

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 685**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 47/38	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2008 PCT/US2008/072306**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09021017**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08797258 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2178509**

54 Título: **Composiciones de ácido nucleico-lipopolímero**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 890805
16.07.2008 US 11

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

CLSN LABORATORIES, INC. (100.0%)
2711 Centerville Road, Suite 400
Wilmington, DE 19808, US

72 Inventor/es:

MATAR, MAJED;
FEWELL, JASON;
LEWIS, DANNY, H. y
ANWER, KHURSHEED

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 625 685 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

Composiciones de ácido nucleico-lipopolímero

Campo de la invención

5 La invención se refiere a formulaciones concentradas y estables que comprenden ácido nucleico y lipopolímero y a composiciones, métodos de preparación y aplicaciones de los mismos. En consecuencia, esta invención implica los campos de la biología molecular y la bioquímica.

Antecedentes de la invención

10 Los vectores de suministro de genes sintéticos tienen una ventaja considerable sobre los vectores virales debido a un mejor cumplimiento relacionado con la seguridad, una química sencilla y una fabricación rentable. Sin embargo, debido a la baja eficiencia de transfección de los vectores sintéticos en comparación con la de los vectores virales, la mayor parte del desarrollo en los sistemas de suministro de genes sintéticos se ha centrado en mejorar la eficacia del suministro. Por consiguiente, se ha prestado poca atención al desarrollo farmacéutico de sistemas de suministro sintéticos, aunque se han identificado problemas en la estabilidad de la formulación, el escalado y la flexibilidad de la dosificación. Los fármacos que contienen ADN que se autoensamblan en nanopartículas presentan a menudo una pobre estabilidad, particularmente cuando la formulación es una suspensión acuosa. En tales formulaciones, el ADN con vectores sintéticos típicamente se agregará con el tiempo, especialmente en las concentraciones requeridas para una dosificación óptima en un entorno clínico. Tales formulaciones son a menudo difíciles de preparar en concentraciones de ADN > 0,3 mg/mL, lo que limita sus aplicaciones comerciales, especialmente para la administración local, donde las limitaciones de volumen limitarían una dosificación flexible. La agregación de ADN reduce o elimina la actividad del ADN y por lo tanto hace que la composición no sea adecuada para su uso en un tratamiento.

15 Esta inestabilidad física es una de las razones subyacentes para la pérdida de actividad de transfección. La manifestación de la ruptura o fusión de las partículas debido a la alta curvatura de la bicapa lipídica o la disociación física del lípido del ADN también se han postulado como posibles razones subyacentes para la pobre estabilidad y la agregación de complejos de suministro de genes basada en lípidos catiónicos. La modificación química, tal como la hidrólisis oxidativa de los vectores de suministro, puede también contribuir a la inestabilidad de las partículas.

20 Debido a la escasa estabilidad, los ensayos clínicos iniciales requerían que las formulaciones de ADN se prepararan al lado de la cama. No tener la capacidad de preparar y almacenar el producto clínico en las concentraciones necesarias para una dosificación óptima es un obstáculo importante en la práctica clínica general y la comercialización de los productos de ADN no virales. Esto requeriría que los médicos entrenaran en la formulación de fármacos y plantearan medidas de control de calidad en el sitio.

25 La liofilización es un método útil para mejorar la estabilidad a largo plazo de una cantidad de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, este proceso no es normalmente adecuado para secar complejos de ADN con vectores sintéticos ya que tiende a alterar sus propiedades fisicoquímicas y da como resultado la agregación y la pérdida de transfección tras la reconstitución.

30 Se han intentado varios enfoques para evitar la agregación de la formulación y el daño durante la liofilización. En algunos casos, la liofilización de complejos de ADN en presencia de un crioprotector tal como azúcares de bajo peso molecular, dextranos y polietilenglicol puede proporcionar una mejor estabilidad al producto, pero este enfoque no parece mejorar la flexibilidad de dosificación. La adición de azúcares es a menudo el enfoque más utilizado para este propósito. Se ha encontrado que muchos de los azúcares de ensayo previenen hasta cierto punto el daño a la formulación y la agregación de partículas, pero la calidad de este efecto varía con el tipo de azúcar y el vector de suministro utilizado.

35 Aunque la liofilización proporciona alguna mejora en la vida útil de la formulación, las condiciones requeridas para producir productos de ADN liofilizados permiten sólo aplicaciones farmacéuticas limitadas. Incluso con los azúcares lioprotectores más eficaces, se requiere una relación molar azúcar/ADN muy alta (típicamente mayor de 1.000:1) para la estabilidad. Como resultado, el producto liofilizado a menudo debe diluirse por un factor muy grande para obtener una formulación isotónica, lo que da como resultado una disminución de la concentración final de ADN para la concentración de ADN previamente liofilizada. Para muchos portadores catiónicos, la concentración final de ADN puede ser típicamente de aproximadamente 0,1-0,2 mg/mL, y a menudo inferior a 0,1 mg/mL. Aunque las formulaciones de baja concentración son suficientes para los estudios in vitro, su aplicación clínica puede estar limitada debido al alto volumen requerido para la dosificación óptima. Por ejemplo, a la concentración óptima de azúcar necesaria para la estabilidad, puede ser necesario diluir una dosis de 1 mg de ADN en 5-10 mL para mantener la isotonicidad, que es un volumen demasiado grande para la administración local in vivo. Esta limitación farmacéutica, prohibitiva para una dosificación flexible, es uno de los principales contribuyentes para una eficacia por debajo del óptimo de sistemas de administración

de genes sintéticos en ensayos clínicos en humanos y justifica la necesidad de formulaciones de ADN más concentradas que sean estables y biológicamente activas.

5 El documento WO02/22174 de EXPRESSION GENETICS INC describe un lipopolímero catiónico biodegradable que comprende polietilenimina ramificada (PEI), un ancla lipídica derivada de colesterol y un enlazador biodegradable que enlaza covalentemente la PEI ramificada y el ancla lipídica derivada de colesterol. Los lipopolímeros catiónicos se usan en el suministro de ácido nucleico a diversos órganos o tejidos después de la administración local o sistémica. Se menciona el polietilenglicol (PEG) para uso como un enlazador para conjugar ligandos dirigidos a grupos amina de la PEI.

10 El documento WO 2005/560934 de EXPRESSION GENETICS INC describe un lipopolímero catiónico biodegradable que comprende una polietilenimina (PEI), un lípido y un polímero hidrofílico biocompatible. El lípido y el polímero hidrofílico biocompatible están directamente enlazados a la cadena principal de PEI. Alternativamente, el lípido está enlazado a la cadena principal de PEI a través del polímero hidrofílico biocompatible. Estos lipopolímeros hidrofílicos pueden usarse para suministrar ácidos nucleicos a diversos órganos y tejidos después de la administración local o sistémica.

15 Sumario de la invención

La invención proporciona composiciones que demuestran una estabilidad inesperada con una alta concentración de ácido nucleico y que aumentan la eficacia y la flexibilidad de la dosificación de la transfección de ácido nucleico. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser liofilizadas y reconstituidas eficientemente a varias concentraciones de ácido nucleico, incluyendo altas concentraciones de ácido nucleico, sin perder actividad biológica o agregación de ácido nucleico.

25 En un aspecto, la invención proporciona composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, que comprenden una mezcla de un lipopolímero catiónico y al menos aproximadamente 0,5 mg/mL de un ácido nucleico, donde la mezcla se suspende en una solución acuosa. El lipopolímero catiónico comprende una estructura principal de polietilenimina (PEI) que tiene grupos colesterol y polietilenglicol unidos independientemente covalentemente entre sí. La relación molar de colesterol con respecto a la cadena principal de polietileno está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 y la relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal del polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. La composición incluye un excipiente de relleno. En ciertos aspectos, la mezcla de ácido nucleico y lipopolímero forma un complejo. En ciertos aspectos, la composición comprende ácido nucleico condensado. La cantidad de ácido nucleico que se condensa dependerá generalmente de la composición del ácido nucleico y de las condiciones bajo las cuales se prepara la composición. Las composiciones opcionales o preferidas se exponen en las reivindicaciones 2 y 11.

La invención también proporciona un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica según se expone en la reivindicación 12.

35 La invención proporciona adicionalmente una composición de acuerdo con la reivindicación 13, que es una composición farmacéutica seca de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

40 En el presente documento se describen composiciones liofilizadas de un ácido nucleico y un lipopolímero. Una composición liofilizada, preferiblemente una composición farmacéutica liofilizada de la invención comprende una mezcla de un excipiente de relleno, un ácido nucleico condensado y un lipopolímero catiónico. Como se ha indicado anteriormente, el lipopolímero catiónico incluye una cadena principal de polímero catiónico que tiene colesterol y polietilenglicol unidos covalentemente al mismo y en donde la relación molar de colesterol con respecto a la cadena principal de polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 y la relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10.

45 La invención proporciona adicionalmente composiciones para uso en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos por ejemplo transfectando diversas células y tejidos, como se expone en la reivindicación 14 y en la reivindicación 15.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un esquema de un proceso de fabricación de la invención.

La FIG. 2 muestra gráficos del tamaño de partícula de ácidos nucleicos en estados concentrado y no concentrado.

La FIG. 3 muestra los resultados de un experimento electroforético para mostrar la condensación de ácido nucleico.

La FIG. 4 muestra gráficos de la actividad de transfección de acuerdo con una realización adicional de la invención.

La FIG. 5A y la FIG. 5B son fotografías de cortes neurales que muestran los resultados del tratamiento con lipopolímero con y sin IL-12.

5 La FIG. 6 muestra dos gráficos de la eficacia anticancerígena de IL-12 con lipopolímero en comparación con los controles.

La FIG. 7A y la FIG. 7B son gráficos del tamaño de partícula de diversas mezclas de ácido nucleico/polímero catiónico.

La FIG. 8A y la FIG. 8B son gráficos de la expresión de luciferasa como resultado de diversas mezclas de ácido nucleico/polímero catiónico.

10 La FIG. 9 es un gráfico que muestra la actividad biológica de una composición de ácido nucleico/lipopolímero catiónico después de un almacenamiento a largo plazo.

Descripción detallada

15 Antes de divulgar y describir la invención, debe entenderse que esta invención no está limitada a las estructuras particulares, etapas de proceso o materiales descritos en la presente memoria, sino que se extiende a sus equivalentes como serían reconocidos por los expertos en las materias pertinentes. También debe entenderse que la terminología empleada en la presente memoria se utiliza con el fin de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa puesto que el alcance de la invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

20 Debe observarse que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "ácido nucleico condensado" y "ácido nucleico parcialmente condensado" se usan para referirse a un ácido nucleico que ha sido puesto en contacto con un lipopolímero catiónico de la invención. En ciertos aspectos, el ácido nucleico condensado permanece en contacto con el lipopolímero catiónico. Los ácidos nucleicos condensados normalmente ocupan un volumen significativamente menor que los ácidos nucleicos no condensados. Sin embargo, se reconoce que la cantidad de ácido nucleico condensado puede variar con el entorno local (por ejemplo, medio lipídico en oposición al medio acuoso). En diversos aspectos de la invención, los ácidos nucleicos condensados son aquellos en nanopartículas de ácido nucleico y lipopolímero catiónico que tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 300 nm, más preferiblemente de aproximadamente 50-200, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 50-150 nm. "Ácido nucleico parcialmente condensado" se refiere a un ácido nucleico que ha sido puesto en contacto con un lipopolímero catiónico de la invención en el que el ácido nucleico no está totalmente condensado, pero todavía ocupa un volumen significativamente menor que el ácido nucleico no condensado.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "complejo" significa ácido nucleico que está asociado con lipopolímero, preferiblemente, lipopolímero catiónico. Un complejo que incluye ácido nucleico condensado y lipopolímero catiónico normalmente existirá como partículas, preferiblemente como nanopartículas.

40 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "que se transfecta" y "transfección" se refieren al transporte de ácidos nucleicos desde el entorno externo a una célula al entorno celular interno, con particular referencia al citoplasma y/o al núcleo celular. Sin estar limitado por ninguna teoría en particular, debe entenderse que los ácidos nucleicos pueden ser suministrados a las células bien después de ser encapsulados dentro o adhiriéndose a uno o más complejos de polímero catiónico / ácido nucleico o de ser arrastrados con ellos. Los casos particulares de transfección suministran un ácido nucleico a un núcleo celular.

