

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 214**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.1997 E 97908818 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **23.12.1998 EP 0885002**

54 Título: **Materiales y métodos para aumentar la internalización celular**

30 Prioridad:

04.03.1996 US 12721 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2013

73 Titular/es:

**THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)
207 OLD MAIN BUILDING
UNIVERSITY PARK, PA 16802, US y
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**EDWARDS, DAVID A.;
DEAVER, DANIEL R. y
LANGER, ROBERT S.**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 214 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

Campo de la Invención

[0001] Las composiciones y métodos de uso aquí descritos están en el área de materiales y métodos para aumentar la penetración celular.

5 **Antecedentes de la Invención**

[0002] Es a menudo difícil administrar compuestos tales como proteínas, péptidos, material genético, y otros medicamentos y compuestos diagnósticos intracelularmente porque las membranas celulares a menudo resisten el paso de estos compuestos. Varios métodos han sido desarrollados para administrar agentes intracelularmente. Por ejemplo, ha sido administrado material genético dentro de células in vivo, vitro y ex vivo usando vectores virales, ADN/complejos lípidos y liposomas. Mientras que los vectores virales son eficientes, permanecen interrogantes en referencia a la seguridad de un vector vivo y al desarrollo de una respuesta inmune después de administración repetida. Los complejos lípidos y liposomas resultan menos efectivos al transfectar ADN dentro del núcleo de la célula y pueden ser potencialmente destruidos por macrófagos in vivo.

[0003] Las proteínas y los péptidos son típicamente administrados por administración parenteral, o, en algunos casos, en la membrana mucosa nasal. La absorción de los medicamentos administrados tópicamente es frecuentemente pobre, y la degradación ocurre con frecuencia cuando los medicamentos son administrados oralmente. Por ejemplo, hormonas tales como la hormona de liberación de la gonadotropina ("GnRH") y sus análogos han sido administrados a humanos en un intento de incrementar la fertilidad incrementando los niveles sistémicos de la hormona luteinizante ("LH"). Cuando dada a menudo, se ha mostrado que pequeñas dosis de GnRH nativa inducen el desarrollo folicular y la ovulación. Estos medicamentos son típicamente administrados por medio de un catéter permanente dentro de la cavidad abdominal. Se adjunta al catéter una bomba externa que inyecta el péptido a intervalos frecuentes. Este método de administración es extremadamente invasivo e indeseado. También, el método es prohibitivamente caro para el uso en animales.

[0004] La unión de ligandos o proteínas de ensamblaje a los receptores de superficie de las membranas de células eucarióticas ha sido extensamente estudiada en un esfuerzo de desarrollar mejores modos de promover o aumentar la absorción celular. Por ejemplo, se ha informado que la unión de ligandos o proteínas inicia o acompaña una cascada de fenómenos sin equilibrio culminando en la invaginación celular de complejos de membrana dentro de vesículas recubiertas por aparente [Goldstein, J.L., et al. (1983) Ann. Rev. Cell Biol. 1, 1-39; Rodman, T.S., et al. (1990) Curr. Op. Cell Biol. 2, 664-672; Trowbridge, I.S. (1991) Curr. Op. Cell Biol. 3, 634-641; Smythe, E., et al. (1989) J. Cell Biol. 108, 843-853; Smythe, E., et al. (1992) J. Cell Biol. 119, 1163-1171; and Schmid, S.L. (1993) Curr. Op. Cell Biol. 5, 621-627]. Se hace referencia a este proceso como endocitosis mediada por receptor (RME). Más allá de jugar un papel central en el tráfico del lípido celular [Pagano, R.E. (1990) Curr. Op. Cell Biol. 2, 652-663], RME es el medio principal por el cual las macromoléculas entran en las células eucarióticas. Tener un mejor entendimiento del papel del RME en la absorción de los medicamentos sería ventajoso para desarrollar métodos mejorados de administración de medicamentos.

[0005] Sería ventajoso tener nuevos métodos para administrar un GnRH y sus análogos intracelularmente. Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar composiciones y métodos para aumentar la administración intracelular de GnRH y sus análogos.

[0006] Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar métodos menos invasivos de administración.

40 **Resumen de la Invención**

[0007] Se revelan composiciones y métodos para aumentar la penetración celular de GnRH y sus análogos. Las composiciones incluyen un compuesto para ser administrado y un hidrogel viscoso biocompatible. Controlando la viscosidad aparente del material viscoso se aumentan las velocidades de endocitosis ("RME"), incluyendo la "pinocitosis" inespecífica y la endocitosis específica mediada por receptor ("RME"). La velocidad de penetración endocítica aumenta cuando el cociente de las viscosidades aparentes del medio citosólico y extracelular se aproxima a la unidad. Esto lleva a altas velocidades de transporte de los compuestos a ser administrados por las membranas celulares, facilitando una administración más eficiente de los medicamentos y agentes diagnósticos.

[0008] La viscosidad aparente de la composición es controlada de tal modo que se mantiene en el intervalo de entre 10 y 200 Poise, por ejemplo entre 50 y 200 Poise (1 poise = 0.1 N n⁻² s).

[0009] Las composiciones se aplican a las membranas celulares para alcanzar velocidades elevadas de transporte de medicamentos por esas membranas, respecto a cuando se usan fluidos no viscosos. Los métodos para administrar las composiciones incluyen la aplicación de forma tópica o por inyección. Las composiciones pueden ser aplicadas por vía oral, nasal, vaginal, rectal y ocular. Las composiciones pueden ser aplicadas por inyección por medio de un catéter, intramuscularmente, subcutáneamente, o intraperitonealmente. Las composiciones pueden ser también administradas al sistema pulmonar o respiratorio, más preferiblemente en un aerosol.

[0010] Los ejemplos demuestran la administración de transferrina a células individuales para aumentar el índice de absorción de transferrina y la administración intravaginal de leuprolida para incrementar los niveles de LH en ovejas. La transferrina es un polipéptido modelo. Las composiciones conteniendo transferrina no son realizaciones en sí mismas de la invención reivindicada.

5 Descripción de los Dibujos

[0011]

10 La Figura 1 muestra la viscosidad aparente respecto al esfuerzo cortante aplicado para varias soluciones de methocel (0, 1, 1.25, 1.5, 1.7, y 1.8%). Se muestra un valor característico de la viscosidad celular. Las líneas discontinuas verticales estiman los valores de la máxima y mínima fuerza administrada por una célula sobre el fluido extracelular por conductos invaginantes.

La Figura 2 muestra valores en régimen permanente de ^{125}I -Tf internalizado total respecto a ^{125}I -Tf total asociado a superficie (In/Sur) para células K562 suspendidas en soluciones de methocel de concentraciones de methocel variables entre 0 y 2%. Las barras de error representan el error medio estándar, con $n=4$.

15 La Figura 3 muestra valores en régimen permanente de ^{125}I -Tf internalizado total respecto a ^{125}I -Tf total asociado a superficie (In/Sur) para células CHO suspendidas (línea superior con bloques abiertos) y adherida (línea inferior con bloques cerrados) en soluciones de methocel en concentraciones de methocel variables. Las barras de error representan el error estándar medio, con $n=4$.

La Figura 4 muestra la concentración sistémica de LH después de la administración intravaginal a ovejas de leuprolida en soluciones de methocel al 1.5% y 1.75 % .

20 La Figura 5 muestra la biodisponibilidad absoluta de la leuprolida (biodisponibilidad en porcentaje) de sistemas de administración de hidrogel optimizadoreológicamente (methocel al 1.5 y 1.75 %) comparada con un sistema de administración de hidrogel de control.

La Figura 6 muestra la concentración sistémica de LH después de la administración nasal de 100 μg de acetato de leuprolida en methocel 1.5% y methocel 0.0% (control solución salina) a ovejas.

25 La Figura 7 muestra la concentración sistémica de cortisol (ng/mL) después de administración intravenosa e intravaginal de vasopresina a ovejas. Los círculos oscurecidos representan administración IV (10 microgramos de vasopresina) sin un vehículo viscoso. Los círculos vacíos representan el control, sin gel viscoso o vasopresina. Los triángulos oscurecidos representan la administración intravaginal de 200 μg de vasopresina en 1.5 % de methocel. Los triángulos vacíos representan la administración intravaginal de 200 μg de vasopresina en methocel 1.75 % .

