que contienen polímero modificado con CDM (sin siRNA). En las células expuestas al conjugado polímero-polinucleótido, la expresión de la luciferasa fue suprimida un 75% relativo a las células expuestas a polímero sólo, lo que indica el suministro de siRNA funcional a las células.

Conjugado CDM: Se hicieron reaccionar 50 ng de siRNA dirigido contra luciferasa que tenía un grupo 5'-amino en la cadena sentido, con 2 µg de tioéster CDM en presencia de HEPES de pH 7,9. Se añadieron al siRNA 50 µg de un polivinil éter sintetizado a partir de una mezcla 50/50 de monómeros protegidos con amina y vinil butil éter. Después de 6 a 24 horas, el conjugado de polímero - siRNA se hizo reaccionar con 200 µg de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico en presencia de base HEPES. Las partículas se añadieron a una línea celular HEPA de hepatocitos de ratón que expresa establemente el gen de la luciferasa. Como testigo, las muestras que contienen polímero modificado con CDM (sin siRNA) fueron añadidas a las células. En células expuestas al conjugado polímero - polinucleótido, la expresión de la luciferasa fue suprimida en un 86% en relación con las células expuestas a polímero sólo, lo que indica el suministro de siRNA funcional a las células.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la actividad de luciferasa después de la transfección de células HEPA-Luc usando conjugados de polímero activo en la membrana - siRNA.

Conjugación de disulfuro	Conjugación de CDM
75%	86%

*Ejemplo 5 : El suministro de fosfordiamidato morfolino oligonucleótido (PMO) a las células utilizando conjugados polímero - PMO.* Usando el entrecruzamiento basado en CDM-tioéster para enlazar siRNA y polímero, es también posible conjugar reversiblemente otros tipos de oligonucleótidos a polímeros. En particular, los autores de la presente invención estudiaron el suministro de PMO a células. Se hicieron reaccionar 5 nmoles de amino-PMO (que bloquea un sitio de ajuste mutante en el transcripto de luciferasa mutante) ya sea solo o hibridado con una cadena complementaria de DNA, con nada o con 2 µg de tioéster CDM en presencia de HEPES pH 7,9. A esto se añadieron 200 µg de polivinil éter sintetizado a partir de 50% de amino viniléter, 45% de butil viniléter y 5% de dodecilviniléter (DW550). Después de tres o más horas el polímero + PMO o conjugado de polímero-PMO se hizo reaccionar con 500 µg de CDM en presencia de HEPES para mantener el pH por encima de 7,5. Además de CDM, los conjugados se hicieron reaccionar con ésteres de PEG de CDM, que son derivados del cloruro de ácido de los monometil éteres de CDM y PEG de diversos pesos moleculares. Los conjugados se añadieron después a las células HeLa Luc/705 (Gene Tools, Philomath OR) desarrolladas bajo las condiciones usadas para las células HeLa. Las células se pusieron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 3 x 10<sup>6</sup> células por pocillo, y se incubaron durante 24 horas. El medio se reemplazó con 1,0 ml de DMEM que contiene 2,5 nmol de complejos amino-PMO. Las células se incubaron durante 4 horas en una incubadora humidificada, 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. El medio se reemplazó entonces con DMEM que contiene suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a continuación durante otras 48 h más. Después se recolectaron las células y los lisados se ensayaron entonces en relación con la expresión de luciferasa. Los resultados demuestran un mejor suministro del polinucleótido no cargado cuando el agente de transfección es un conjugado DW550 polímero poliviniléter - PMO.

Tabla 2. Suministro de polinucleótidos no cargados a las células.

Vehículo de transfección	Nº de veces de inducción de luciferasa
No unión	
DW550 + PMO solo	2
DW550 + PMO hibridado con DNA	2
<u>Conjugado polímero - PMO</u>	
DW550 - CDM - PMO solo	7,5
DW550 - CDM - PMO hibridado	10

*Ejemplo 6: La modificación postsintética, o posterior a la síntesis, de siRNA para la unión de siRNA al polímero de suministro.* Para modificar un oligonucleótido, tal como siRNA, con un tioéster, la amina puede unirse durante o después de la síntesis no enzimática. En los ejemplos anteriores, una modificación de amina fue unida durante la síntesis del polinucleótido. La modificación post-sintética se puede conseguir usando un reactivo de mostaza nitrogenada aromática (patente de EE.UU. nº 6.262.252). El acoplamiento oligonucleótido-polímero puede conseguirse mediante la modificación de un polinucleótido con una mostaza de nitrógeno aromático que contiene un grupo cisteína protegido con piridiliditio y haciendo reaccionar el grupo cisteína con un tioéster que está unido reversiblemente a un polímero, como se ilustra en la FIG. 4.