Tal como se usa en la presente memoria, "sujeto" se refiere a un mamífero que puede beneficiarse de la administración de una composición farmacológica o método de esta invención. Ejemplos de sujetos incluyen humanos, y pueden incluir también otros animales tales como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos, conejos y mamíferos acuáticos.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, "composición" se refiere a una mezcla de dos o más compuestos, elementos o moléculas. En algunos aspectos, el término "composición" puede usarse para referirse a una mezcla de un ácido nucleico y un sistema de administración.

Tal como se usa en la presente memoria, la "relación N:P" se refiere a la relación molar de nitrógenos amínicos en el lipopolímero catiónico con grupos funcionales y los grupos fosfato en el ácido nucleico.

Tal como se usa en la presente memoria, las "propiedades fisicoquímicas" se refieren a diversas propiedades tales como, sin limitación, el tamaño de partícula y la carga superficial de complejos de ácido nucleico con un polímero catiónico, pH y osmolaridad de la solución de partículas, etc.

5 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "administración", "que se administra" y "suministro" se refieren a la manera en que se presenta una composición a un sujeto. La administración se puede llevar a cabo mediante diversas vías conocidas en la técnica tales como oral, parenteral, transdérmica, inhalación, implantación, etc. Por lo tanto, se puede lograr una administración oral al tragar, masticar, succionar una forma de dosificación oral que comprende la composición. La administración parenteral se puede conseguir inyectando una composición por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraarticular, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, etc. Los inyectables para tal uso se pueden preparar en formas convencionales, ya sea en forma de una solución o suspensión líquida, o en una forma sólida que sea adecuada para la preparación como una solución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como una emulsión. Adicionalmente, la administración transdérmica se puede lograr aplicando, pegando, laminando, uniendo, vertiendo, presionando, frotando, etc., una composición transdérmica sobre una superficie de la piel. Estos y otros métodos de administración son bien conocidos en la técnica. En un aspecto específico, la administración puede incluir suministrar una composición a un sujeto de manera que la composición circule sistemáticamente y se una a una célula diana para ser absorbida por endocitosis.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" se refiere a ADN y ARN, así como a congéneres sintéticos de los mismos. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos pueden incluir ADN plasmídico que codifica proteínas o secuencias de nucleótidos productoras de ARN inhibidor, secuencias sintéticas de nucleótidos de hebras sencillas o dobles, de sentido erróneo, antisentido, sin sentido, así como reguladores de activación y desactivación que controlan proteínas, péptidos, y la producción de ácido nucleico. Además, los ácidos nucleicos también pueden incluir, sin limitación, ADN genómico, ADNc, ARNpi, ARNph, ARNm, ARNt, ARNr, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semisintéticas, y de origen natural o artificial. En un aspecto, una secuencia de nucleótidos también puede incluir aquellas que codifican para la síntesis o inhibición de una proteína terapéutica. Ejemplos no limitativos de tales proteínas terapéuticas pueden incluir agentes anticancerígenos, factores de crecimiento, agentes hipoglucémicos, agentes antiangiogénicos, antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos tumorales o enzimas metabólicas. Ejemplos de agentes anticancerígenos pueden incluir interleuquina 2, interleuquina 4, interleuquina 7, interleuquina 12, interleuquina 15, interferón α , interferón β , interferón γ , factor estimulante de colonias, factor estimulante granulocitos-macrófagos, agentes antiangiogénicos, genes supresores de tumores, timidina quinasa, eNOS, iNOS, p53, p16, TNF- α , ligando Fas, oncogenes mutados, antígenos tumorales, antígenos virales o antígenos bacterianos. En otro aspecto, el ADN plasmídico puede codificar para una molécula de ARNph diseñada para inhibir la proteína o proteínas implicadas en el crecimiento o mantenimiento de células tumorales u otras células hiperproliferativas. Además, en algunos aspectos un ADN plasmídico puede codificar simultáneamente para una proteína terapéutica y uno o más ARNph. En otros aspectos, un ácido nucleico también puede ser una mezcla de ADN plasmídico y ARN sintético, incluyendo ARN sentido, ARN antisentido, ribozimas, etc. Además, el ácido nucleico puede ser de tamaño variable, desde oligonucleótidos hasta cromosomas. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, viral o sintético. Pueden obtenerse por cualquier técnica conocida por un experto en la técnica.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "concentrado" se refiere a una composición cuya dilución se ha reducido. En algunos aspectos de la invención, una composición "concentrada" comprende ADN condensado, preferiblemente en una solución isotónica. En un aspecto particular de la invención, una composición concentrada comprende al menos aproximadamente 0,5 mg/mL de ADN condensado suspendido en una solución isotónica.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cadena principal polimérica" se utiliza para referirse a una colección de moléculas de una cadena principal polimérica que tienen un peso molecular medio ponderado dentro del intervalo designado. Como tal, cuando se describe que una molécula tal como colesterol está unida covalentemente a la misma dentro de un intervalo de proporciones molares, debe entenderse que tal relación representa un número medio de moléculas de colesterol unidas a la colección de moléculas de cadena principal polimérica. Por ejemplo, si se describe que el colesterol está unido covalentemente a una cadena principal polimérica en una relación molar de 0,5, entonces, en promedio, la mitad de las moléculas de cadena principal polimérica tendrá colesterol unido. Como otro ejemplo, si se describe que el colesterol está unido covalentemente a una cadena principal polimérica en una relación molar de 1,0, entonces, en promedio, una molécula de colesterol se unirá a cada una de las moléculas de cadena principal polimérica. En realidad, sin embargo, debe entenderse que en este caso algunas moléculas de cadena principal polimérica pueden no tener moléculas de colesterol unidas, mientras que otras moléculas de cadena principal polimérica pueden tener múltiples moléculas de colesterol unidas, y que es el número medio de moléculas de colesterol unidas a partir del cual se deriva la relación. El mismo razonamiento se aplica a la relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal polimérica.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "péptido" puede usarse para referirse a una molécula natural o sintética que comprende dos o más aminoácidos enlazados por el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo alfa amino de otro. Un péptido de la invención no está limitado por la longitud, y por lo tanto "péptido" puede incluir polipéptidos y proteínas.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "covalente" y "covalentemente" se refieren a enlaces químicos a través de los cuales se comparten los electrones entre pares de átomos.

5 Como se usa aquí, una pluralidad de ítems, elementos estructurales, elementos de composición y/o materiales pueden presentarse en una lista común por conveniencia. Sin embargo, estas listas deben ser interpretadas como si cada miembro de la lista se identificara individualmente como un miembro separado y único. Por lo tanto, ningún miembro individual de dicha lista debe interpretarse como un equivalente de hecho de cualquier otro miembro de la misma lista basándose únicamente en su presentación en un grupo común sin indicaciones en contrario.

10 Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos pueden expresarse o presentarse aquí en un formato de intervalo. Debe entenderse que tal formato de intervalo se utiliza meramente por conveniencia y brevedad y por lo tanto debe ser interpretado de manera flexible para incluir no sólo los valores numéricos explícitamente mencionados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subgrupos comprendidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo estuviera explícitamente mencionado. Como
15 ilustración, un intervalo numérico de "aproximadamente 1 a aproximadamente 5" debe interpretarse para incluir no sólo los valores expresamente mencionados de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, sino que también incluye valores individuales y subintervalos dentro del intervalo indicado. Así, se incluyen en este intervalo numérico valores individuales tales como 2, 3 y 4 y subintervalos tales como 1-3, 2-4 y 3-5, etc., así como 1, 2, 3, 4 y 5, individualmente. Este mismo principio se aplica a los intervalos que mencionan un valor numérico mínimo o máximo. Además, dicha interpretación debería aplicarse con independencia de la amplitud del intervalo o de las características que se describen.

20 La invención proporciona técnicas por medio de las cuales las composiciones de ácido nucleico de baja concentración (por ejemplo, 0,15 mg/mL) pueden estar altamente concentradas sin afectar las propiedades fisicoquímicas o biológicas del ácido nucleico o las composiciones del ácido nucleico. En un aspecto, las composiciones de ácido nucleico pueden concentrarse 33 veces o más sin afectar estas propiedades. Estas composiciones de ácido nucleico altamente
25 concentradas permiten una amplia gama de regímenes de dosificación in vivo, que anteriormente han sido tremendamente desafiantes debido a problemas de estabilidad deficiente asociados con intentos previos de alcanzar concentraciones por encima de ~0,3 mg/mL.

Más específicamente, la invención proporciona composiciones farmacéuticas concentradas y estables, incluyendo métodos para preparar y usar tales composiciones. En un aspecto, por ejemplo, se proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos aproximadamente 0,5 mg/mL de un ácido nucleico, donde el ácido nucleico está formando un complejo con un lipopolímero catiónico y el complejo se suspende en una solución acuosa. El complejo suspendido en la solución acuosa comprende moléculas de ácido nucleico parcial o totalmente condensadas. El lipopolímero catiónico comprende una cadena principal de polietilénimina (PEI) que tiene grupos colesterol y polietilenglicol (es decir, moléculas) unidos covalentemente a la misma. La relación molar de las moléculas de colesterol con respecto a la cadena principal de PEI está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10, y la relación molar de moléculas de polietilenglicol con respecto a PEI está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. La composición comprende además un excipiente de relleno. En otro aspecto, la relación molar de las moléculas de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de PEI en el lipopolímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10. En otro aspecto, la relación molar de moléculas de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de PEI en el lipopolímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. En un aspecto adicional, la relación molar de moléculas de colesterol con respecto a la cadena principal de PEI en el lipopolímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 5. En un aspecto incluso adicional, la relación molar de moléculas de colesterol con respecto a la cadena principal de PEI en el lipopolímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,5.

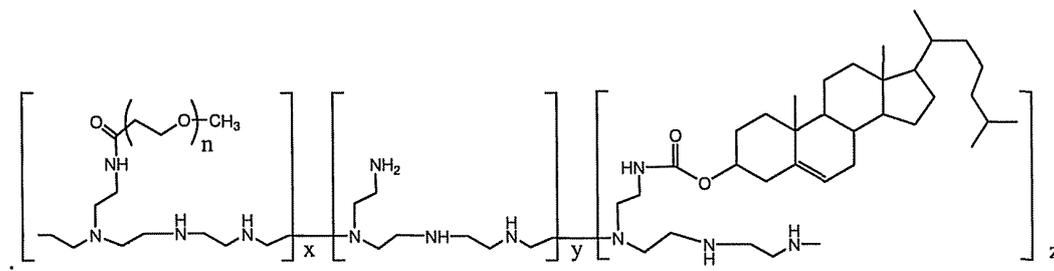
45 La composición resultante es adecuada para la administración del ácido nucleico a una célula diana para provocar, inhibir o modificar una respuesta biológica dependiendo de la función del ácido nucleico.

50 En un aspecto, las moléculas de colesterol y polietilenglicol pueden estar unidas independiente y directamente covalentemente a la cadena principal de PEI. En otro aspecto, las moléculas de colesterol y polietilenglicol están cada una unidas covalentemente indirectamente a la cadena principal de PEI. Por ejemplo, la molécula de colesterol puede estar acoplada, directa o indirectamente a través de un enlazador o espaciador, a la molécula de polietilenglicol, que a su vez está unida covalentemente a la cadena principal de PEI. Alternativamente, la molécula de colesterol puede estar directamente unida a la cadena principal de PEI mientras que la molécula de polietilenglicol está indirectamente unida al lipopolímero a través de un enlazador o espaciador.

55 Un enlazador particular entre el polietilenglicol y la cadena principal de PEI es un grupo alquileo que porta un grupo carboxilo terminal, preferiblemente un grupo alquileo de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono y más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono. El grupo carboxilo terminal en el enlazador, cuando está unido a un grupo amino de la cadena principal de PEI, forma un enlace amida entre el lipopolímero catiónico y el polietilenglicol. Un polietilenglicol de partida adecuado para reaccionar con la molécula de la

cadena principal de PEI es un polietilenglicol que porta una molécula enlazadora que termina en un grupo activador, por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimidilo. Un ejemplo de tal polietilenglicol es el éster de N-hidroxisuccinimidilo del ácido metoxipolietilenglicol-propiónico.

- 5 Un ejemplo de una porción de una estructura de lipopolímero catiónico resultante de la reacción entre una polietilenimina, cloroformiato de colesterilo (esteroquímica omitida) y éster de N-hidroxisuccinimidilo del ácido metoxipolietilenglicol-propiónico es la siguiente estructura. La convención gráfica refleja la distribución aproximada de grupos amino primarios, secundarios y terciarios en polietilenimina y, para fines de claridad aquí, asume una regularidad no existente de la cadena de polietilenimina.