Descripción Detallada de la Invención

35 **[0012]** Se describen composiciones y métodos para la absorción mejorada de una administración intracelular de compuestos en una solución viscosa. La penetración celular es mejorada incrementando la velocidad de endocitosis, particularmente la endocitosis mediada por receptor, controlando la viscosidad de la solución. Las composiciones incluyen GnRH o un análogo de la misma y un fluido con una viscosidad aparente del fluido citosólico en la célula a la que se administra la composición.

[0013] GnRH y sus análogos interactúan con los receptores sobre la superficie de la célula a la cual tiene que ser administrada.

Composiciones

40 **[0014]** La unión de ligandos o proteínas de ensamblaje a los receptores de superficie de las membranas celulares eucarióticas inicia o acompaña una cascada de fenómenos sin equilibrio culminando en la invaginación celular de los complejos de membrana dentro de vesículas recubiertas por clatrina. Este proceso es conocido como endocitosis mediada por receptor (RME). RME es el medio principal por el cual diversos tipos de moléculas bioactivas, particularmente macromoléculas, se introducen en las células eucarióticas.

45 **[0015]** La investigación por otros se ha enfocado principalmente en la identificación y caracterización bioquímica de las primeras y últimas etapas de RME, que abarcan desde la formación de una fosa recubierta de clatrina hasta la recuperación brusca de una vesícula recubierta. La determinación de las composiciones y los métodos para administrar intracelularmente los compuestos aquí descritos implicaba centrarse en un diferente aspecto de RME, el proceso en el que se forma inicialmente una depresión de membrana al comienzo de RME (es decir el mecanismo por el que ocurre un impulso espontáneo de la membrana celular hacia el citosol). Este proceso es referido aquí como la "etapa de nucleación" del RME. Esta terminología pretende enfatizar que la fuerza conductora para el impulso espontáneo de la membrana hacia el citosol está relacionado con la energía liberada por una o más de muchas posibles reacciones exotérmicas de unión de membrana, por ejemplo, la unión de ligando al receptor, que precede o acompaña la formación de una depresión de la membrana.

- 5 **[0016]** Las membranas celulares están unidas desde el exterior por fluido extracelular y desde el interior por fluido citosólico. Los fluidos inter y extracelulares poseen diferentes propiedades físicas, tales como densidad y viscosidad de fluido, cuyos valores se extienden hasta la superficie de la membrana donde sufren discontinuidades. La membrana en si misma posee propiedades únicas de equilibrio y no equilibrio. Una propiedad importante cuando se considera la administración intracelular es la tensión de la membrana (la energía libre de la membrana por unidad de superficie de área). La tensión de la membrana es generalmente uniforme y positiva en una membrana en equilibrio y puede ser medida por experimentos rutinarios de micropipeta. Los valores de tensión de la membrana de los que más se ha informado han sido reunidos para células rojas sanguíneas, y van desde 4 dinas/cm a 0.01 dinas/cm. En comparación, la tensión interfacial de una interfaz aire/agua es de 73 dinas /cm. La tensión de la membrana puede variar de punto a punto sobre la superficie de la membrana como consecuencia de varios estímulos, tales como calentamiento no uniforme de la membrana, reacciones químicas de la membrana y cambios composicionales de la membrana. Estas variaciones pueden dar lugar a movimiento de la membrana y de la masa de fluido, denominado convección de Marangoni. Este movimiento esta caracterizado en su mayor parte por las viscosidades (aparentes) citosolicas y extracelulares.
- 10
- 15 **[0017]** Pueden tener lugar reacciones exotérmicas sobre la membrana celular, debido a la unión receptor/ligando, la unión membrana/adaptador, la unión membrana/clatrina, una combinación de estas reacciones de unión, y otras reacciones de la membrana. Las reacciones exotérmicas causan la tensión de membrana (energía por área de la membrana), al menos momentáneamente, para disminuir en el punto donde la reacción sucedió. A medida que se reduce la tensión de membrana, las energías potenciales configuracionales e intermoleculares de los complejos moleculares unidos con la membrana tambien se reducen.
- 20
- [0018]** La tensión de la membrana celular es no uniforme espacialmente como consecuencia de las reacciones exotérmicas (es decir, formación del complejo de membrana), resultando en movimiento de la membrana. Este movimiento poseerá un componente sustancial hacia el citosol celular mientras la viscosidad citosólica exceda la del fluido extracelular.
- 25 **[0019]** Este movimiento de la membrana causa deformación de la membrana, un suceso resistido por la tensión de la membrana. Cuando las diferencias entre las viscosidades aparentes del fluido citosólico y el fluido extracelular son extremadamente grandes, la deformación de la membrana es fuertemente resistida y el impulso inicial de la membrana es amortiguado. Sin embargo, a medida que las diferencias entre las viscosidades aparentes del fluido citosólico y el fluido extracelular se vuelven extremadamente pequeñas, la deformación de la membrana se vuelve progresivamente rápida.
- 30 **[0020]** Por lo tanto, la velocidad de endocitosis puede aumentarse ajustando la viscosidad del fluido extracelular de tal modo que sea aproximadamente la mismo que la del fluido citosólico. Si la viscosidad del fluido extracelular es apreciablemente superior o inferior que la del fluido citosólico, la velocidad de endocitosis se reduce. Esto fue mostrado experimentalmente en el Ejemplo 1 y la Figura 3, en los cuales la proporción de los compuestos que se internalizaron a los que permanecieron en la superficie (In/Sur) aumentó cuando la viscosidad del fluido extracelular aumentaba, hasta un punto en el cual la viscosidad se aproximaba a la del fluido citosólico. Por encima de ese valor, la proporción decrecía.
- 35 **[0021]** El agrupamiento de los complejos de membrana es favorable para la rápida penetración. La velocidad de penetración puede aumenarse en proporción a la magnitud de energía de unión. Esto se debe, en parte, a la especificidad de los receptores a particulares ligandos y/o proteínas adaptadoras.
- 40 **[0022]** El agrupamiento de complejos sucede en las inmediaciones de las fosas a los que se absorben triskelions de clatrina desde el lado citosólico de la membrana celular y posteriormente se polimerizan para formar una cobertura de clatrina. También ha sido observado agrupamiento en las inmediaciones de las caveolas, o fosas no cubiertas con clatrina. La depresión de la tensión en la membrana que sucede en la veindad de una fosa evolucionante, originada en el proceso de complejación de la membrana, es directamente proporcional al número de complejos de membrana formados dentro de esa fosa. En general, se ha encontrado que los complejos agrupados internalizan sustancias más rápidamente que los complejos no agrupados.
- 45 **[0023]** Se ha encontrado que las magnitudes del agrupamiento del receptor y diferencia de la viscosidad aparente alteran cada una la velocidad de RME. La tensión de la membrana puede ser también manipulada para influenciar la velocidad de RME. Aumentar la tensión de la membrana "endurece" la membrana celular, haciendo la depresión de la membrana celular crecientemente prohibitiva. Este fenómeno ha sido comentado por Sheetz, M.P. and Dai, J. (1995), presentado en el 60 Simposio Anual de Cold Spring Harbor sobre la Proteína Kinasa, Cold Spring Harbor, N.Y., en base a estudios que muestran una velocidad incrementada de endocitosis para los conos de crecimiento neuronal coincidiendo con la reducción de tensión de membrana.
- 50 **[0024]** Por lo tanto, la velocidad de internalización puede ser aumentada a) ajustando la viscosidad del fluido extracelular para aproximarse a la del fluido citosólico; b) formando complejos del material a ser internalizado; y c) reduciendo la tensión de membrana. Composiciones y métodos para incrementar la velocidad de endocitosis se describen en detalle abajo.
- 55

A. Hidrogeles Viscosos

[0025] Fluidos viscosos adecuados para usarse en administración intracelular de compuestos de acuerdo con la invención incluyen hidrogeles biocompatibles.