En estos ejemplos, tioésteres unidos a polímeros activos en la membrana que contienen amina se hicieron reaccionar con cisteínas en siRNAs específicos para el gen de la luciferasa, para formar los agentes de transfección de conjugado polímero - siRNA. Los tioésteres fueron unidos a los polímeros mediante enlaces maleamato lábiles al pH. Como consecuencia, los siRNAs fueron unidos a los polímeros por medio de enlaces lábiles al pH. Las aminas restantes en los polímeros se hicieron reaccionar después con CDM para alterar la carga en los polímeros e inhibir reversiblemente la actividad en la membrana de los polímeros.

Dos polímeros que contienen amina fueron unidos reversiblemente a siRNA: un polímero sintético y un péptido sintético que contiene la misma secuencia de aminoácidos que un péptido de origen natural. El polímero sintético era un poliviniléter catiónico anfifílico. La anfifilicidad se deriva de la inclusión de vinil éteres hidrófobos. En este ejemplo, el polímero unido al siRNA, DW459A, contenía una mezcla 1:1 de grupos amina y butilo (R = n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>). El péptido de origen natural era pardaxina, una toxina procedente de pescado, que tiene la secuencia GFFALIPKIISSPLFKTLSSAVGSALSSSSGEQE (SEC ID NO. 1).

*Conjugación con Polímero:* Se hicieron reaccionar 50 ng de siRNA dirigido contra luciferasa con 50 ng de cisteína *Label IT*<sup>TM</sup>. Por separado, se hicieron reaccionar 50 µg de un polivinil éter sintetizado a partir de una mezcla 50/50 de monómeros protegidos con amina y butil vinil éter, con 0, 2,5, 5, o 20 µg de CDM-tioéster mezclado con 250, 247,5, 245, o 230 µg de CDM. El aumento de los niveles de modificación de CDM-tioéster permite el aumento de las cantidades de polinucleótido a unir al polímero. El siRNA modificado con cisteína fue después añadido al polímero modificado con tioéster. Los conjugados se añadieron a una línea celular HEPA de hepatocitos de ratón que había sido transfectada con la Renilla y los genes de luciferasa de luciérnaga. Se sabe que el siRNA inhibe específicamente la expresión del gen de la luciferasa de la luciérnaga. Como testigo, las muestras que contienen polímero modificado con CDM (sin siRNA) fueron añadidas a las células. Se midieron las actividades de luciferasa de luciérnaga y Renilla y se determinó la relación de nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga y de Renilla. Una disminución en la relación relativa a células testigo no siRNA indica knockout de luciferasa de luciérnaga específica, debido al suministro de siRNA funcional.

Tabla 3. Suministro de siRNA a células de mamífero in vitro utilizando conjugados de polivinil éter - siRNA.

Porcentaje de modificación de tioéster	Porcentaje de inhibición de la luciferasa de luciérnaga
0	0,27
1	0,25
2	0,47
4	0,47
* El porcentaje en moles es relativo al número de grupos amina en DW459A	

*Conjugación con péptidos:* Se hicieron reaccionar 50 ng de siRNA dirigido contra la luciferasa de luciérnaga, con 50 ng de cisteína *Label IT*<sup>TM</sup>. Por separado, se hicieron reaccionar 50 µg de pardaxina con 0, 5, 10, o 20 µg de CDM tioéster mezclado con 250, 245, 240, o 230 µg de CDM. El aumento de los niveles de modificación de CDM-tioéster permite que se unan cantidades crecientes de polinucleótido con el polímero. El siRNA modificado con cisteína se

añadió después al péptido modificado con tioéster. Los conjugados se añadieron a una línea celular HEPA de hepatocitos de ratón que habían sido transfectadas con los genes de Renilla y de luciferasa de luciérnaga. Como testigo, las muestras que contienen polímero modificado con CDM (sin siRNA) fueron añadidas a las células. Se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga y de Renilla y se determinó la relación del nivel de expresión de la luciferasa de luciérnaga respecto a la Renilla. Una disminución de la relación relativa a células testigo sin siRNA indica knockout de la luciferasa de luciérnaga específica, debido al suministro de siRNA.

Tabla 4. Suministro de siRNA a células de mamíferos in vitro utilizando conjugados Pardaxina- siRNA.