- 10 En varios aspectos de la invención, n es típicamente de aproximadamente 8 a aproximadamente 20, más particularmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, e incluso más particularmente de aproximadamente 12; x es típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, más particularmente aproximadamente 2,5; y es típicamente de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, más particularmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, e incluso más particularmente de 7,5; z típicamente es aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,8, más particularmente aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7, e incluso más particularmente aproximadamente 0,6.

- 15 Además, en algunos aspectos, los ácidos nucleicos que se han condensado previamente usando un sistema de condensación secundario pueden condensarse adicionalmente utilizando las técnicas presentadas en la presente memoria para conseguir una mayor estabilidad del ácido nucleico a altas concentraciones. Como tal, antes de la condensación de acuerdo con aspectos de la invención, el ácido nucleico puede estar en una forma parcialmente condensada o no condensada. El sistema de condensación secundario puede incluir cualquier material o técnica de condensación conocido por un experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, lípidos catiónicos, péptidos catiónicos, ciclodextrinas, gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano y combinaciones de los mismos.

- 20 Se pueden conseguir diversos grados de condensación de un ácido nucleico para la composición de acuerdo con aspectos de la invención. En un aspecto, todos los ácidos nucleicos o una porción sustancial de los ácidos nucleicos en la composición se condensan formando complejos con el polímero catiónico. En otro aspecto, aproximadamente el 30% en peso de los ácidos nucleicos en la composición se condensan. En aún otro aspecto, aproximadamente el 50% en peso del ácido nucleico en la composición se condensa. En un aspecto adicional, aproximadamente el 70% en peso del ácido nucleico en la composición se condensa. Todavía en otro aspecto, el 90% en peso del ácido nucleico se condensa.

- 25 Adicionalmente, la concentración de ácido nucleico en la composición variará dependiendo de los materiales utilizados en la composición, los métodos de concentración y el uso previsto del ácido nucleico. En un aspecto, sin embargo, la concentración del ácido nucleico es de al menos aproximadamente 0,5 mg/mL. En otro aspecto, la concentración del ácido nucleico es al menos aproximadamente de 1 mg/mL. En aún otro aspecto, la concentración del ácido nucleico es al menos aproximadamente de 3 mg/mL. En un aspecto adicional, la concentración del ácido nucleico puede ser de al menos aproximadamente 5 mg/mL. Todavía en otro aspecto, la concentración del ácido nucleico puede ser de al menos aproximadamente 10 mg/mL. En otro aspecto, la concentración del ácido nucleico puede ser de al menos aproximadamente 20 mg/mL. En aún otro aspecto, la concentración del ácido nucleico puede ser de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 40 mg/mL.

- 30 Pueden utilizarse diversos métodos para determinar el grado de condensación de una composición de ácido nucleico. Por ejemplo, en un aspecto, la composición puede ser sometida a electroforesis para determinar el grado en el que los ácidos nucleicos en la composición han formado complejos con el polímero catiónico añadido a la composición. La atracción electrostática del ácido nucleico cargado negativamente al lipopolímero catiónico cargado positivamente inhibe el movimiento del ácido nucleico a través de un gel de agarosa. Por consiguiente, después de la electroforesis, los ácidos nucleicos que se condensan mediante la formación de complejos con el polímero catiónico permanecen inmóviles en el gel, mientras que los ácidos nucleicos no condensados, ácidos nucleicos no asociados con el polímero catiónico, habrán recorrido una distancia relativa a la fuerza de la corriente eléctrica en el gel. En otro ejemplo, la condensación de ácido nucleico puede determinarse por los tamaños de partícula dentro de la composición. El tamaño de partícula se puede medir por dispersión dinámica de la luz. Típicamente, los ácidos nucleicos condensados tendrán

un tamaño de partícula más pequeño que los ácidos nucleicos no condensados. Los ácidos nucleicos condensados preferidos son aquellos en nanopartículas de ácido nucleico y lipopolímero catiónico que tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 300 nm, más preferiblemente de aproximadamente 50-200, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 50-150 nm.

5 Cualquier ácido nucleico conocido puede ser utilizado en las composiciones y métodos de acuerdo con aspectos de la invención, incluyendo los ejemplos descritos anteriormente. Como tal, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento no deben considerarse limitantes. En un aspecto, por ejemplo, el ácido nucleico puede incluir un plásmido que codifica para una proteína, polipéptido o péptido. Se sabe que numerosos péptidos resultarían beneficiosos cuando se formularan como composiciones farmacéuticas de acuerdo con aspectos de la invención. Ejemplos no limitativos de algunos de tales péptidos pueden incluir interleuquina 2, interleuquina 4, interleuquina 7, interleuquina 12, interleuquina 15, interferón α , interferón β , interferón γ , factor estimulante de colonias, factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocitos, agentes angiogénicos, factores de coagulación, agentes hipoglucémicos, factores de apoptosis, agentes antiangiogénicos, timidina quinasa, p53, IP10, p16, TNF- α , ligando Fas, antígenos tumorales, neuropéptidos, antígenos virales, y combinaciones de los mismos. En un aspecto específico, el ácido nucleico puede ser un plásmido que codifica para interleuquina 12. En otro aspecto, el ácido nucleico puede ser un plásmido que codifica para un ácido ribonucleico inhibidor. En aún otro aspecto, el ácido nucleico puede ser un ácido ribonucleico interferente corto sintético. En un aspecto adicional, el ácido nucleico es una molécula antisentido diseñada para inhibir la expresión de un péptido terapéutico.

20 De acuerdo con la invención, el lipopolímero catiónico comprende una cadena principal de polietiliminina que tiene colesterol y polietilenglicol unidos covalentemente al mismo. La cadena principal de polímero catiónico puede comprender además cualquier polímero catiónico conocido por un experto en la técnica que se pueda usar para condensar y concentrar un ácido nucleico de acuerdo con los diversos aspectos de la invención. El lipopolímero catiónico que comprende polietiliminina, puede comprender además poli(trimetiliminina), poli(tetrametiliminina), polipropiliminina, aminoglicósido-poliamina, didesoxi-diamino-b-ciclodextrina, espermina, espermidina, metacrilato de poli(2-dimetilamino)etilo, poli(lisina), poli(histidina), poli(arginina), gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano y combinaciones de los mismos.

25 En un aspecto particular, el lipopolímero consiste en polietiliminina (PEI) enlazada covalentemente independientemente a colesterol y polietilenglicol. En este aspecto, la relación molar PEG:PEI:colesterol promedio en el lipopolímero catiónico es de aproximadamente 2-3:1:0,25-1, y preferiblemente aproximadamente 2,25-2,75:1:0,4-0,8, y más preferiblemente aproximadamente 2,5:1:0,6. En un aspecto particular, dicho lipopolímero tiene un peso molecular (como la base libre) de aproximadamente 3-4 kD, preferiblemente de aproximadamente 3,25-3,75 kD, y más preferiblemente aproximadamente 3,54 kD; la sal de ácido clorhídrico correspondiente tiene un peso molecular de aproximadamente 4-5 kD, preferiblemente aproximadamente 4,5 kD.

30 Además, el peso molecular de una cadena principal de PEI puede variar, dependiendo de numerosos factores incluyendo las propiedades del ácido nucleico, el uso pretendido de la composición, etc. En un aspecto, sin embargo, la cadena principal de PEI puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 500.000 Dalton. Además, el peso molecular de los otros diversos componentes del lipopolímero catiónico también puede variar. En un aspecto, por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 a aproximadamente 20.000 Dalton.

40 En la construcción de las composiciones farmacéuticas de la invención, se ha descubierto que la relación molar entre el nitrógeno de la amina en el lipopolímero catiónico con grupos funcionales y el fosfato en el ácido nucleico (relación N:P) puede afectar el grado en que el ácido nucleico puede condensarse y/o concentrarse. Aunque la relación N:P óptima puede variar algo dependiendo de las características químicas del ácido nucleico, en un aspecto la relación de nitrógeno de la amina en la cadena principal del polímero catiónico con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 100:1. En otro aspecto, la relación de nitrógeno de amina en la cadena principal de polímero catiónico con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 20:1. En aún otro aspecto, la proporción de nitrógeno de amina en la cadena principal de polímero catiónico con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 15:1. En otros aspectos, la relación de nitrógeno de amina con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 100:1, o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1, o de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 100:1. En otro aspecto más, la relación es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 100:1, o más preferiblemente de 10:1 a aproximadamente 20:1. En un aspecto específico, la relación de nitrógeno de amina en la cadena principal del polímero catiónico con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de aproximadamente 11:1.

55 El excipiente de relleno puede proporcionar una variedad de propiedades beneficiosas a la formulación, tales como crioprotección durante la liofilización y reconstitución, unión, equilibrio isotónico, estabilización, etc. Debe entenderse que el material de relleno puede variar entre las composiciones y el relleno particular utilizado no debe considerarse limitante. En un aspecto, por ejemplo, el excipiente de relleno puede incluir diversos azúcares, alcoholes de azúcar, almidones, celulosas y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el excipiente de relleno puede incluir lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrosa, galactosa, manitol, maltitol, maltosa, sorbitol, xilitol, manosa, glucosa, fructosa,

5 polivinilpirrolidona, glicina, maltodextrina, hidroximetil almidón, gelatina, sorbitol, ficol, cloruro de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, polietilenglicol y combinaciones de los mismos. En otro aspecto más, el excipiente de relleno puede incluir lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrosa, galactosa, manitol, maltitol, maltosa, sorbitol, xilitol, manosa, glucosa, fructosa, polivinilpirrolidona, glicina, maltodextrina y combinaciones de los mismos. En un aspecto específico, el excipiente de relleno puede incluir sacarosa. En otro aspecto específico, el excipiente de relleno puede incluir lactosa.

La concentración del excipiente de relleno en la composición puede ser de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, más particularmente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3,0%, e incluso más particularmente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,3%.

10 En algunos aspectos, puede ser beneficioso agregar grupos funcionales al lipopolímero catiónico para permitir el direccionamiento de células o tejidos específicos en un sujeto o cultivo. Dicho direccionamiento es bien conocido, y los ejemplos aquí descritos no deben considerarse limitantes. En un aspecto, por ejemplo, el lipopolímero catiónico puede incluir una fracción de direccionamiento unida covalentemente al lipopolímero catiónico o a la molécula de polietilenglicol. Tal fracción de direccionamiento puede permitir que el lipopolímero catiónico circule sistémicamente en un sujeto para localizar y dirigir específicamente un cierto tipo de célula o tejido. Ejemplos de tales fracciones de direccionamiento pueden incluir transferrina, asialoglicoproteína, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, lipoproteínas de baja densidad, receptores celulares, receptores del factor de crecimiento, receptores de citoquinas, folato, transferrina, insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato, manosa, interleuquinas, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, factores de células madre, eritropoyetina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato, manosa, Lewis^x y sialil Lewis^x, N-acetil-lactosamina, folato, galactosa, lactosa y trombosmodulina, agentes fusogénicos tales como polimixina B y hemaglutinina HA2, agentes lisosomotróficos, señales de localización del núcleo (NLS) tales como antígeno T y combinaciones de los mismos. La selección y unión de una fracción de direccionamiento en particular está dentro del conocimiento de un experto en la técnica.

25 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas liofilizadas que pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo y reconstituirse antes de su uso. En un aspecto, una composición farmacéutica liofilizada puede incluir una mezcla liofilizada de un excipiente de relleno y al menos 0,5 mg/mL de ácido nucleico condensado con un lipopolímero catiónico, en donde el lipopolímero catiónico comprende una cadena principal de PEI que tiene colesterol y polietilenglicol unido covalentemente al mismo y en donde la relación molar de colesterol con respecto a la cadena principal de PEI está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 y la relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. La composición farmacéutica liofilizada puede estar en una variedad de formas, que van desde polvos secos hasta mezclas parcialmente reconstituidas.

35 La invención también incluye métodos para fabricar diversas composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleicos condensados. En un aspecto, por ejemplo, se proporciona un método para preparar una composición farmacéutica que tiene un ácido nucleico condensado concentrado en una solución isotónica de al menos 0,5 mg/mL. Tal método puede incluir mezclar un ácido nucleico y un lipopolímero catiónico en un excipiente de relleno, donde el lipopolímero catiónico comprende una cadena principal de PEI que tiene colesterol y polietilenglicol unido covalentemente al mismo y en donde la relación molar de colesterol con respecto a la cadena principal de polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 y la relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de polímero catiónico está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. La mezcla puede liofilizarse hasta un polvo para concentrar la mezcla de ácido nucleico y posteriormente reconstituirse con un diluyente para formar una solución que incluye al menos aproximadamente 0,5 mg/mL de ácido nucleico condensado en una solución isotónica.