5 **[0026]** Un hidrogel se define como una sustancia formada cuando un polímero orgánico (natural o sintético) es reticulado por medio de enlaces covalentes, iónicos, o hidrógenos para crear una estructura reticular abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Ejemplos de materiales que pueden ser usados para formar un hidrogel incluyen polisacáridos, proteínas y polímeros sintéticos. Ejemplos de polisacáridos incluyen celulosas tales como metilcelulosa, dextranos, y alginato. Ejemplos de proteínas incluyen gelatina y ácido hialurónico. Ejemplos de polímeros sintéticos incluyen tanto polímeros biodegradables como no degradables (aunque los polímeros biodegradables son preferidos), tales como alcohol polivinílico, poliacrilamida, polifosfacinas, poliacrilatos, polioxietileno, y copolímeros bloque de polioxialquileno ("poloxámeros™") tales como Pluronics™ o Tetronics™ (copolímeros bloque de polioxietileno-polipropilenglicol).

10 **[0027]** En general, estos polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como soluciones salinas tamponadas, o soluciones acuosas de alcohol. Varios de estos tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden ser reaccionados con cationes son polifosfacenos, ácidos poliacrílicos, ácidos poli (met)acrílicos, acetato de polivinilo, y polímeros sulfonados, tal como poliestireno sulfonado. Los copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros éter vinílico pueden ser también usados. Ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferiblemente fluorado) grupos de alcohol, grupos fenólicos OH, y grupos ácidos OH.

15 **[0028]** Ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden ser reaccionados con aniones son aminas de polivinilo, polivinilpiridina, polivinilimidazol, polivinilpirrolidona y algunos polifosfacenos imino sustituidos. El amonio o sal cuaternaria de los polímeros puede también formarse a partir de grupos iminos colgantes o nitrogénos de esqueleto. Ejemplos de los grupos laterales básicos son los grupos amino e imino.

20 **[0029]** El alginato puede ser reticulado iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Una solución acuosa que contiene el agente a ser administrado puede ser suspendida en una solución de un polímero soluble en agua, y la suspensión puede estar formada en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes. Opcionalmente, la superficie de las microcápsulas puede ser reticulada con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

25 **[0030]** Los polifosfacenos adecuados para reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y capaces de formar puentes salinos con cationes di o trivalentes. Ejemplos de grupos laterales ácidos preferidos son grupos de ácido carboxílico y grupos de ácido sulfónico. Los polifosfacenos hidrolíticamente estables están formados de monómeros con grupos laterales de ácido carboxílico que están reticulados por cationes divalentes o trivalentes tales como Ca^{2+} o Al^{3+} . Los polímeros pueden ser sintetizados que se degradan por hidrólisis incorporando monómeros con grupos laterales de imidazol, éster aminoácido, o glicerol. Por ejemplo, puede ser sintetizado un fosfaceno polianiónico poli [bis(carboxilatofenoxi)] (PCPP), el cual se reticula con cationes multivalentes disueltos en medio acuoso a temperatura ambiental o por debajo para formar matrices de hidrogel.

30 **[0031]** Los métodos para la síntesis de los polímeros descritos arriba son conocidos para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, E. Goethals, editor (Pergamen Press, Elmsford, NY 1980). Muchos de estos polímeros están comercialmente disponibles.

35 **[0032]** Los hidrogeles preferidos incluyen redes de polímeros con rellenos acuosos compuestos de celulosas como metilcelulosa, dextranos, agarosa, alcohol polivinílico, ácido hialurónico, poliacrilamida, polioxietileno y polímeros de polioxialquileno ("poloxámeros"), especialmente copolímeros bloque de polioxietileno- polipropilenglicol, como se describe en la Patente US N°. 4,810,503. Diversos poloxámeros están comercialmente disponibles de BASF y de Wyandotte Chemical Corporation como "Pluronics". Están disponibles en pesos moleculares medios de a partir de 1100 hasta casi 15.500.

40 **[0033]** La viscosidad aparente del fluido extracelular (la composición) debe ser aproximadamente igual a la viscosidad del fluido citosólico en la célula a la que los compuestos tienen que ser administrados. De acuerdo con la invención, la viscosidad aparente es 10-200 Poise (1 a 20 Pa.s). Un experto en la técnica puede fácilmente determinar o llegar a una estimación razonable de la viscosidad del fluido citosólico usando un viscosímetro y midiendo la tensión aplicada dividida por la velocidad de deformación medida a la tensión aplicada que corresponde a la tensión que la membrana celular imparte sobre los fluidos citosólicos y extracelulares durante la endocitosis. Los métodos para medir la viscosidad citosólica incluyen métodos de micropipeta (Evans and Young, Biophys. J., 56:151-160 (1989)) y métodos que implican el movimiento de coloides ligados a membrana (Wang et al., Science, 260: 1124-1126 (1993)). Viscosidades típicas de citosol, medidas por estas técnicas, van de aproximadamente 50-200 Poise. Una vez es medido este valor, la viscosidad de la composición puede ser ajustada para que sea 10-200 Poise, cuando se mide usando un reómetro de tensión controlada a 37°C usando un geometría de platina cónica, a la tensión aplicada que corresponde a la tensión

que la membrana celular imparte sobre los fluidos citosólicos y extracelulares durante la endocitosis (es decir 1 a 100 Pa).

[0034] La viscosidad puede ser controlada por medio de cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. El método para obtener una composición viscosa con la viscosidad aparente deseada no está particularmente limitado ya que es el valor de la viscosidad aparente relativa a las células objetivo la que es crítica. La viscosidad aparente puede estar controlada ajustando el contenido de disolvente (es decir, agua), tipos de materiales, fuerza iónica, pH, temperatura, química de polímeros o polisacáridos realizada sobre los materiales, y/o campos eléctricos, de ultrasonidos, o magnéticos externos, entre otros parámetros.

[0035] La viscosidad aparente de las composiciones es controlada de tal modo que está en el intervalo entre 10 y 200 Poise, preferiblemente entre 50 y 200 Poise. La viscosidad aparente es medida por un reómetro estándar usando un intervalo de tensión aplicada de entre 1 y 100 Pascales

[0036] La composición puede ser administrada como una formulación sólo ligeramente viscosa que se vuelve más viscosa en respuesta a una afección en el cuerpo, tal como temperatura corporal o estímulo fisiológico, como iones de calcio o pH, o en respuesta a una condición aplicada externamente, tal como ultrasonidos o campos eléctricos o magnéticos. Un ejemplo es un poloxámero sensible a la temperatura el cual aumenta en viscosidad a temperatura corporal.

[0037] Los siguientes son ejemplos de intervalos de concentración adecuados: soluciones de metilcelulosa (methocel) en el intervalo entre 1.0 y 2.0% (p/p), soluciones de alcohol polivinílico entre 5 y 15% y soluciones de ácido plurónico entre 15 y 20%

Métodos de Administración

[0038] Las composiciones pueden ser aplicadas tópicamente a la vagina, recto, nariz, ojos, oídos, boca y el sistema respiratorio o pulmonar, o sistémicamente a otros tipos de células, es decir, por administración intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. Preferiblemente, las composiciones son aplicada directamente a la célula epitelial a la que va a ser administrado el compuesto.

[0039] Las composiciones son particularmente ventajosas para terapia hormonal. Al administrar una composición que contiene GnRH o sus análogos por las membranas vaginales o nasales, las composiciones pueden ser usadas para tratar una variedad de trastornos basados en hormona humana. Los Ejemplos 2 y 3 demuestran la eficacia de las composiciones para incrementar los niveles de LH cuando una composición incluyendo leuprolida fue aplicada a las membranas vaginal o nasal.

[0040] Se espera que la dosis variará dependiendo de diversos factores, incluyendo el paciente, el compuesto bioactivo particular a ser administrado, y la naturaleza de la afección a tratar, entre otros factores. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar una cantidad efectiva del compuesto o compuestos bioactivos para administrarse a un paciente que los necesite.

[0041] Las composiciones son administradas a las células para aumentar la velocidad del transporte del medicamento por las membranas celulares, respecto a la velocidad de administración cuando se usan fluidos no viscosos. Ejemplos de métodos de administración incluyen la administración oral, como en una formulación líquida o dentro de alimentos sólidos, administración tópica a la piel o la superficie del ojo, administración intravaginal, administración rectal, administración rectal, administración intranasal, administración por inhalación, administración por catéter, y administración por inyección intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea.