Porcentaje en peso de modificación de tioéster *	Porcentaje de inhibición de la luciferasa de luciérnaga
0	0,23
10	0,20
20	0,47
40	0,73
* Porcentaje en peso de CDM-tioéster a pardaxina.	

Se puede observar que había una dependencia del suministro de siRNA con la cantidad de modificación con tioéster del poliviniléter y el péptido pardaxina y, por consiguiente, la unión reversible de la siRNA a los reactivos de suministro potenció la eficacia del suministro.

**REIVINDICACIONES.**

1. Composición para el suministro de un oligonucleótido a una célula, que comprende: un conjugado poliamina activa en la membrana - oligonucleótido, en el que la poliamina está unida al oligonucleótido por medio de un enlace covalente sensible al pH o lábil a disulfuro y las aminas en la poliamina están modificadas reversiblemente mediante anhídridos maleicos disustituidos.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que los anhídridos maleicos disustituidos son anhídridos dimetil maleicos sustituidos con carboxilato (CDM).
3. Composición según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la poliamina y el oligonucleótido están unidos covalentemente por medio de un tioéster de anhídrido dimetilmaleico sustituido con caboxilato (CDM).
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el oligonucleótido se elige entre el grupo que consiste en dsRNA, siRNA, microRNA, casete de expresión de siRNA, oligonucleótido antisentido y ribozima.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el oligonucleótido se modifica para contener un grupo reactivo en el término 3' o 5'.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el oligonucleótido es un oligonucleótido modificado con amina o con cisteína.
7. Composición la reivindicación según 1, en la que dos o más oligonucleótidos están unidos covalentemente a la poliamina.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la poliamina se elige entre el grupo que consiste en poliamina anfipática, polivinil éter anfipático, y péptido activo en la membrana.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el péptido activo en la membrana comprende pardaxina.
10. Método *in vitro* para suministrar un polinucleótido a una célula, que comprende:
  - (a) formar un conjugado de poliamina activa en la membrana - polinucleótido en el que la poliamina está unida al polinucleótido por medio de un enlace covalente sensible al pH o lábil a disulfuro;
  - (b) modificar reversiblemente las aminas del polímero por reacción con anhídridos maleicos disustituidos, preferentemente anhídridos dimetilmaleicos sustituidos con carboxilato (CDM); y
  - (c) poner en contacto la célula con el conjugado.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la poliamina y el oligonucleótido están unidos covalentemente por medio de un tioéster de anhídrido dimetilmaleico sustituido con carboxilato (CDM).
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento mediante terapia génica o terapia antisentido.