45 Generalmente, la composición puede obtenerse mezclando una solución de ácido nucleico con una solución de lipopolímero catiónico en presencia de un azúcar disacárido seguido por liofilización y reconstitución en una solución isotónica. Este proceso es escalable, produciendo desde unos pocos miligramos (escala de laboratorio) hasta varios miles de miligramos (escala GMP) de las formulaciones de ácido nucleico altamente concentradas con vida útil prolongada. Como se ha descrito, el lipopolímero catiónico tiene una cadena principal de polímero catiónico a la que se unen polietilenglicol y colesterol mediante enlaces covalentes. En el caso de una cadena principal de polietilenimina, en un aspecto la estequiometría entre polietilenglicol y polietilenimina y entre colesterol y polietilenimina está en el intervalo de 0,5-10 y 0,1-10, respectivamente. La composición química del polímero catiónico puede ser importante para obtener formulaciones altamente concentradas de ácidos nucleicos estables. Los polímeros catiónicos que no presentan colesterol y unión al PEG no tienden a producir formulaciones estables y altamente concentradas, como se muestra en la sección de Ejemplos más adelante.

55 Las composiciones de acuerdo con aspectos de la invención pueden combinarse también con otros complejos condensados de ácido nucleico para conseguir una mayor estabilidad de los complejos a concentraciones de ácido nucleico elevadas. Por ejemplo, pueden añadirse diversas cantidades de PEG-PEI-colesterol para aumentar la estabilidad de otros sistemas de suministro de ácido nucleico que son generalmente inestables a altas concentraciones de ácido nucleico.

En diversos aspectos, los sistemas de suministro sintéticos incluyen un ácido nucleico y un vehículo catiónico que puede prepararse mediante diversas técnicas disponibles en la técnica. Se conocen varios portadores catiónicos para ácidos nucleicos: por ejemplo, polietilenimina, poli(trimetilenimina), poli(tetrametilenimina), polipropilenimina, aminoglicósido-poliamina, didesoxi diamino-b-ciclodextrina, espermina, espermidina, metacrilato de poli(2-dimetilamino)etilo, poli(lisina), poli(histidina), poli(arginina), gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano, lípidos catiónicos tales como 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilo)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de 1-[2-(oleoilo)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxi)imidazolinio (DOTIM), trifluoroacetato de 2,3-dioleoxi-N-[2(espermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), clorhidrato de 3β-[N-(N',N'-dimetil-aminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Colesterol HCl), diheptadecilamidoglicil espermidina (DOGS), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi)etilamonio (DMRIE), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC) y combinaciones de los mismos. Cuando estos sistemas de suministro se combinan con PEG-PEI-colesterol, se aumenta la estabilidad del sistema de suministro de ácido nucleico.

Aspectos de la invención también proporcionan métodos de uso de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, en un aspecto, un método de transfectar una célula de mamífero puede incluir el contacto de la célula de mamífero con una composición como la descrita aquí, e incubar la célula de mamífero en condiciones para permitir que la composición entre en la célula y provocar la actividad biológica del ácido nucleico. Dichas técnicas de transfección son conocidas por los expertos en la técnica. Adicionalmente, en otro aspecto puede transfectarse un tejido diana suministrando la composición a un organismo o sujeto de sangre caliente. Tal administración puede ser por una forma de administración tal como intratumoral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intratraqueal, intrahepática portal, oral, intracraneal, intramuscular, intraarticular y combinaciones de los mismos. Dicho tejido diana puede incluir cualquier tejido o subconjunto de tejido que se beneficiaría de la transfección. Por ejemplo, y sin limitación, dicho tejido diana puede incluir ovario, útero, estómago, colon, recto, hueso, sangre, intestino, páncreas, mama, cabeza, cuello, pulmones, bazo, hígado, riñón, cerebro, tiroides, próstata, vejiga urinaria, tiroides, piel, cavidad abdominal, cavidad torácica y combinaciones de los mismos.

25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para promover una comprensión más clara de ciertas realizaciones de la invención, y no se entienden en modo alguno como limitación de la misma.

Preparación A

30 Se disuelve un gramo de polietilenimina ramificada (PEI) 1.800 Da (0,56 mM) en 5 mL de cloroformo y se coloca en un matraz de fondo redondo y se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se disuelven trescientos ochenta miligramos de cloroformiato de colesterilo (0,84 mM) y 500 mg de metoxipolietilenglicol activado (MPEG-SPA, N-hidroxisuccinimidil éster del ácido metoxipolietilenglicol-propiónico) (550 Da) (0,91 mM) en 5 mL de cloroformo y se transfieren a un embudo de adición que está situado en la parte superior del matraz de fondo redondo que contiene la solución de PEI. La mezcla de cloroformiato de colesterilo y MPEG-SPA en cloroformo se añade lentamente a la solución de PEI durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. La solución se agita durante 4 horas más a temperatura ambiente. Después de eliminar el disolvente mediante un evaporador rotatorio, el material pegajoso restante se disuelve en 20 mL de acetato de etilo con agitación. El producto se precipita del disolvente añadiendo lentamente 20 mL de n-hexano; el líquido se decanta del producto. El producto se lava dos veces con una mezcla de 20 mL de acetato de etilo / n-hexano (1/1; v/v). Después de decantar el líquido, se seca el material mediante purga con gas nitrógeno durante 10-15 minutos. El material se disuelve en 10 mL de HCl 0,05 N para preparar la forma salina de los grupos amina. La solución acuosa se filtra a través de papel de filtro de 0,2 μ m. El producto final se obtiene por liofilización.

La proporción molar de este ejemplo de preparación es 3,0 moles de MPEG-SPA y 1,28 moles de colesterilo conjugado con una mol de moléculas de PEI.

Preparación B

45 Se mezclan veinte gramos (11,1 mmol) de PEI ramificada (BPEI) y 200 mL de cloroformo seco para disolver la BPEI. Después de la disolución, se añade gota a gota una solución que contiene 4 g de cloroformiato de colesterilo y 18,7 g (26 mmol) de metoxipolietilenglicol activado (MPEG-SPA N-hidroxisuccinimidil éster del ácido metoxipolietilenglicol-propiónico, MPEG PM 550, éster PM 719) en 200 mL de cloroformo seco a la mezcla de reacción con agitación durante 20-30 min seguido de un período de incubación de 3-4 horas. La mezcla se pone después al vacío para concentrar la solución y eliminar el cloroformo residual. El residuo resultante se disuelve en 320 mL de HCl acuoso 1 M y se agita. Esta solución de clorhidrato de PPC se concentra de nuevo bajo vacío, produciendo un material altamente viscoso. Para aislar el clorhidrato de PPC y eliminar los subproductos de la reacción y los materiales de partida sin reaccionar, se combina la mezcla concentrada con acetona (<0,4% de agua) y se agita lo que conduce a la precipitación con clorhidrato de PPC como material de flujo libre. Después de la precipitación, el líquido sobrenadante es desechado. El clorhidrato de PPC higroscópico se seca al vacío.

5 Los complejos de ADN-polímero se generan primero preparando PPC y ADN a las concentraciones apropiadas en lactosa al 10%. Las soluciones madre de polímero catiónico (5 mg/mL) y de ADN (3 mg/mL) en agua para inyección se diluyen en una solución de lactosa que oscila entre 0,3 y 3%: éstas son necesarias para alcanzar una concentración final de lactosa al 10% tras la reconstitución. A continuación, se añade gota a gota el ADN con agitación a la solución de PPC y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente para formar los complejos.

Se añaden 500 µl de la composición preparada a viales de vidrio de borosilicato de 2 mL y se colocan en un secador. Los viales se enfrían a -34°C durante 4 horas antes del comienzo del secado primario. Después de 24 horas, se eleva la temperatura del estante hasta 20°C y se mantiene al vacío durante otras 24 horas. Finalmente, la temperatura de la estantería se eleva a 4°C y los viales se tapan al vacío.

10 Preparación C

15 Se disuelven ciento ochenta miligramos de PEI 1800 ramificada (0,1 mM) en 4 mL de cloroformiato y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelven 70 miligramos de cloroformiato de colesterilo (0,14 mM) y 48 mg de PEG 330 (0,14 mM) en 1 mL de cloroformiato, y se añade lentamente a la solución de PEI durante 3-10 minutos usando una jeringa. La mezcla se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la adición de 10 mL de acetato de etilo para la precipitación, la solución se incuba durante la noche a -20°C, y luego el líquido se decanta del matraz. El material restante se lava 2 veces con una mezcla de 5 mL de acetato de etilo/n-hexano (1/1; v/v). El material restante se seca mediante purga de nitrógeno durante 10-15 minutos, se disuelve en 10 mL de HCl 0,05 N durante 20 minutos y después la solución se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. La solución acuosa se liofiliza mediante secado por congelación para eliminar el agua de los polímeros.

20 La relación molar de esta preparación es de 0,85 moles de PEG y 0,9 moles de colesterol conjugados con una mol de moléculas de PEI.

Preparación D

25 Se disuelven quinientos miligramos de PEI lineal de 25 kDa (0,02 mM) en 30 mL y se agita a 65°C durante 30 minutos. El matraz de tres bocas está equipado con un embudo de condensación y adición. Se añade lentamente una mezcla de 200 mg de mPEG-NHS 1000 (0,2 mM) y 40 mg de cloroformiato de colesterilo (0,08 mM) en 5 mL de cloroformio a la solución de PEI durante 3-10 minutos. La solución se agita constantemente durante 4 horas adicionales a 65°C, y después se reduce el volumen hasta aproximadamente 5 mL en un evaporador rotatorio. La solución se precipita en 50 mL de éter etílico para eliminar el colesterol libre, se decanta el líquido del matraz y el material restante se lava dos veces con 20 mL de éter etílico. Después de secar con nitrógeno puro, el material se disuelve en una mezcla de 10 mL de HCl 2,0 N y 2 mL de ácido trifluoroacético. La solución se dializa contra agua desionizada utilizando un tubo de diálisis MWCO 15000 durante 48 horas con cambio de agua fresca cada 12 horas. La solución se liofiliza para eliminar el agua.

La relación molar de esta preparación es 12,0 moles de PEG y 5,0 moles de colesterol conjugados a una mol de moléculas de PEI.

35 Preparación E

40 Se disuelve un gramo de PEI (PM: 1200 Dalton) en una mezcla de 15 mL de cloruro de metileno anhidro y 100 µl de trietilamina (TEA). Después de agitar sobre hielo durante 30 minutos, se añaden lentamente 1,2 g de solución de cloroformiato de colesterilo a la solución de PEI y la mezcla se agita durante la noche sobre hielo. El producto resultante se precipita añadiendo éter etílico seguido de centrifugación y posterior lavado con éter etílico y acetona adicionales. El lipopolímero insoluble en agua se disuelve en cloroformio para hasta una concentración final de 0,08 g/mL. Después de la síntesis y purificación, el lipopolímero insoluble en agua se caracteriza usando MALDI-TOFF MS y RMN ¹H.

La medición por RMN del lipopolímero 1200 insoluble en agua muestra que la cantidad de colesterol conjugado con la PEI es de aproximadamente 40%. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF del lipopolímero insoluble en agua muestra que su peso molecular es aproximadamente 1.600.

45 Preparación F

50 Se agitan tres gramos de PEI (PM: 1.800 Dalton) durante 30 minutos sobre hielo en una mezcla de 10 mL de cloruro de etileno anhidro y 100 µl de trietilamina. Se disuelve un gramo de cloroformiato de colesterilo en 5 mL de cloruro de metileno anhidro enfriado con hielo y luego se añade lentamente durante 30 minutos a la solución de PEI. La mezcla se agita durante 12 horas sobre hielo y el producto resultante se seca en un evaporador rotatorio. El polvo se disuelve en 50 mL de HCl 0,1 N. La solución acuosa se extrae tres veces con 100 mL de cloruro de metileno y después se filtra a través de un filtro de microfibras de vidrio. El producto se concentra por evaporación con disolvente, se precipita con un gran exceso de acetona y se seca al vacío. El producto se analiza usando espectrofotometría de masas MALDI-TOF y

10 RMN ¹H. Los resultados de RMN del lipopolímero 1800 soluble en agua muestran que la cantidad de colesterol conjugado con PEI es de aproximadamente 47%. El análisis espectrométrico de masas MALDI-TOFF de PEACE muestra que su peso molecular es de aproximadamente 2.200. Esto sugiere que la mayoría de PEACE 1800 tiene una relación molar 1/1 de colesterol y PEI, aunque algunas no estaban conjugadas o conjugadas en una relación molar de 2/1 (colesterol/PEI).

