

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 153**

51 Int. Cl.:

C08G 73/02	(2006.01)
C08G 73/06	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 31/711	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)
C12N 15/88	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
C08G 63/685	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2001 PCT/US2001/31270**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2017 WO02031025**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2001 E 01977541 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 1401918**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden poli(beta-amino-ésteres) biodegradables**

30 Prioridad:

10.10.2000 US 239330 P
13.07.2001 US 305337 P
02.10.2001 US 969431

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2018

73 Titular/es:

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 MASSACHUSETTS AVENUE
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

LANGER, ROBERT, S.;
LYNN, DAVID, M.;
PUTNAM, DAVID;
AMIJI, MANSOOR, M. y
ANDERSON, DANIEL, G.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 672 153 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 farmacéuticas que comprenden poli(beta-amino-ésteres) biodegradables

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 El tratamiento de enfermedades humanas a través de la aplicación de fármacos a base de nucleótidos tales como ADN y ARN tiene el potencial para revolucionar el campo médico (Anderson Nature 392 (supl.):25-30, 1996; Friedman Nature Med. 2:144-147, 1996; Crystal Science 270:404-410, 1995; Mulligan Science 260:926-932, 1993). Hasta ahora, el uso de virus modificados como vectores de transferencia génica ha representado generalmente el enfoque clínicamente más satisfactorio para la terapia génica. Aunque los vectores virales son actualmente los
10 agentes de transferencia génica más eficaces, problemas referentes a la seguridad global de los vectores virales, que incluyen el potencial para respuestas inmunitarias no buscadas, han dado como resultado esfuerzos paralelos para desarrollar alternativas no virales (para referencias destacadas, véase: Luo y otros, Nat. Biotechnol. 18:33-37, 2000; Behr Acc. Chem. Res. 26:274-278, 1993).

15 Las alternativas actuales a los vectores virales incluyen sistemas de administración poliméricos (Zauner y otros, Adv. Drug Del. Rev. 30:97-113, 1998; Kabanov y otros, Bioconjugate Chem. 6:7-20, 1995), formulaciones liposómicas (Miller Angew. Chem. Int. Ed. 37:1768-1785, 1998; Hope y otros, Molecular Membrane Technology 15:1-14, 1998; Deshmukh y otros, New J. Chem. 21:113-124, 1997), y protocolos de inyección de ADN "desnudo" (Sanford Trends Biotechnol. 6:288-302, 1988).

20 Aunque estas estrategias tienen que conseguir aún la eficacia clínica de los vectores virales, la seguridad potencial, el procesamiento y los beneficios económicos ofrecidos por estos métodos (Anderson Nature 392 (supl.):25-30, 1996) han avivado el interés en el desarrollo continuado de enfoques no virales para la terapia génica (Boussif y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7297-7301, 1995; Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121: 5633-5639, 1999; Gonzalez y otros, Bioconjugate Chem. 10:1068-1074, 1999; Kukowska-Latallo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4897-4902, 1996; Tang y otros, Bioconjugate Chem. 7:703-714, 1996; Haensler y otros, Bioconjugate Chem. 4:372-379, 1993).

25 Se han usado ampliamente polímeros catiónicos como vectores de transfección debido a la facilidad con la que condensan y protegen hebras de ADN cargadas negativamente. Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina) (Zauner y otros, Adv. Drug Del. Rev. 30:97-113, 1998; Kabanov y otros, Bioconjugate Chem. 6:7-20, 1995), poli(etilnimina) (PEI) (Boussif y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7297-7301, 1995) y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4897-4902, 1996; Tang y otros, Bioconjugate Chem. 7:703-714, 1996; Haensler y otros, Bioconjugate Chem. 4:372-379, 1993) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman pares iónicos con ácidos nucleicos y median la transfección en una variedad de líneas celulares. Sin embargo, a pesar de su uso común, los polímeros catiónicos tales como poli(lisina) y PEI pueden ser significativamente citotóxicos (Zauner y otros, Adv. Drug Del. Rev. 30:97-113, 1998; Deshmukh y otros, New J. Chem. 21:113-124, 1997; Choksakulnimitr y otros, Controlled Release 34:233-241, 1995; Brazeau y otros, Pharm. Res. 15:680-684, 1998). Como resultado, la elección de un polímero catiónico para una aplicación de
30 transferencia génica requiere generalmente un equilibrio entre eficiencia de transfección y citotoxicidad a corto y largo plazo. Adicionalmente, la biocompatibilidad a largo plazo de estos polímeros sigue siendo una cuestión importante para su uso en aplicaciones terapéuticas in vivo, puesto que varios de estos polímeros no son fácilmente biodegradables (Uhrich Trends Polim. Sci. 5:388-393, 1997; Roberts y otros, J. Biomed. Mater. Res. 30:53-65, 1996).