[0042] Cuando la composición es administrada oralmente o por inhalación, se prefiere que se administre como un polvo seco que incluye un hidrogel hinchable que está diseñado para hincharse hasta una viscosidad apropiada tras administrarse a la localización deseada. Tras la inhalación, por ejemplo, el hidrogel absorbe agua para obtener la viscosidad deseada y entonces administra agentes al sistema respiratorio. Cuando se administra oralmente, puede seleccionarse un hidrogel que no absorba agua bajo condiciones presentes en la tráquea tract superior gastrointestinal, pero el cual no absorbe agua bajo condiciones presentes en el tracto gastrointestinal superior (por ejemplo, a un pH mayor que unos 6.5). Tales hidrogeles son bien conocidos por los expertos en la técnica. El uso de tales composiciones puede optimizar la administración de agentes al tracto inferior gastrointestinal.

Métodos para Reducir o Aumentar la Tensión de Membrana.

[0043] La eficiencia del método puede aumentarse reduciendo la tensión de membrana. Métodos adecuados para reducir la tensión de membrana incluyen incluir un agente superficial activo biocompatible en el hidrogel, realizar reacciones exotérmicas en la superficie celular (es decir, formación de complejo), y aplicar un campo externo a la superficie celular. Agentes superficiales activos biocompatibles adecuados incluyen surfactina, trehalosa, ácidos grasos tales como palmitina y ácido oleico, polietilenglicol, hexadecanol, y fosfolípidos tales como fosfatidilcolinas y fosfatidilglicerol. Reacciones químicas formadoras de complejos adecuadas incluyen la reacción de ligandos de unión con el receptor con receptores de superficie celular para estos ligandos, reacciones exotérmicas tales como suceden entre el salicilato de sodio y ácido salicílico, y reacciones de neutralización como entre el ácido clorhídrico y amoníaco

(Edwards et al. 1996 Biophys. J. 71, 1208-1214). Campos externos que pueden ser aplicados a una superficie celular para reducir la tensión de la membrana incluyen ultrasonidos, campos eléctricos, y haces de luz concentrados, tal como haces láser.

Métodos para Causar el Agrupamiento de Receptores

- 5 **[0044]** La velocidad de internalización celular puede también aumentarse causando el agrupamiento de receptores sobre la membrana celular. Esto puede lograrse, por ejemplo, creando zonas sobre la membrana donde la tensión de membrana sea relativamente alta, haciendo que el fluido de la membrana fluya hacia la zona de alta tensión de la membrana. Este flujo puede llevar los receptores localizados en la membrana uno hacia el otro, provocando que se agrupen.
- 10 **[0045]** Los criterios para evaluar la respuesta a modalidades terapéuticas empleando un compuesto identificado son dictados por la afección específica y generalmente seguirán prácticas médicas normales. Tal evaluación puede ser hecha determinando si hay un efecto deseado, tal como la expresión de una molécula nucleotídica, la producción de una proteína, o un efecto fisiológico consecuente. Donde se sabe o se sospecha que el compuesto administrado implica la función o expresión de otra molécula involucrada en una situación de enfermedad, la eficacia de la administración del compuesto puede ser evaluada midiendo los cambios en las características de la situación de enfermedad.
- 15 **[0046]** Las composiciones y métodos de uso de las mismas aquí descritos serán más claramente comprendidos con referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Hidrogeles Viscosos con Viscosidad Óptima para Internalización Celular

Materiales y Métodos

- 20 **[0047] Reactivos.** Transferrina humana etiquetada ¹²⁵I se compró de Amersham (Arlington Heights IL). Todos los demás productos químicos, incluyendo apo-transferrina humana y metilcelulosa (PM = 80 KDa), fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO).
- 25 **[0048] Cultivo Celular y Preparación.** Células K562 de eritroleucemia humana se cultivaron en un medio de RPMI-1640 complementado con 50 unidades/mL de penicilina, 0.05 mg/mL de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, y 10% de suero fetal bovino. Células ováricas de hamster chino (CHO) transfectadas con el receptor humano de transferrina, un regalo generoso del Dr. Timothy McGraw (Columbia University, New York, NY), fueron cultivadas en medio McCoy 5A complementado con 50 unidades/mL de penicilina, 0.05 mg/mL de estreptonigrina, 2 mM de L-Glutamina, y 5 % de suero fetal bovino.
- 30 **[0049]** Inmediatamente antes de cada experimento, todas las células fueron lavadas dos veces con 40 mL de buffer helado (25 mM de Hepes, 150 mM NaCl, 1mg/mL de dextrosa, y 1 mg/mL de albúmina de suero bovino, pH 7.4), y centrifugadas a 600 g a 4°C durante 10 minutos.

Preparación y Caracterización de Metilcelulosa

- 35 **[0050]** Se hicieron soluciones de metilcelulosa en buffer con la técnica de dispersión formulada por Dow Chemical Co. para alcanzar una concentración final de 0.0 a 1.8%. Brevemente, tras calentar un tercio del volumen del buffer a 90°C, se añadió polvo de metilcelulosa al líquido y se agitó hasta que las partículas estaban empapadas a conciencia y dispersadas de forma muy igualada. El resto del buffer se añadió entonces a la metilcelulosa a 4°C. La agitación se mantuvo a 4°C durante otros 20 minutos. Un día antes de los experimentos, se añadió de transferrina etiquetada ¹²⁵I (0.03 µCi/mL) y transferrina no etiquetada (50 nM) a cada concentración de la solución de metilcelulosa y se mezclaron meticulosamente.
- 40 **[0051]** La viscosidad aparente de las soluciones de methocel era medida en un reómetro de tensión controlada (TA Instruments CSL-500) usando una geometría de platina cónica. Todos los datos mostrados en la Figura 1 han sido obtenidos reduciendo exponencialmente la tensión externamente impuesta a un ritmo constante desde 100 Pa a 1 Pa.

Endocitosis

- 45 **[0052]** Las proporciones eficientes en régimen permanente de la transferrina total internalizada respecto a la transferrina unida a superficie se determinaron como sigue: a 4°C, 2 x 10⁶ células fueron resuspendida en 1 mL de solución de metilcelulosa (concentración desde 0.0 hasta 1.8%) conteniendo transferrina radioetiquetada y no etiquetada. Se usó una pipeta pasteur para mezclar suavemente las células y la solución de metilcelulosa. Inmediatamente después de calentarse en un baño de agua a 37°C durante 5 minutos, las muestras fueron transferidas a una campana térmica a 37°C, donde se mantuvo una rotación lenta de las muestras. Tras 1 hora, la endocitosis se finalizó por adición rápida de 12 mL de solución salina helada equilibrada de Hank (HBSS), seguida de 3 lavados más de 12 mL de HISS helado y centrifugación posterior (1200 g a 4°C). Tras lavarse, las células se dividieron en dos volúmenes iguales. Las células de ambos juegos de alíquotas se granularon. Las muestras del primer juego se contaron con un contador gamma (modelo 1274 Ria Gamma, LKB Wallac. Finlandia) para obtener la radioactividad total. Los niveles de radioactividad internos (In) y de superficie (Sur) se determinaron usando el método de Schonhorn et al.

[Schonhorn, J.E. and Wessling-Resnick, M. (1994) *Molecular and Cellular Biochem.* 135, 159-169]. Brevemente, los gránulos se incubaron con 0.5 mL de solución de tripsina (25 mM Hepes, 150 mM NaCl con 1mg/mL de tripsina bovina, pH 7.4) a 4°C. Los supernatantes y los gránulos se separaron centrifugándose a 3000 g a 4°C durante 15 minutos. Se usaron 2 mL de HBSS para lavar los gránulos. Los gránulos finales se contaron en un contador gamma para dar el valor In, mientras que los supernatantes de cada lavado se combinaron para dar el valor Sur.

[0053] Los valores de internalización se representaron en la forma de la radioactividad total internalizada (In) dividida por la radioactividad total unida a superficie (Sur) por millón de células, aquí definidos como régimen permanente In/Sur. Valores en régimen permanente de In/Sur para células de un tipo dado en el medio de methocel variable proporcionan estimaciones relativas de la velocidad de endocitosis para la endocitosis mediada por Tf, particularmente cuando es asumido que los índices de reciclaje de Tf son independientes de la reología del medio extracelular. La regulación hacia abajo de los números receptores Tf ligados a superficie no se espera durante la duración de los experimentos dada el reciclaje preferencial de los receptores de Tf a la superficie celular después de la internalización.