Preparación G

Se disuelven cincuenta miligramos de PEI 1800 en 2 mL de cloruro de metileno anhidro sobre hielo. A continuación, se añaden lentamente 200 µl de clorofornato de bencilo a la mezcla de reacción y la solución se agita durante cuatro horas sobre hielo. Después de agitar, se añaden 10 mL de cloruro de metileno y la solución se extrae con 15 mL de NH₄Cl saturado. Se retira agua de la fase de cloruro de metileno usando sulfato de magnesio. El volumen de la solución se reduce al vacío y el producto, PEI protegida con CBZ, se precipita con éter etílico. Se disuelven cincuenta miligramos de PEI protegida con amina primaria CBZ en cloruro de metileno, se añaden 10 mg de clorofornato de colesterol y la solución se agita durante 12 horas sobre hielo. El producto lipopolímero protegido con CBZ, se precipita con éter etílico, se lava con acetona, y luego se disuelve en DMF que contiene carbón activado con paladio como catalizador bajo atmósfera de H₂ como donador de hidrógeno. La mezcla se agita durante 15 horas a temperatura ambiente, se filtra a través de CELITE® y se reduce el volumen de la solución mediante un evaporador rotatorio. El producto final se obtiene a partir de la precipitación con éter etílico.

Preparación H

Se disolvieron quinientos miligramos de NH₂-PEG-COOH 3400 (0,15 mM) en 5 mL de cloroformo anhidro a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añade lentamente una solución de 676 mg de clorofornato de colesterol (1,5 mM) en 1 mL de cloroformo anhidro a la solución de PEG y después se agita durante 4 horas más a temperatura ambiente. La mezcla se precipita en 500 mL de éter etílico sobre hielo durante 1 h, y después se lava tres veces con éter etílico para eliminar el colesterol no conjugado. Después de secar con purga de nitrógeno, el polvo se disuelve en 5 mL de HCl 0,05 N para acidificar los grupos carboxilo en el PEG. El material se seca mediante un liofilizador. Se disuelven cien miligramos de PEI 1800 (0,056 mM), 50 mg de DCC y 50 mg de NHS en 5 mL de cloroformo a temperatura ambiente, se agita la mezcla durante 20 minutos y después se añade una solución de 380 mg de col-PEG-COOH en 1 mL de cloroformo a la solución de PEI. Después de agitar durante seis horas a temperatura ambiente, se separó el disolvente orgánico con un evaporador rotatorio. El material restante se disolvió en 10 mL de agua desionizada y se purificó mediante FPLC.

Ejemplo 1

Preparación de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico condensado con un lipopolímero catiónico

Este ejemplo ilustra la preparación de formulaciones altamente concentradas de ácido nucleico totalmente condensado en la producción a escala de laboratorio. Esto implica la preparación de complejos de ácidos nucleicos con un polímero catiónico seguido por liofilización y reconstitución a soluciones isotónicas. El ácido nucleico utilizado es un ADN plasmídico que codifica para el gen de IL-12 o luciferasa, y el polímero comprendía una cadena principal de polietiliminina (PEI) enlazada covalentemente a polietilenglicol (PEG) y colesterol (Col) (PEG-PEI-Col o PPC). La relación molar entre PEG y PEI y entre colesterol y PEI es de 0,5-10 y 0,1-10, respectivamente. En primer lugar, las disoluciones de ADN y PPC se preparan por separado a razón de 5 mg/mL en agua para inyección y posteriormente se diluye a 0,15 mg/mL (ADN) y 0,554 mg/mL (PPC) al 3% de lactosa. El ADN en solución de lactosa se añade al PPC en solución de lactosa usando una micropipeta con una relación de nitrógeno a fosfato (relación N:P) de 11:1, y la formulación se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que los complejos se formen. Los complejos de PPC/ADN en lactosa al 3% se liofilizan utilizando un sistema liofilizador FREEZONE de LABCONCO Corp. Kansas City, MO. Se añaden 500 µl de formulación preparada a viales de vidrio de borosilicato de 2 mL que después se liofilizan usando un programa de liofilización que consiste en los siguientes segmentos:

- 1) segmento de congelación (rampa 0,25°C/min, mantener a 34°C durante 4 horas),
- 2) segmento de secado primario (mantener a 34°C durante 24 horas),
- 3) segmento de secado secundario (rampa a 20°C y retención durante 24 horas), y
- 4) rampa hasta 4°C a 0,25°C/min.

El polvo liofilizado resultante se reconstituye con agua para inyección a diversas concentraciones que van desde 0,1 mg/mL hasta 20 mg/mL de ADN. Un lote típico de preparación a pequeña escala ascendió a 100-200 mg de ADN completamente formulado.

Ejemplo 1A

5 Se prepara una formulación de ácido nucleico / lipopolímero catiónico esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1 usando un lipopolímero catiónico y ácido nucleico de IL-12 a una relación N:P de 11:1. El lipopolímero catiónico tiene una relación molar PEG:PEI:colesterol de aproximadamente 2,5:1:0,6, y un peso molecular (como la base libre) de aproximadamente 3,54 kD. La formulación resultante que contiene lactosa se liofiliza y se puede reconstituir a concentraciones de ácido nucleico de al menos aproximadamente 0,5 mg/mL sin aglomeración del ácido nucleico o pérdida de actividad de transfección significativa.

Ejemplo 2

Preparación de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico condensado con un lipopolímero catiónico

10 Este ejemplo ilustra una preparación de formulaciones altamente concentradas de ácido nucleico condensado, como se muestra en la Fig. 1. Este protocolo ha producido más de 6.000 mg de ADN completamente formulado (en comparación con 100-200 mg de ADN producido a partir de la preparación a pequeña escala descrita en el Ejemplo 1) y se puede expandir hasta cantidades de producción aún mayores. El método escalado implicó mezclar el ADN a granel y las soluciones de polímero con una bomba peristáltica que logró un escenario de mezcla en línea para formar los complejos
15 seguido por ciclos de liofilización compatibles para una carga grande. Brevemente, las disoluciones de ADN y PPC se preparan a razón de 0,3 mg/mL y 1,1 mg/mL en lactosa al 3%, respectivamente. Los dos componentes se combinan a una velocidad de flujo constante usando una bomba peristáltica (WATSON MARLOW, SCI 400) con un diámetro interno de 0,89 mm de tubo de silicio (WATSON MARLOW, Z982-0088) a un caudal de 225 ± 25 mL / min. Las dos mezclas están unidas por un conector en T de polipropileno en el extremo de cada tubo. La mezcla de polímero y soluciones de
20 ADN dio lugar a la formación instantánea de nanopartículas. Se colocan 40 mililitros de los complejos formulados en viales de vidrio de 100 mL y se liofilizan usando un programa de liofilización que consiste en los siguientes segmentos:

1) congelar previamente a -50 C durante hasta 720 minutos,

2) secado primario a -40°C durante hasta 180 minutos y a continuación a -34°C durante hasta 80 minutos a 65 µm de Hg y

25 3) secado secundario a -25°C durante hasta 720 minutos, -15°C durante hasta 3180 minutos, -10°C durante hasta 1500 minutos y 4°C durante hasta 1440 minutos a 65 µm de Hg.

El polvo liofilizado resultante se reconstituye con agua para inyección a diversas concentraciones que van desde 0,1 mg/mL hasta 20 mg/mL de ADN. Un lote típico de esta escala asciende a 6.000 mg de ADN completamente formulado.

Ejemplo 3

30 Medición del tamaño de partícula de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico condensado con un lipopolímero catiónico

Se preparan formulaciones altamente concentradas de ADN de plásmido con lipopolímero catiónico, PPC, como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Para la medición del tamaño de partícula polímero / ácido nucleico, se analiza una parte
35 alícuota de la formulación líquida utilizando 90PlusBI-MAS Particle Sizer de BROOKHAVEN INSTRUMENTS Corp., Holtsville, NY. Específicamente, se añaden 50 µl de formulación a 950 µl de agua milli-Q en cubetas de poliestireno para su análisis.

La Fig. 2 ilustra el tamaño de partícula de los complejos de ADN / PPC en formulaciones previamente liofilizadas o no
40 concentradas (0,15 mg/mL de ADN) y después de la reconstitución a concentraciones más altas que varían de 0,5 mg/mL a 10 mg/mL con el plásmido de IL-12 (Fig. 2A) o el plásmido de luciferasa (Fig. 2B). La reconstitución a concentraciones más altas no influye significativamente en el tamaño de partícula, lo que sugiere que los complejos son estables.

Ejemplo 4

Análisis de la condensación de ácido nucleico de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con un lipopolímero catiónico

45 En este ejemplo se evalúa la capacidad del polímero PPC para condensar el ADN del plásmido. Se preparan formulaciones altamente concentradas de ADN plasmídico con lipopolímero catiónico, PPC, como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Los complejos ácido nucleico / polímero son sometidos a electroforesis usando gel de agarosa al 1%. La atracción electrostática del ADN de plásmido cargado negativamente con respecto al polímero de PPC cargado

positivamente impide que el ADN se desplace a través del gel de agarosa. Como se muestra en la Fig. 3, se condensa todo el ADN presente en las formulaciones altamente concentradas.

Ejemplo 5

5 Medición de la concentración de ácido nucleico en una formulación líquida concentrada de ácido nucleico con un lipopolímero catiónico

10 La cantidad de ácido nucleico en formulaciones altamente concentradas de complejos de ADN y PPC se cuantifica usando un espectrofotómetro AGILENT 8453 (AGILENT TECHNOLOGIES, Inc. Santa Clara, CA). Se diluyen 50 µl de la formulación con 950 µl de agua para inyección (WFI) en una cubeta de cuarzo y se mide la absorbancia usando una longitud de onda de 260 nm. La concentración de ADN se determina asumiendo una densidad óptica 1 (a 260 nm) = 50 µg / mL de ADN.

Ejemplo 6

Medición de la actividad de transfección de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con un lipopolímero catiónico

15 La actividad de transfección de formulaciones altamente concentradas de complejos de ADN y PPC se determina in vitro. Se hace una comparación directa con la de una formulación no concentrada. Los complejos de transfección que contienen luciferasa o plásmido de IL-12 se preparan mediante los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2 y se reconstituyen hasta concentraciones de ADN que varían entre 0,15 mg/mL y 10 mg/mL. Se siembran células Cos-1 (1,5 x 10⁵ células / pozo) en placas de cultivo de tejidos de 12 pozos en suero bovino fetal al 10% (FBS). Cada pozo se incubaba durante 6 horas con 4 µg de ADN complejado en ausencia de FBS en un volumen total de 500 µl de medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco/Vogt (DMEM). Cuando se concluye el período de incubación, se reemplaza el medio por 1 mL de DMEM fresco suplementado con FBS al 10% durante otras 40 horas. Al final del período de incubación, se midió la actividad de transfección en el medio de cultivo celular (IL-12) o lisado celular (luciferasa). Para medir los niveles de IL-12, se analiza el medio de cultivo celular directamente mediante un ensayo de ELISA para IL-12. Para la medición de luciferasa, las células se lavan con solución salina amortiguada con fosfato y se lisan con amortiguador TENT (Tris-Cl 50 mM [pH 8,0] EDTA 2 Mm, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%). La actividad de luciferasa en el lisado celular se mide como unidades de luz relativas (RLU) usando un luminómetro de microplaca Orion (BERTHOLD DETECTION SYSTEMS, Oak Ridge, TN). Los valores finales de luciferasa se reportan en términos de RLU/mg de proteína total. El nivel de proteína total se determina usando un kit de ensayo de proteína BCA (PIERCE BIOTECHNOLOGY, Inc., Rockford, IL). Los niveles de expresión de IL-12 y luciferasa a partir de formulaciones altamente concentradas de IL-12 y complejos de plásmido de luciferasa / PPC se muestran en la Fig. 4A y Fig. 4B, respectivamente. Los datos muestran que la actividad de transfección de los complejos de ácido nucleico en forma altamente concentrada se conserva.