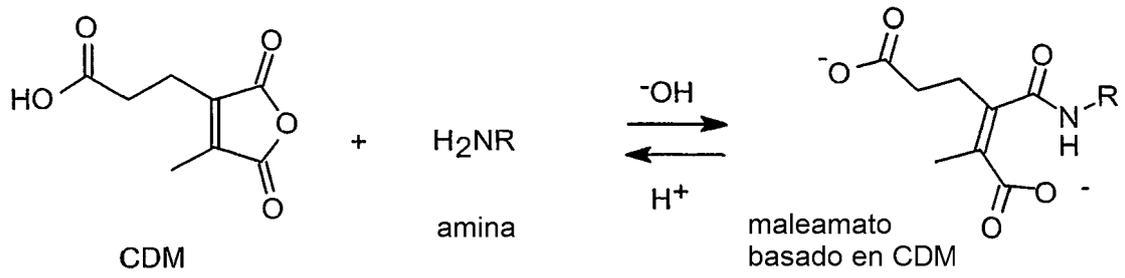


FIG. 1

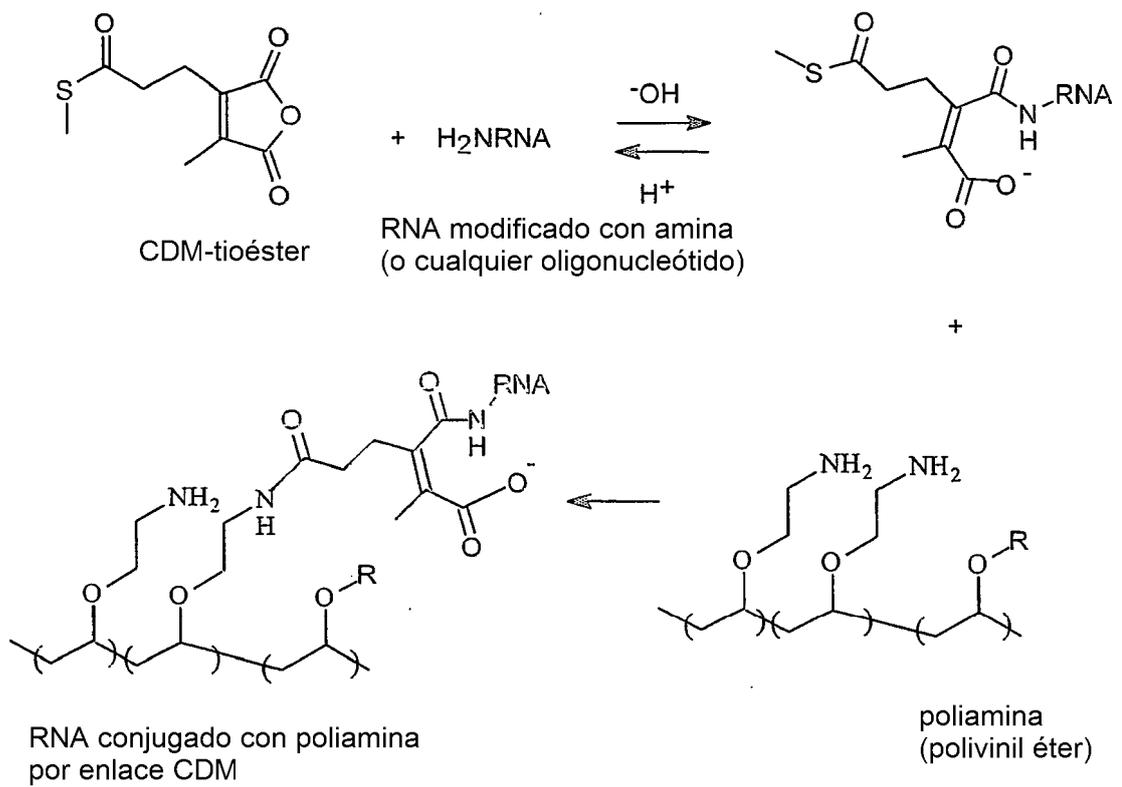


FIG. 2