El papel de la viscosidad extracelular sobre la velocidad de la endocitosis

[0054] Como aquí se ha discutido, la viscosidad de los fluidos extracelulares influye en la velocidad neta de endocitosis. El control de la viscosidad extracelular afecta la internalización en régimen permanente del receptor Tf (unido a 125 I - Tf) en células K562, una línea celular de eritroleucemia humana que ha sido comúnmente empleada en estudios de endocitosis mediada por Tf [Schonhorn, J.E. and Wessling-Resnick, M. (1994) *Molecular and Cellular Biochem.* 135, 159-169], y puede también afectar la endocitosis mediada por Tf en células CHO (ovario de hamster chino) transfectadas con el receptor de transferrina humano [McGraw, T.E., Greenfield, L. and Maxfield, F.R. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 207-214]. Estas últimas células no expresan el receptor funcional endógeno de transferrina del hamster, y proporcionan una línea celular única con la que pueden ser comparados los resultados obtenidos con las células K562.

[0055] Células K562 fueron suspendidas en medio buffer acuoso conteniendo entre 0.0% y 1.8% de metilcelulosa (methocel). Las mediciones reológicas (Figura 1) indican que este intervalo de concentración de methocel dota al fluido extracelular con una viscosidad aparente que va desde la del agua a una viscosidad que excede la característica del citosol celular. Las viscosidades aparentes (definidas como esfuerzo cortante medido respecto a la velocidad de deformación aplicada) de los methocels varían en gran manera dependiendo de la fuerza neta administrada a la membrana celular que conduce a la formación de fosa. Es posible mostrar (ver leyenda Figura 1) que la fuerza máxima ejercida por una célula sobre el fluido extracelular por fosas de invaginación va desde aproximadamente 1 a 10 Pa, dependiendo de si ha ocurrido agrupamiento de receptores.

[0056] La Figura 2 muestra valores de internalización de K562 en régimen permanente de 125 I - Tf como una función de la concentración de methocel. La velocidad de endocitosis aumenta con la concentración creciente de methocel de 1.25 % a 1.7%, más allá de lo cual la velocidad de internalización disminuye bruscamente. Las soluciones de methocel con concentración de methocel mayor que 1.25 % poseen una viscosidad aparente cercana a, y potencialmente excediendo, la del citosol celular (Figura 1), al menos en el intervalo de esfuerzos cortantes relevante para RME. De acuerdo a la Figura 1, aumentar la concentración de methocel conduce a un incremento en la viscosidad del fluido extracelular (para tensión aplicada fija). Esto significa que la diferencia entre la viscosidad intracelular y extracelular decrece cuando la concentración de methocel aumenta más allá de 1.25%. Mientras la diferencia entre la viscosidad intracelular y extracelular se hace más pequeña, la velocidad inicial de la membrana hacia el citosol aumenta, coincidiendo con un ritmo de endocitosis aumentado. Este comportamiento se muestra en la Figura 2 hasta una concentración de methocel de 1.7%. Aumentar las concentraciones de methocel por encima de 1.7% conduce a viscosidades extracelulares que exceden la viscosidad intracelular. Por lo tanto, cuando la diferencia en las viscosidades aumenta, la velocidad de endocitosis decrece. Como se muestra en la Figura 2, las concentraciones de methocel por encima del 1.7 % causan una disminución en la velocidad de endocitosis. Esta disminución es consistente con la teoría aquí presentada.

[0057] Se usaron células de CHO para determinar si el comportamiento predicho ocurriría en otras líneas celulares. Para la determinación del In/Sur permanente con las células CHO se usaron protocolos similares a los de las células K562. La endocitosis se estudió en las células de CHO tanto con las células adheridas a una superficie sólida como en suspensión. De acuerdo a la Figura 3, In/Sur aumenta con la concentración de methocel hasta una concentración de methocel de 1.25 % para las células adheridas ($p=0.0011$), y de 1.5% de las células suspendidas ($p=0.0148$). Más allá de estas concentraciones, se observa una disminución de la velocidad de penetración para tanto las células adheridas ($p=0.0146$) como suspendidas ($p=0.0872$). Fuentes posibles de desviación de las tendencias In/Sur entre las células de CHO adheridas y suspendidas, así como entre las líneas celulares de CHO y K562, incluyen variaciones en la viscosidad aparente celular, tensión de la membrana celular y área expuesta de la membrana. Por ejemplo, se ha mostrado que la expansión celular aumenta la tensión intracelular [Want, N. and Ingber, D.E. 1994 *Biophys. J.* 66, 2181-2189]. Este efecto puede jugar un papel en las velocidades disminuidas de internalización observadas en la Figura 3 para las células CHO adheridas. Que cada una de las líneas celulares estudiadas presente un aumento de indicación en la internalización de Tf con concentración de methocel creciente, seguido de una disminución más allá de una concentración de methocel coincidiendo con una viscosidad aparente extracelular cerca de la esperada del citosol celular, es consistente con la teoría aquí presentada.

Ejemplo 2: Hidrogeles Viscosos con Viscosidad Óptima para la Administración Vaginal de Leuprolida a Ovejas

5 [0058] Una composición incluyendo metilcelulosa (methocel) y leuprolida, que se une específicamente a los receptores epiteliales vaginales de LHRH, fue administrada a la vagina de ovejas para demostrar la utilidad de hidrogeles viscosos con propiedades reológicas óptimamente elegidas para aumentar drásticamente la administración de agentes por el epitelio de mamíferos.

10 [0059] Las concentraciones del hidrogel fueron seleccionadas como 1.5 % y 1.75 % puesto que, como puede verse en la Figura 1, la viscosidad aparente de los methocels está en el intervalo entre 2 y 200 Poise o más en el intervalo de tensión aplicada de entre 1 y 100 Pascales. Se mezcló leuprolida en los hidrogeles a una concentración de 20 µg/ml. Las ovejas fueron tratadas con un total de 100 µg de leuprolida. Cada tratamiento causó un incremento importante en LH, como se muestra en la Figura 4. Para demostrar que la administración de leuprolida mejora usando los methocels optimizados reológicamente, fueron realizados experimentos de control usando la misma dosis (100 Pg de leuprolida) administrada a la vagina de ovejas en solución salina tamponada con fosfato (methocel 0.0).

15 [0060] Los resultados de este estudio de comparación son mostrados en la Figura 5. Los resultados demuestran que una administración de una sólo dosis de leuprolida en un hidrogel optimizado reológicamente podría usarse para regular el desarrollo folicular en humanos y animales. Sería esperable que la administración repetida diaria inhiba la función ovaria.

Ejemplo 3: Administración Intranasal de Análogos de la Hormona de Liberación de Gonadotropina ("GnRH")

20 [0061] Un análogo de GnRH se administró intranasalmente a ovejas usando una solución altamente viscosa para demostrar la generalidad de las composiciones y los métodos aquí presentados para administrar macromoléculas a través de barreraa epiteliales mamíferas. Una caula blue line se insertó en la fosa nasal de las ovejas a una profundidad preestablecida de 10 cm antes de la administración de 1.5 % de solución de methocel (5 mL de solución, conteniendo 100 µg de análogo de GnRH) mediante una jeringuilla. La concentración de LH en suero fue supervisada en función del tiempo después de la administración. Los resultados de este estudio son mostrados en la Figura 6. Se obtuvo una concentración terapéuticamente efectivo de LH en suero , que es comparable a la obtenida por medio de inyección, reflejando la capacidad de las composiciones y los métodos aquí descritos para mejorar el transporte transcelular de un análogo de GnRH. Cuando se administró un control de 5 mL de solución salina conteniendo 100 µg, la concentración de LH en suero era virtualmente indetectable.

Ejemplo 4: Comparación de la Administración Intravaginal y Administración Intravenosa de Vasopresina a Ovejas

30 [0062] A diferencia de la leuoprolida, la vasopresina (aunque de peso molecular similar a la leuoprolida) no se une con los receptores de la superficie celular del epitelio vaginal. Por lo tanto, la vasopresina (ADH) se administró intravaginalmente a las ovejas para determinar si la unión a un receptor del compuesto a administrar tenía un efecto sobre la administración intracelular. La administración efectiva de vasopresina se midió determinando el nivel de cortisol sistémico.