Ejemplo 7

35 Evaluación de diversos azúcares excipientes en la preparación de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con lipopolímero catiónico y su caracterización

40 Se evalúan dos azúcares comúnmente usados, lactosa y sacarosa, como potenciales agentes de relleno o carga durante el proceso de liofilización para la preparación de formulaciones altamente concentradas. Los complejos de PPC / ADN se preparan en lactosa y sacarosa cada uno al 3%, 1,5% y 0,3%. Las formulaciones se liofilizan usando el protocolo como en el Ejemplo 1. Después del proceso de liofilización, las formulaciones se reconstituyen con WFI hasta una concentración final de ADN de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL y 5 mg/mL. El tamaño de partícula y la transferencia génica *in vitro* se evalúan para estas diversas formulaciones. Como se muestra en la Tabla 1, se conserva tanto el tamaño de partícula como la actividad de transfección, ya sea que el relleno crioprotector sea sacarosa o lactosa. Estos resultados muestran que se puede usar más de un tipo de azúcar para preparar concentraciones fisicoquímica y biológicamente estables de ácido nucleico con polímero catiónico.

45 Tabla 1

Evaluación de azúcares excipientes en la preparación de formulaciones isotónicas concentradas de ácido nucleico con polímero catiónico.			
Lactosa (p/v)	ADN (mg/m)	Tamaño de partícula (nm)	Expresión de Luc (RLU/mg de proteína)

Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.
10,0%	N/A	0,15	N/A	117,00	N/A	8.160.748	
3,0%	10,0%	0,15	0,50	123,00	200,00		9.484.771.98
1,5%	10,0%	0,15	1,0	121,00	135,00		7.492.002.47
0,3%	10,0%	0,15	5,00	150,00	209,00		6.442.482.87
Sacarosa (p/v)		DNA (mg/m)		Tamaño de partícula (nm)		Expresión de Luc (RLU/mg de proteína)	
Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.	Pre-Lio.	Post-Lio.
10,0%	N/A	0,15	N/A	160,00	N/A	12.698.431	
3,0%	10,0%	0,15	0,50	137,00	154,00		5.995.053
1,5%	10,0%	0,15	1,00	125,00	206,00		8.004.970
0,3%	10,0%	0,15	5,00	131,00	244,00		9.066.137

Ejemplo 8

Expresión de IL-12 en el parénquima cerebral normal después de la expresión intracraneal de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con lipopolímero catiónico

5 Se examina la administración directa de plásmido de IL-12 con polímero catiónico, PPC, en tejido cerebral normal para determinar si la formulación altamente concentrada de ácido nucleico y lipopolímero catiónico es biológicamente activa in vivo. La tinción inmunohistoquímica de la IL-12 se realiza en rebanadas de cerebros de animales sacrificados 14 días o 1 mes después del tratamiento. El parénquima cerebral de los animales tratados con PPC solo no mostró ninguna tinción con IL-12 (Figura 5A). En contraste, parénquima cerebral de los ratones inyectados con pmIL-12/PPC se tiñó intracranealmente positivamente para IL-12 (Figura 5B). Este experimento demuestra que la actividad biológica de los complejos de ácido nucleico con un polímero catiónico se conserva durante el proceso de concentración. Además, se puede concluir que la citoquina sigue presente durante al menos un mes después de la inyección. Además, la presencia de esta citoquina en los cerebros de animales que permanecieron vivos hasta la eutanasia sugiere que la expresión real de IL-12 no causa toxicidad letal en el cerebro.

15 Ejemplo 9

Eficacia de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con lipopolímero catiónico en un modelo de glioma de ratón

20 La eficacia anticancerígena de formulaciones altamente concentradas de ácido nucleico completamente complejo que expresa el gen de IL-12 se examina en un modelo de glioma de ratón. Se implantan tumores en la corteza cerebral de ratones mediante inyección intracraneal de 1×10^5 células de glioma GL261 junto con la inyección conjunta de 3 μ l de complejos de IL-12 / PPC a partir de una formulación altamente concentrada de 5 mg/mL de ADN plasmídico de IL-12. Se hace seguimiento a los animales para detectar cualquier signo de neurotoxicidad y se les realiza autopsia, cuando sea posible, para confirmar que la muerte se debe al tumor intracraneal. La supervivencia se representa mediante un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Una sola inyección intracraneal de los complejos de pmIL-12/PPC administrados a razón de 15 μ g de la dosis del plásmido es bien tolerada ya que no se observan efectos adversos significativos. Una sola inyección de los complejos de pmIL-12/PPC a razón de 15 μ g de la dosis del plásmido produjo un aumento significativo en la supervivencia animal (Figura 6).

Ejemplo 10

30 Actividad biológica de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con lipopolímero catiónico en pacientes con cáncer de ovario

5 La actividad biológica de la formulación altamente concentrada de ácido nucleico totalmente condensado que expresa el gen de IL-12 se examina en pacientes con cáncer de ovario recurrente. Cuatro administraciones intraperitoneales semanales de formulaciones isotónicas altamente concentradas de plásmido de IL-12 y PPC en mujeres con cáncer de ovario recurrente produjeron niveles significativos de IFN- γ , un marcador sustituto de IL-12, en el fluido peritoneal de pacientes tratados. Los niveles de IFN- γ varían de 20 a 275 pg/mL de fluido peritoneal. Estos datos demuestran que la formulación altamente concentrada de ácido nucleico de IL-12 es adecuada para la aplicación clínica.

Ejemplo 11

Evaluación del efecto de la composición química del polímero catiónico sobre las propiedades de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con lipopolímero catiónico

10 Los intentos previos han demostrado que la concentración de formulaciones de ácido nucleico con portadores génicos catiónicos tales como lípidos o polímeros, es altamente desafiante debido a la escasa estabilidad y pérdida de transfección como resultado del proceso de concentración. Para determinar si el éxito en la producción de concentraciones fisicoquímica y biológicamente estables de ácido nucleico completamente condensado es único para la composición química del polímero catiónico de ensayo, PEG-PEI-Colesterol (PPC), se someten a prueba otros
15 polímeros catiónicos, incluyendo el de PEI libre, PEI ligado al colesterol o PEI ligado a PEG y un liposoma catiónico DOTAP. Los complejos de ADN se preparan a razón de 0,15 mg/mL y luego se concentran hasta 0,5 y 5 mg/mL como se describe en el Ejemplo 1. El tamaño de partícula y la actividad de transfección se determinan como se describe en los Ejemplos 3 y 6. Como se muestra en las Figs. 7 y 8, los complejos de ADN preparados con PEI libre (PEI1800, PEI15000, PEI 25000) o PEI-Colesterol, PEI-PEG o lípido catiónico DOTAP no produjeron complejos estables ya que
20 estos complejos se agregaron y perdieron la actividad de transfección después de liofilización y reconstitución para 0,5 mg/mL o 5 mg/mL. Los efectos desestabilizadores son más prominentes a 5 mg/mL que a 0,5 mg/mL. En comparación, los complejos de ADN preparados con PEG-PEI-colesterol (PPC) mantienen sus propiedades fisicoquímicas y de transfección durante la liofilización y reconstitución a altas concentraciones de ADN (Figuras 7 y 8). Estos resultados sugieren la modificación covalente del polímero catiónico con colesterol y el PEG es crítico para la preservación de la
25 actividad durante el proceso de concentración.

Ejemplo 12

Estabilidad a largo plazo de las formulaciones líquidas liofilizadas o concentradas de ácido nucleico con polímero catiónico

30 Se preparan lotes a gran escala de complejos de IL-12/PPC liofilizados bajo cGMP con el método descrito en el Ejemplo 2 y se almacenan a -80°C, -20°C, 4°C y 25°C (HR del 60%) para la evaluación de la estabilidad. En el momento del análisis, se sacaron los viales del almacenamiento y se añaden 2,4 mL de WFI. Para cada muestra se midieron el pH, la concentración de ADN, la osmolalidad, el tamaño de partícula y la actividad biológica. Como se muestra en la Figura 9, la concentración de ADN, el pH, la osmolalidad y el tamaño de partícula de los complejos de IL-12 / PPC se mantienen durante el almacenamiento de dos años a las temperaturas indicadas. La actividad de transferencia génica de pIL-12/
35 PPC se cuantifica en células COS-1 como se describe en el Ejemplo 6. Las células COS-1 se transfectan con el material biológico a razón de 4 μ g de ADN. Los niveles de IL-12 en medios de cultivo celular se cuantifican 48 horas después de la transfección con un kit de ELISA comercialmente disponible. Los resultados de bioactividad del estudio de estabilidad de dos años se ilustran en la Figura 9. No hay ningún cambio significativo en la bioactividad del producto biológico durante el período de almacenamiento a -80°C o -20°C. En el tiempo 0, la actividad es 151 \pm 130 pg/mL y el resto de los datos fluctúa dentro de esta desviación estándar, excepto para 25°C donde hay una disminución consistente en el tiempo. A 4°C se observa una caída en la actividad de transfección a los 360 días, pero debido a muestras insuficientes no hay puntos de tiempo de seguimiento disponibles para alcanzar una evaluación concluyente.
40

Ejemplo 13

Estabilidad del material reconstituido de formulaciones líquidas concentradas de ácido nucleico con polímero catiónico

45 La estabilidad del material reconstituido se examina en un estudio separado. Los complejos de ADN de plásmido IL-12/ PPC liofilizados se preparan de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 y se reconstituyen en agua para inyección a razón de 0,5 mg/mL. El material reconstituido se almacena a 4°C. Las muestras se retiran al día 60 y 90 y se analizan con respecto al tamaño de partícula, osmolalidad y expresión génica. El producto liofilizado almacenado en viales sellados a -80°C se analiza simultáneamente para comparación. Como se muestra en la Tabla 2, el EGEN-001 reconstituido es estable a 4°C durante al menos 90 días después de la reconstitución con WFI. Ninguno de los
50 parámetros de estabilidad, incluyendo la concentración de ADN, el tamaño de partícula, la osmolalidad o la expresión génica, se altera significativamente cuando se compara con el material liofilizado almacenado en viales sellados a -80°C.

Tabla 2

Estabilidad a largo plazo de la forma reconstituida de formulaciones isotónicas altamente concentradas y totalmente condensadas de ácido nucleico con polímero catiónico a 4°C.						
Parámetros de estabilidad	Días					
	0	60	90	180	270	365
Tamaño de partícula (nm)	102	98	101	97	103	98
Osmolaridad (mOsmol)	303	309	303	312	312	306
pH	2,75	2,66	2,69	2,7	2,73	2,59
ADN (mg/mL)	0,49	0,49	0,50	0,47	0,50	0,50
Expresión de IL-12 (pg/mL)	1220	1681	1164	1062	1409	476,3

Ejemplo 14

Preparación de formulaciones de ADN estables altamente concentradas de sistemas de suministro de ácido nucleico sintético por formulación conjunta con PEG-PEI-Colesterol.

- 5 Se añade PEG-PEI-Colesterol a sistemas de suministro de ácido nucleico sintético existentes para aumentar la estabilidad de formulaciones de ácido nucleico que son generalmente inestables a altas concentraciones de ácido nucleico.

10 En un ejemplo, se añade PEG-PEI-colesterol a formulaciones de ADN preparadas con polietilenimina lineal de 25 kDa (LPEI25kD). Las formulaciones de ADN a una concentración de 0,15 mg/mL pueden prepararse con LPEI25kD a razón de 10:1 (relación N:P) en presencia de lactosa al 3%. El lipopolímero PEG-PEI-Colesterol puede añadirse entonces al complejo de LPEI25kD/ADN a diversas relaciones de PPC con respecto al ADN formulado. Por ejemplo, PPC/ADN (relaciones N:P) puede ser (0:1), (1:1), (5:1), (7,5:1), (11:1) y (20:1). Se pueden añadir 500 µl de cada formulación a 2 mL de viales de vidrio de borosilicato y luego se liofilizan en un sistema de liofilización. El programa de liofilización consta de los siguientes segmentos:

- 15 1) Segmento de congelación (rampa de 0,25°C/min, mantener a -34°C durante 4 horas),
 2) Segmento de secado primario (mantener a -34°C durante 24 horas),
 3) Segmento de secado secundario (rampa a -20°C y mantener durante 24 horas), y
 4) Rampa a 4°C a razón de 0,25°C/min.

20 Las formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con agua para inyección a razón de 0,5 mg/mL u otra concentración adecuada.