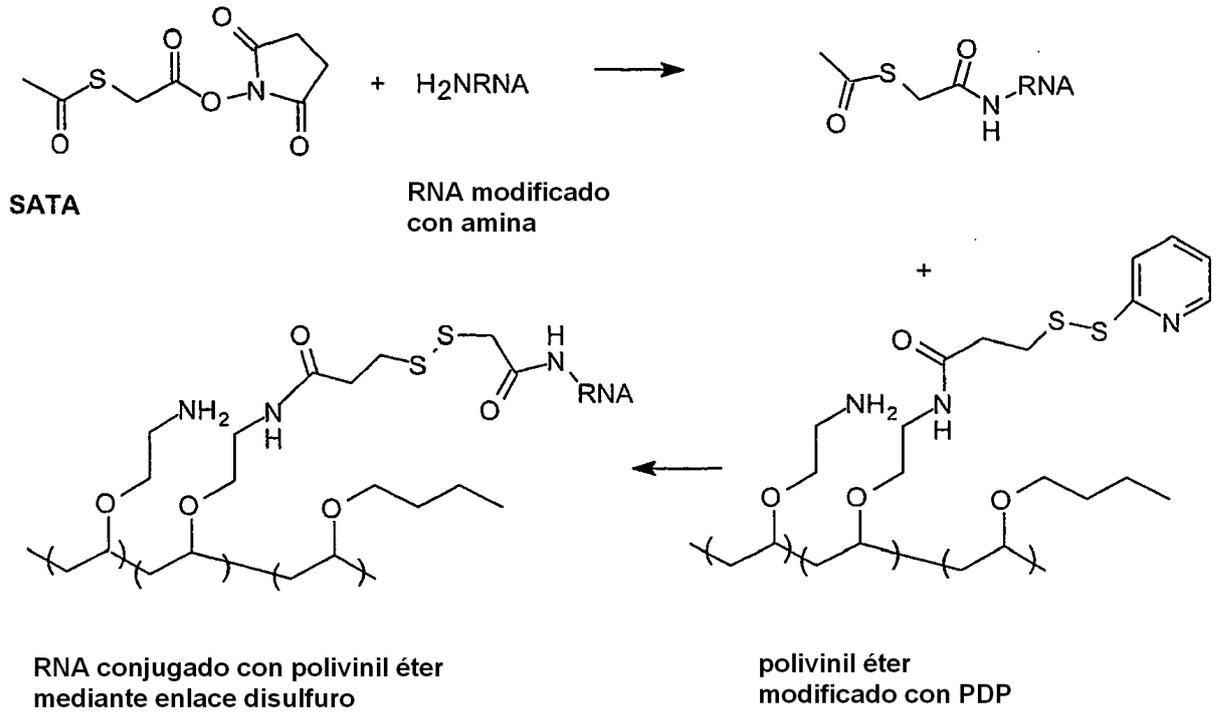


FIG. 3

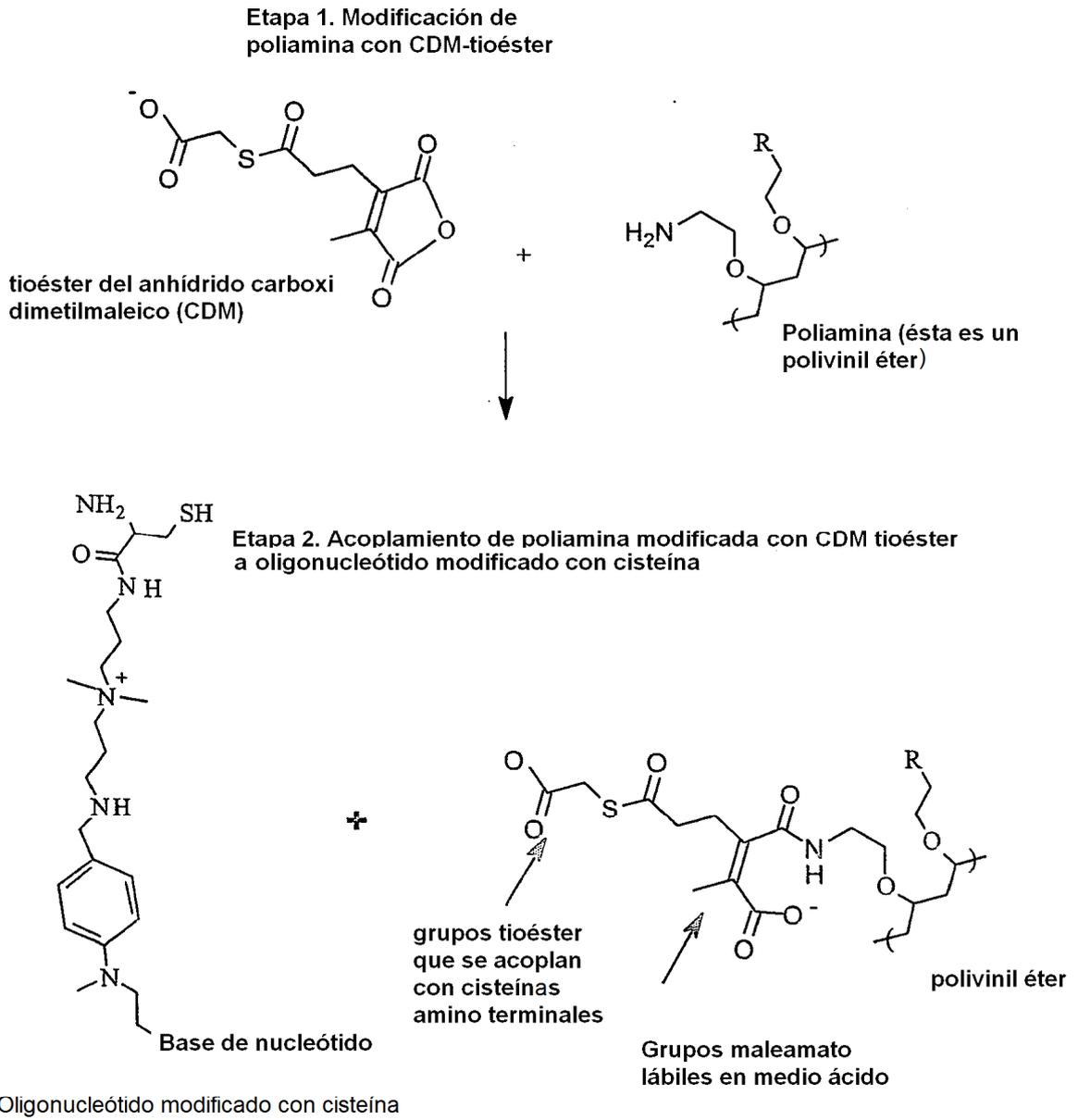


FIG. 4