35 [0063] Como se muestra en la Figura 7, no había virtualmente diferencia en niveles de cortisol sistémico después de la administración de un control (una solución acuosa que no contenía methocel o vasopresina) respecto a cuando se administraron 200 µg de vasopresina intravaginalmente en soluciones de methocel al 1.5 o 1,75%. En comparación, la administración sistémica de vasopresina (IV administración) mostraba niveles mayores de cortisol. Este ejemplo demuestra la importancia de la unión al receptor para el éxito del método.

40

REIVINDICACIONES

1. Una composición para administrar hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) o un análogo de GnRH intracelularmente a una célula, comprendiendo:
- un hidrogel biocompatible, y
- 5 GnRH o un análogo de GnRH;
- caracterizado porque** la composición tiene una viscosidad aparente de entre 10 y 200 Poise (entre 1 y 20 N.m⁻².s) cuando se mide usando un reómetro de tensión controlada a 37°C usando una geometría de platina cónica en un intervalo de tensión aplicada de entre 1 y 100 Pascales.
2. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 1 en la que la célula es una célula eucariótica.
- 10 3. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 2 en la que la célula es una célula mamífera, preferiblemente una humana.
4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 en la que la célula es una célula de la vagina, recto, nariz, oído, boca, pulmones, o piel.
- 15 5. La composición de la Reivindicación 1 en la que la viscosidad aparente de la composición está entre 50 y 200 Poise (entre 5 y 20 N.m⁻².s).
6. La composición de la Reivindicación 1 en la que el hidrogel comprende una celulosa, polioxialquileno, polivinilpirrolidona, dextrano, alginato, agarosa, gelatina, ácido hialurónico, trehalosa, alcohol polivinílico, copolímeros y mezclas de los mismos, poli(acrilamida), polifosfacina, poli(acrilato), o copolímero bloque de polioxialquileno.
- 20 7. La composición de la Reivindicación 1 en la que el hidrogel comprende un polisacárido, una proteína o un polímero sintético.
8. La composición de la Reivindicación 7 en la que el polisacárido es una celulosa, un dextrano o un alginato.
9. La composición de la Reivindicación 8 en la que la celulosa es metilcelulosa.
10. La composición de la Reivindicación 9 comprendiendo metilcelulosa en una concentración de 1.25 a 1.8% (p/p).
11. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-10 for use in medicine.
- 25 12. Uso de la composición de cualquiera de s Reivindicaciones 1-10 en la preparación de un medicamento para suministrar agentes a células.
13. El uso de la Reivindicación 12 en el que la célula a la que el agente tiene que ser suministrado está en la nariz, vagina, recto, ojo, oído, boca, pulmones, o piel.
- 30 14. Un método para suministrar GnRH o un análogo de GnRH a células in vitro comprendiendo administrar a las células una composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-10.
15. Una composición como se reivindica en cualquiera de la Reivindicaciones 1 a 10 comprendiendo además un agente biocompatible activo de superficie.