25 Debe entenderse que las composiciones descritas anteriormente y los modos de aplicación son sólo ilustrativos de realizaciones preferidas de la invención. Numerosas modificaciones y disposiciones alternativas pueden ser ideadas por los expertos en la técnica y las reivindicaciones adjuntas están destinadas a cubrir tales modificaciones y disposiciones. Por lo tanto, aunque la invención se ha descrito anteriormente con particularidad y detalle en relación con lo que actualmente se considera que son las realizaciones más prácticas y preferidas de la invención, será evidente para los expertos en la técnica que pueden hacerse numerosas modificaciones, pero sin limitarse a, variaciones de tamaño, materiales, aspecto, forma, función y modo de operación, montaje y uso.

30

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende:
 - 5 (a) una mezcla de un lipopolímero catiónico y al menos 0,5 mg/mL de un ácido nucleico suspendido en una solución acuosa, donde

el lipopolímero catiónico comprende una cadena principal de polietilenimina (PEI) unida covalentemente independientemente a grupos colesterol y polietilenglicol, y la relación molar de colesterol a polietilenimina es de 0,1 a 10 y la relación molar de polietilenglicol a polietilenimina es de 0,1 a 10; y
 - (b) un excipiente de relleno.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende ácido nucleico condensado.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la relación molar de nitrógeno de amina en la cadena principal de polietilenimina con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de 0,1:1 a 100:1.
- 15 4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ácido nucleico es un plásmido que codifica para un péptido seleccionado del grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 4, interleuquina 7, interleuquina 12, interleuquina 15, interferón α , interferón β , interferón γ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, agentes angiogénicos, factores de coagulación, agentes hipoglucémicos, factores de apoptosis, agentes antiangiogénicos, timidina quinasa, p53, IP10, TNF- α , ligando Fas, antígenos tumorales, neuropéptidos, antígenos virales, antígenos bacterianos, y combinaciones de los mismos.
- 20 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 anterior, en la que una relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de polietilenimina en el lipopolímero catiónico está dentro del intervalo de 1 a 10.
6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el excipiente de relleno es un miembro seleccionado del grupo que consiste en azúcares, alcoholes de azúcar, almidones, celulosas y combinaciones de los mismos.
- 25 7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ácido nucleico es un plásmido que codifica para el gen de la interleuquina 12.
8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos parte del ácido nucleico forma un complejo y se condensa con el lipopolímero catiónico suspendido en medio acuoso.
- 30 9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación molar PEG:PEI:colesterol en el lipopolímero catiónico está dentro del intervalo de 2-3:1:0,25-1.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos el 30% en peso del ácido nucleico se condensa.
11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación de nitrógeno de amina en la cadena principal de polietilenimina con respecto al fosfato en el ácido nucleico es de 11:1 a 20:1.
- 35 12. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende al menos 0,5 mg/mL de un ácido nucleico suspendido en una solución isotónica, comprendiendo el método:

combinar un ácido nucleico, un lipopolímero catiónico y un excipiente de relleno en un medio acuoso, comprendiendo el lipopolímero catiónico una polietilenimina unida covalentemente independientemente a grupos de colesterol y polietilenglicol y la relación molar del colesterol con respecto a la cadena principal de polietilenimina es de 0,1 a 10 y la

- 40 relación molar de polietilenglicol con respecto a la cadena principal de polietilenimina es de 0,1 a 10;

liofilizar la mezcla hasta un polvo; y

reconstituir el polvo con un diluyente para formar una solución que incluye al menos 0,5 mg/mL de ácido nucleico condensado en una solución isotónica.

13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición es una composición farmacéutica seca.

14. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13 para uso en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos, en la que por ejemplo se transfectan varias células o tejidos.

5 15. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la composición se administra en un organismo de sangre caliente y, en donde la célula está localizada en un tejido seleccionado del grupo que consiste en ovario, útero, estómago, colon, recto, hueso, sangre, intestino, páncreas, mama, cabeza, cuello, pulmones, bazo, hígado, riñón, cerebro, tiroides, próstata, vejiga urinaria, tiroides, piel, cavidad abdominal, cavidad torácica y combinaciones de los mismos.