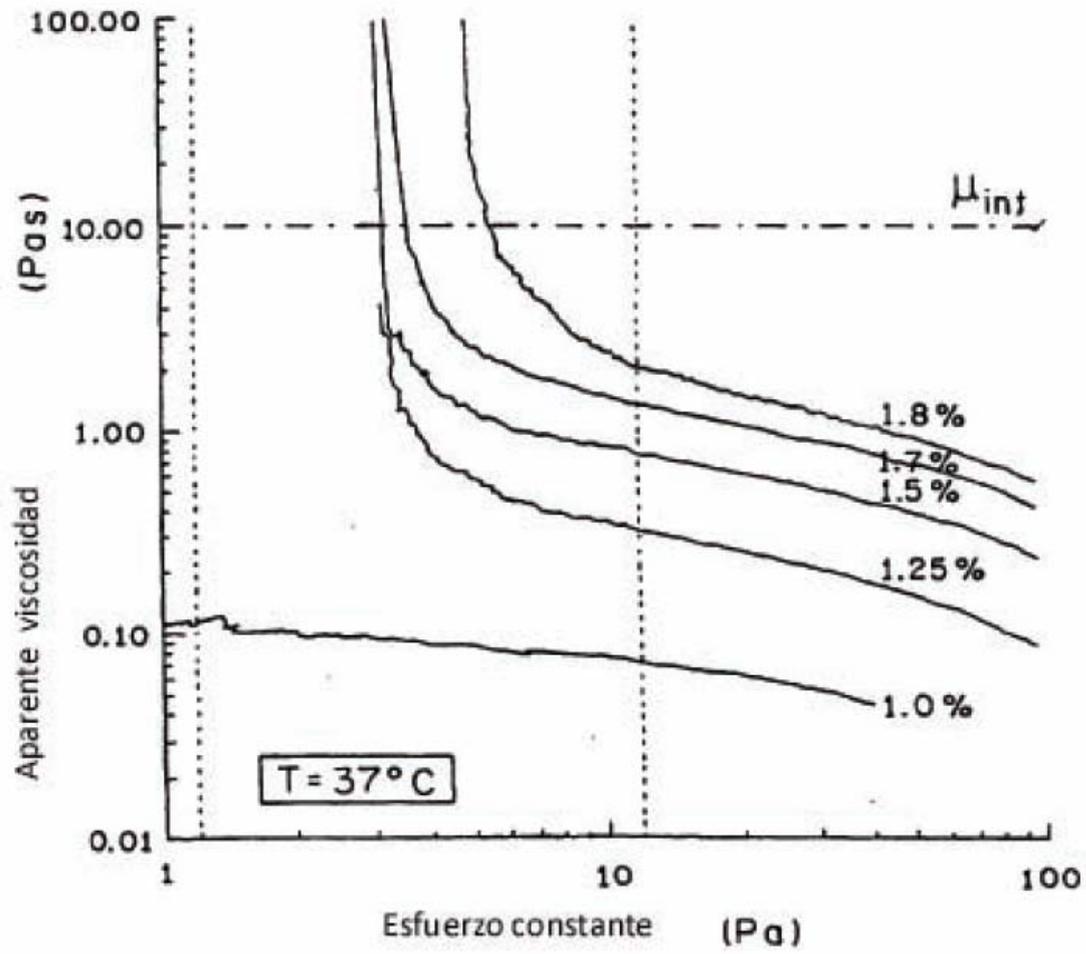


FIGURA 1

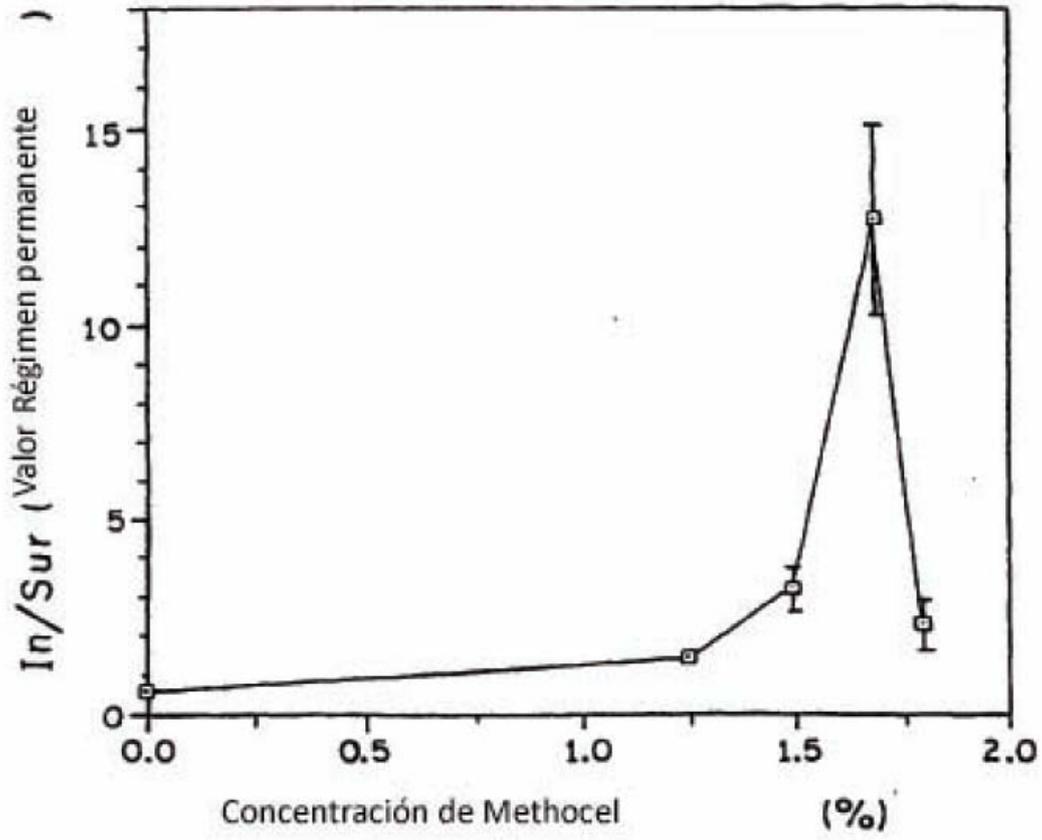


FIGURA 2

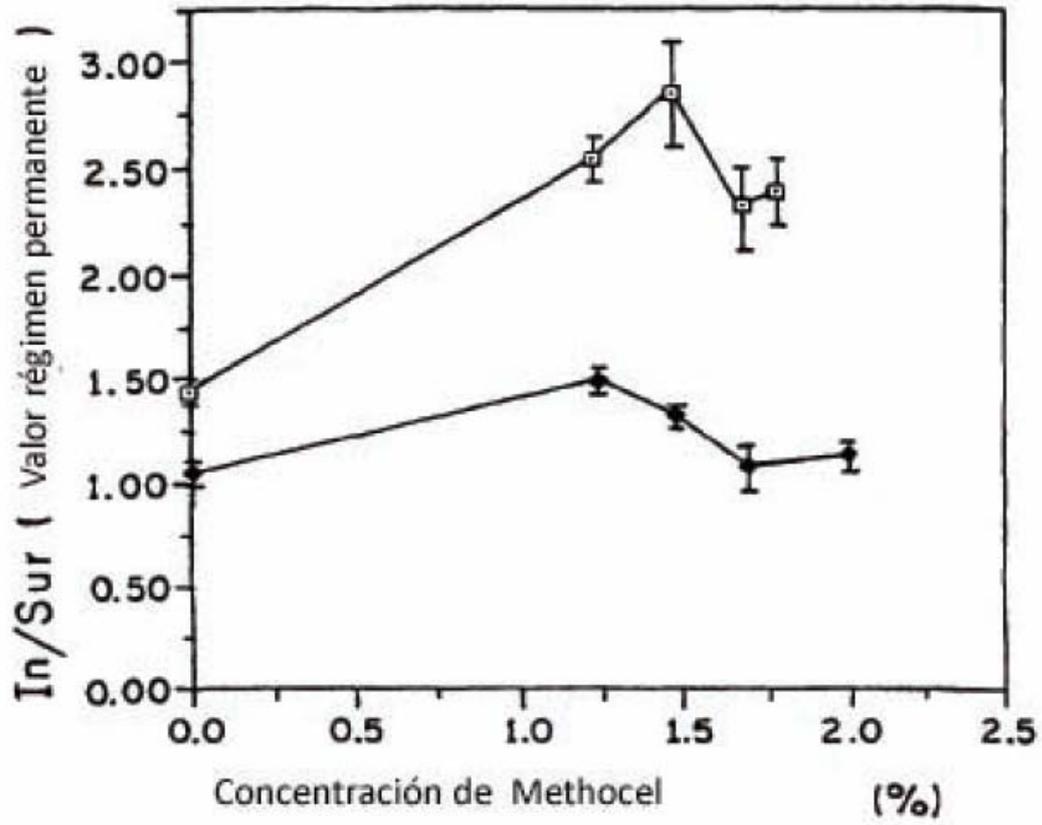


FIGURA 3

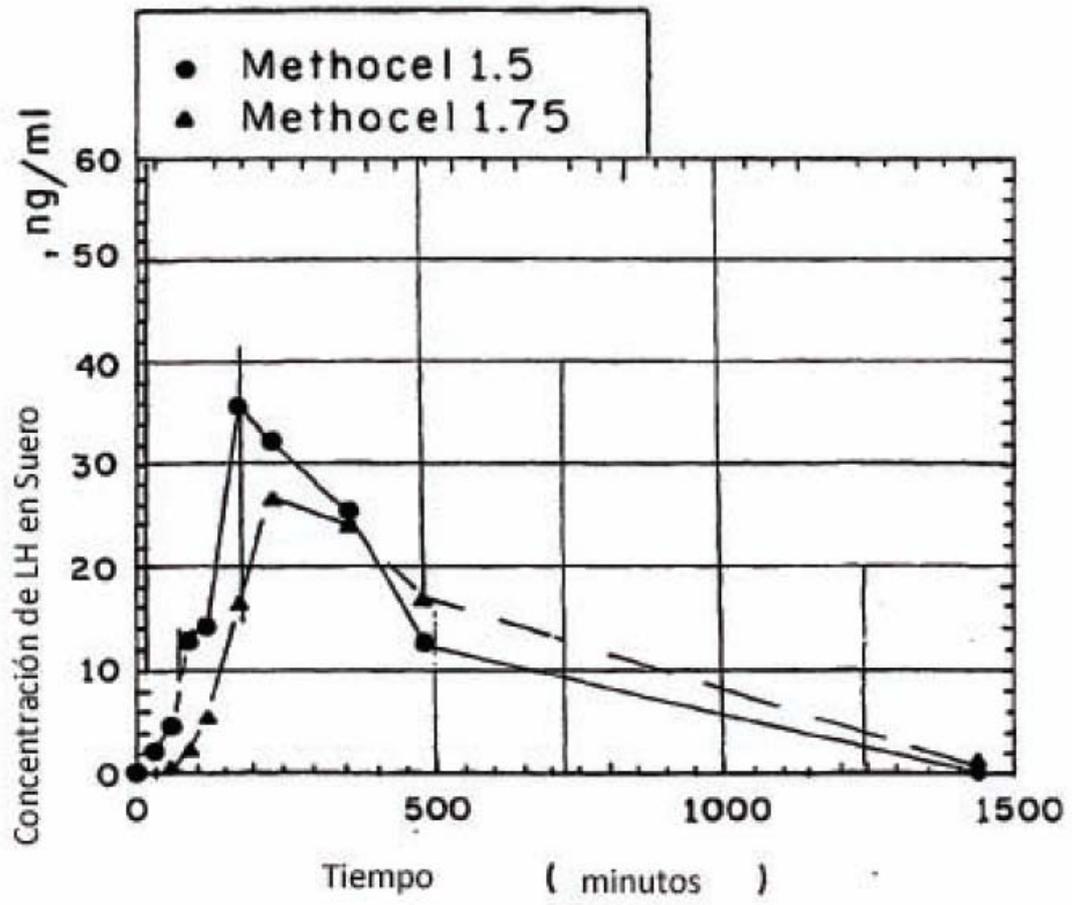