10

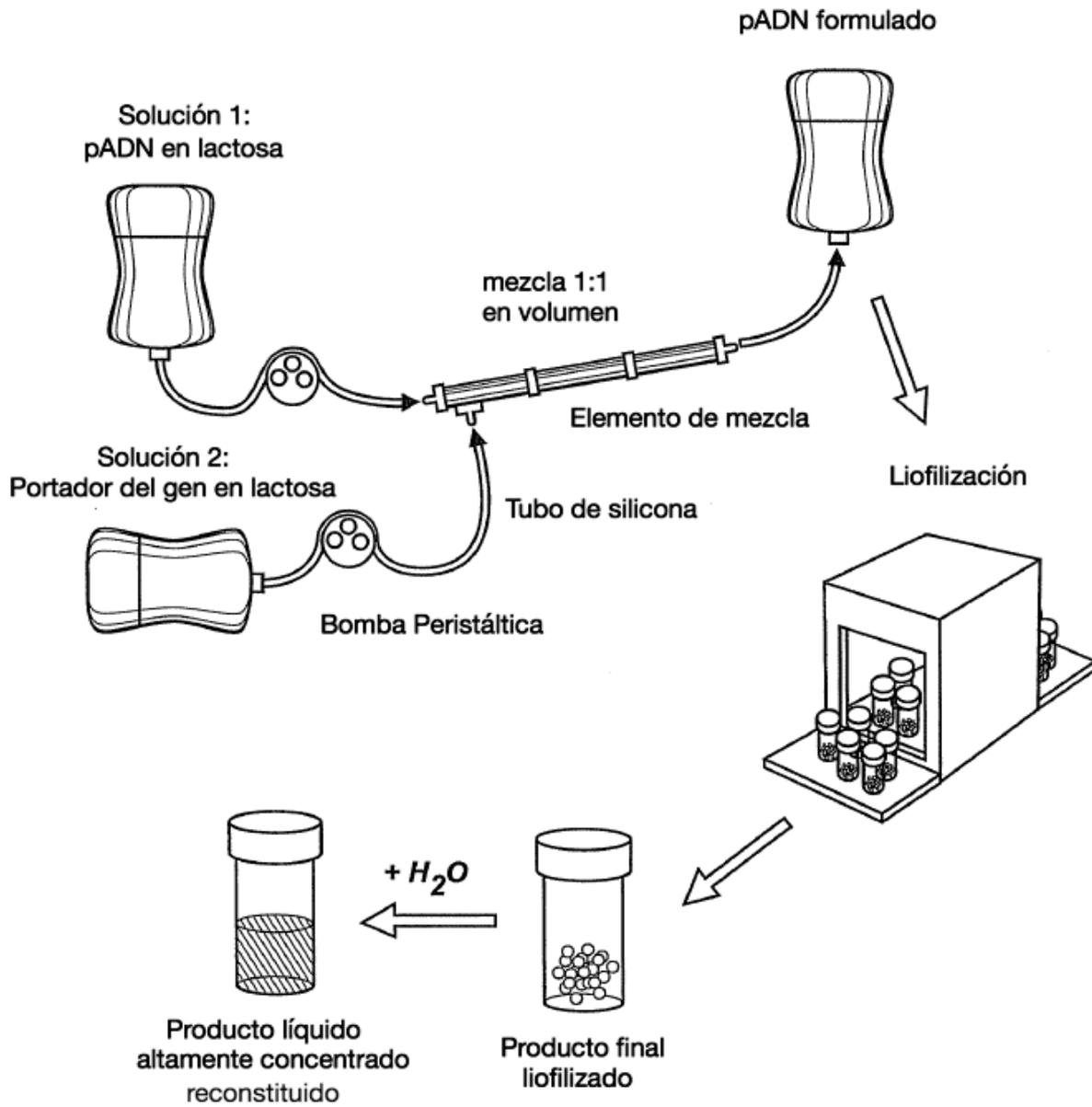


Fig. 1

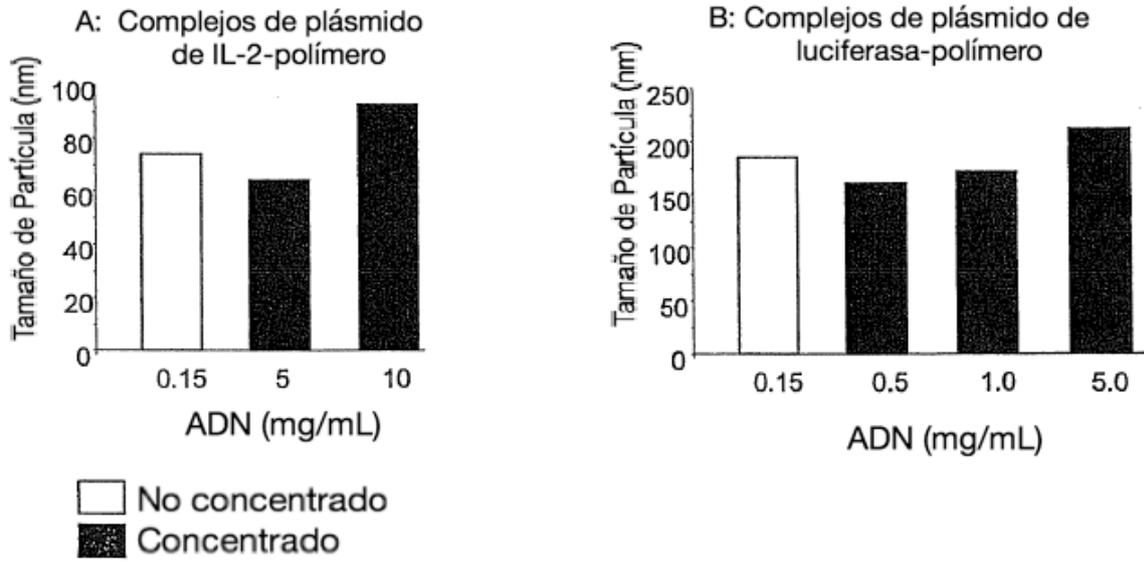


FIG. 2

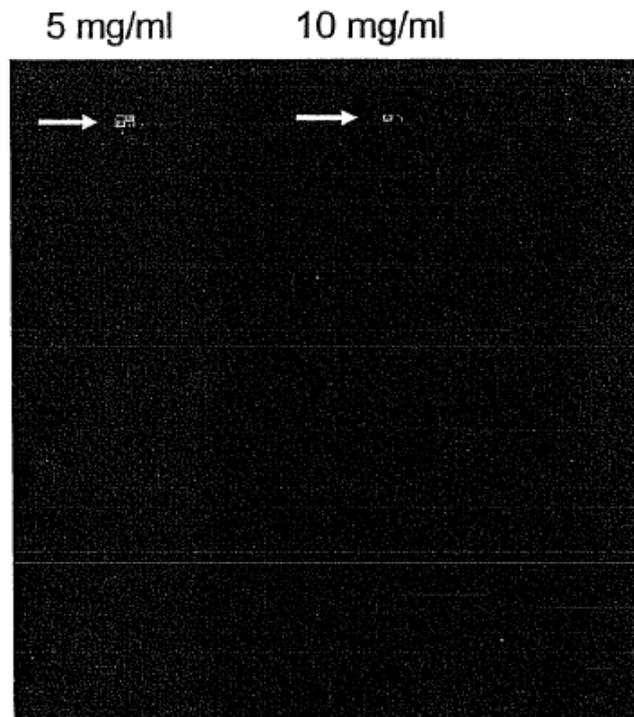


FIG. 3

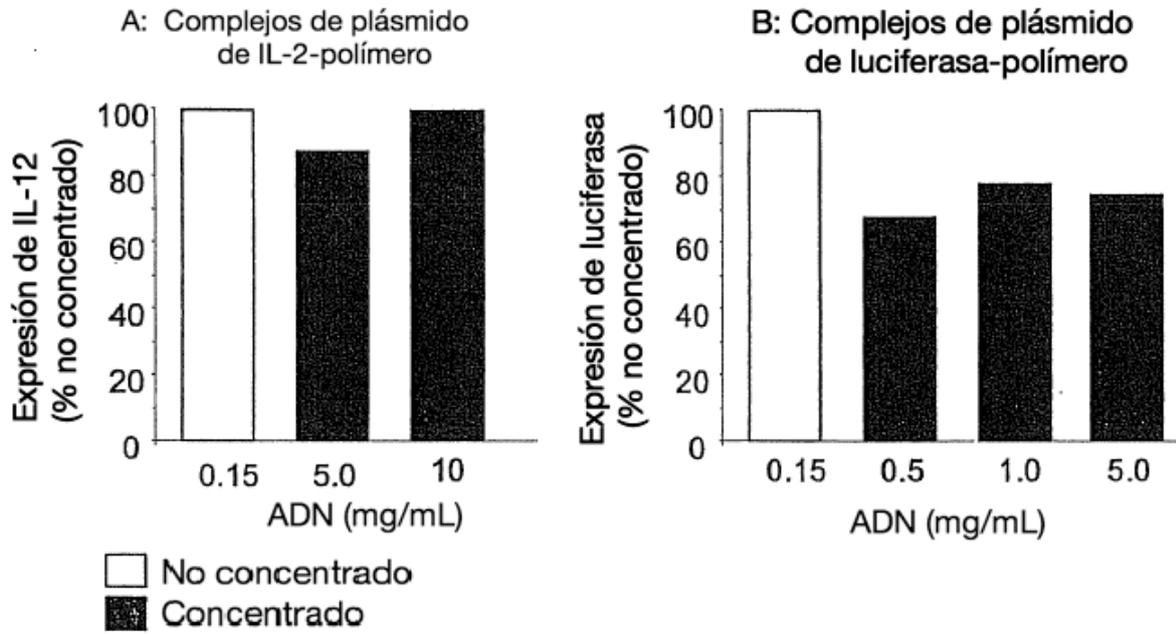


FIG. 4

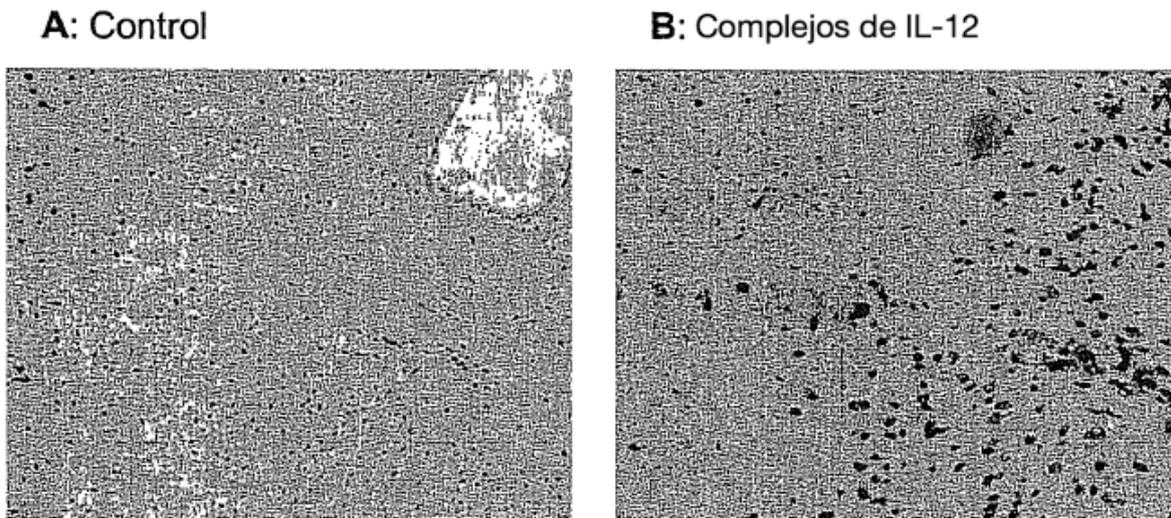


FIG. 5

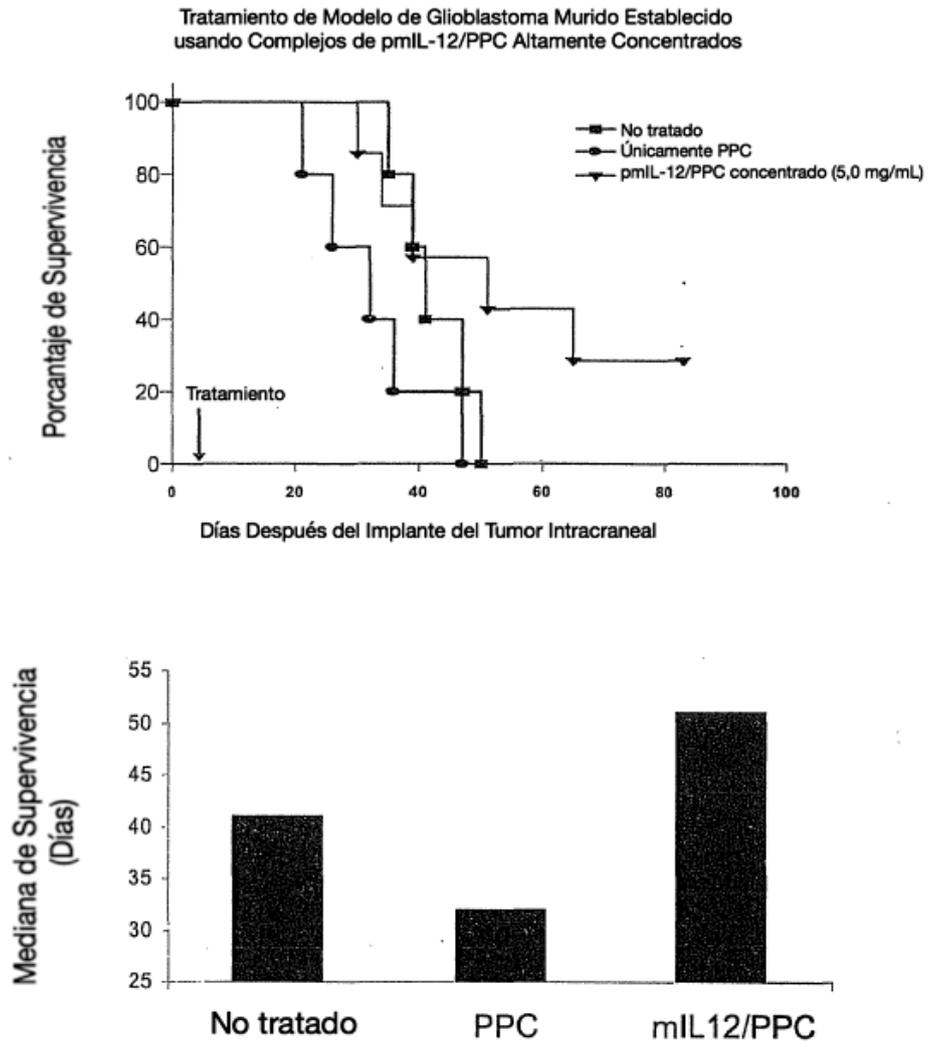


FIG. 6

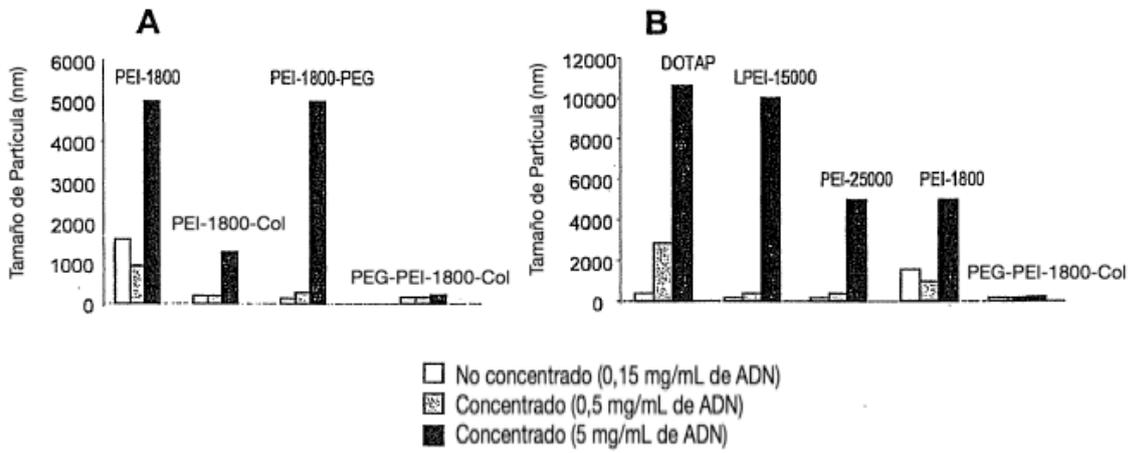


FIG. 7

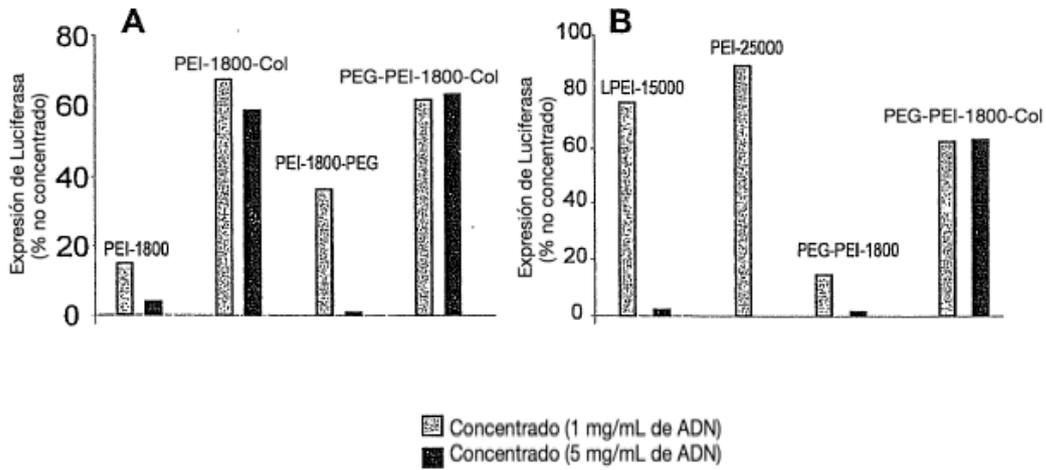


FIG. 8

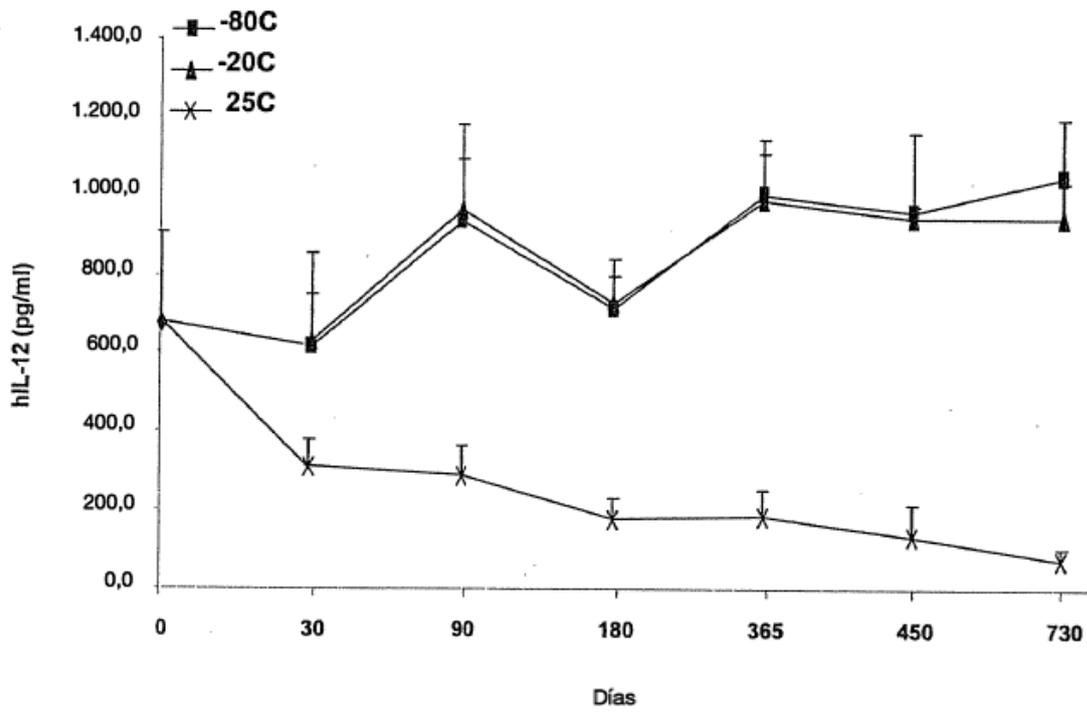


FIG. 9