FIGURA 4

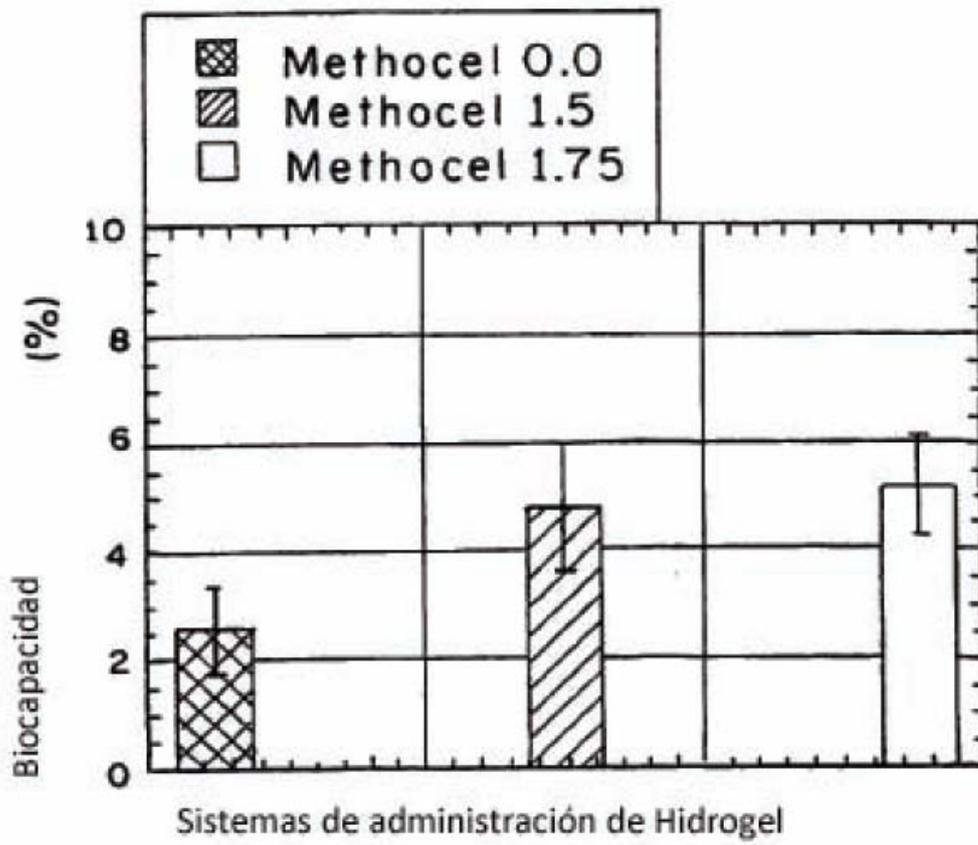


FIGURA 5

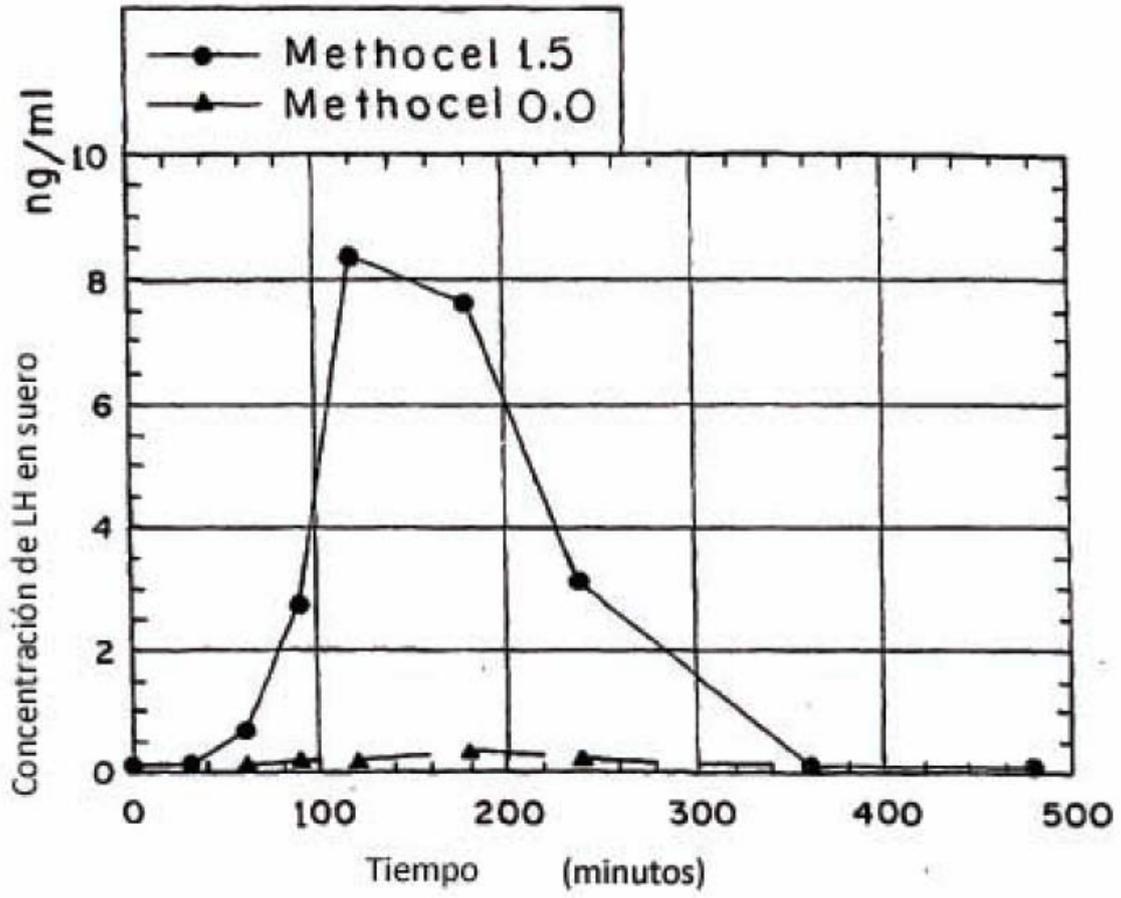


FIGURA 6

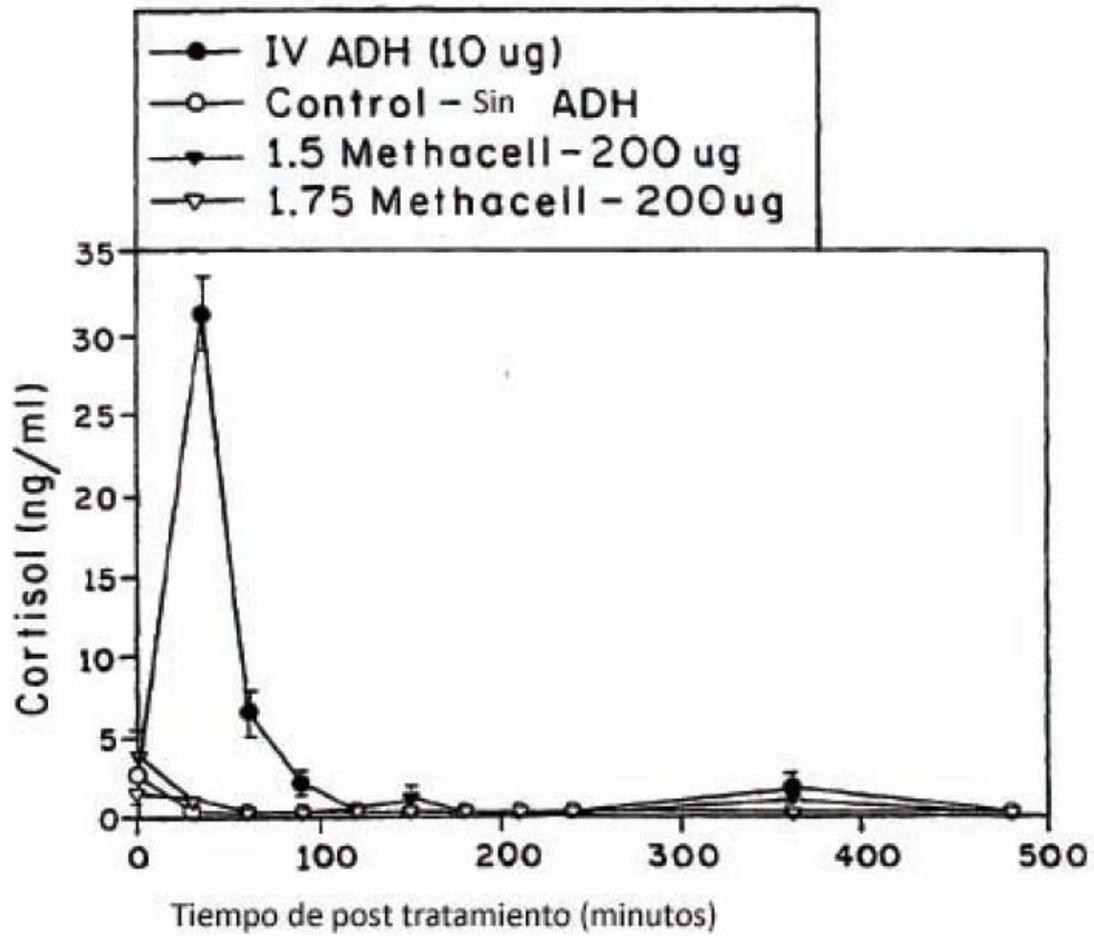


FIGURA 7