35 Con el fin de desarrollar alternativas seguras a los vectores poliméricos existentes y otros biomateriales funcionalizados, se han desarrollado poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas (Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999; Barrera y otros, J. Am. Chem. Soc. 115:11010-11011, 1993; Kwon y otros, Macromolecules 22:3250-3255, 1989; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999; Zhou y otros, Macromolecules 23:3399-3406, 1990). Los ejemplos de estos polímeros incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera y otros, J. Am. Chem. Soc. 115:11010-11011, 1993), poli(éster de serina) (Zhou y otros, Macromolecules 23:3399-3406, 1990), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999.; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999) y, más recientemente, poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico]. Recientemente se demostró que el poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) y el poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico] condensaban el ADN
40 de plásmido a través de interacciones electrostáticas, y que mediaban la transferencia génica (Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999). De manera importante, estos nuevos polímeros son significativamente menos tóxicos que la poli(lisina) y PEI, y se degradan dando metabolitos no tóxicos. Queda claro a partir de estas investigaciones que el diseño racional de poliésteres que contienen amina puede ser una vía productiva para el desarrollo de vectores de transfección eficaces y seguros. Sin embargo, desafortunadamente, las presentes síntesis de estos polímeros requieren o bien la preparación independiente de monómeros especializados (Barrera y otros, J. Am. Chem. Soc. 115:11010-11011, 1993), o bien el uso de cantidades estequiométricas de agentes de acoplamiento caros (Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999). Adicionalmente, las funcionalidades amina en los monómeros deben protegerse antes de la

polimerización (Putnam y otros, *Macromolecules* 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999; Gonzalez y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074, 1999; Barrera y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 115:11010-11011, 1993; Kwon y otros, *Macromolecules* 22:3250-3255, 1989), necesitándose etapas de desprotección tras la polimerización adicionales antes de que los polímeros puedan usarse como agentes de transfección.

5

El documento US 3963771 divulga acrilatos de amina producidos mediante la reacción de un éster de diacrilato y una amina orgánica.

El documento WO 98/16202 divulga una composición de liposomas fusogénicos para suministrar un compuesto atrapado en el liposoma al citoplasma de una célula diana.

10

El documento US 5180424 divulga una tinta de impresión que comprende un resinato metálico que contiene zinc complejoado con resinas de aminopoliéster y el proceso para prepararlas.

El documento 2759913 divulga la polimerización de un compuesto orgánico que contiene al menos dos dobles enlaces etilénicos activados con un compuesto que contiene al menos dos hidrógenos activos.

15

Loan y Panayotov (*Eur. Polym. J.*, 32:957-962, 1996) divulgan la preparación de poliamidoaminas y poliesteraminas mediante la interacción entre ampicilina y amoxicilina y metilen-bis-acrilamida, 1,4-diacriloilpiperazina y 1,3-propanodioldiacrilato.

Loan y otros (*Macromol. Chem. Phys.*, 196:3525-3533, 1995) divulgan la preparación de poli(amido-amina)s y poli(éster-amina)s mediante la poliadición entre aminas aromáticas que contienen grupos carboxilo libres o esterificados y compuestos con dobles enlaces activados.

20

Hill y otros (*Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1427:161-174, 1999) divulgan la citotoxicidad de varios polímeros de poli(amidoamina) que se han propuesto para su uso como sistemas de suministro de ADN.

El documento WO 02/13767 divulga composiciones dentales que comprenden al menos un monómero polimerizable y/o al menos un poliaminoéster que se prepara mediante reacción de ésteres bis- o poliacrílicos y aminas, pigmentos, cargas orgánicas y/o inorgánicas, iniciadores y estabilizantes.

25

Existe una necesidad continua de polímeros no tóxicos, biodegradables, biocompatibles que puedan usarse para transfectar ácidos nucleicos y que se preparen fácilmente de manera económica y eficaz. Tales polímeros tendrían varios usos, incluyendo la administración de ácidos nucleicos en la terapia génica así como en el empaquetamiento y/o administración de agentes de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos.

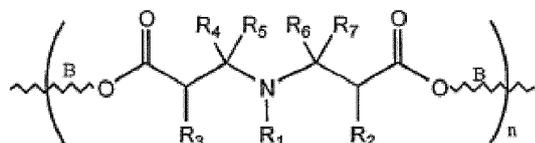
SUMARIO DE LA INVENCION

30

Se divulgan en el presente documento polímeros útiles en la preparación de dispositivos de administración de fármacos y composiciones farmacéuticas de los mismos. También se divulgan en el presente documento métodos de preparación de los polímeros y métodos de preparación de microesferas y otras composiciones farmacéuticas que contienen los polímeros.

En consecuencia, en un aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido y un compuesto de fórmula:

35



o una sal del mismo, en la que:

el conector B se selecciona del grupo que consiste en cadenas de carbono de 1 a 30 átomos de carbono, cadenas de carbono que contienen heteroátomos de 1 a 30 átomos y cadenas de carbono y cadenas de carbono que contienen heteroátomos con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamaoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tiol;

45

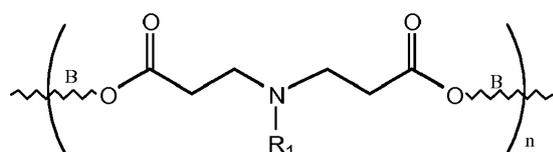
R₁ se selecciona del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, arilo, carbamaoilo, éster carboxílico, amida, un grupo alcanóilo sustituido, cíclico, cíclico aromático, heterocíclico y heterocíclico aromático, en donde cada uno de los cuales puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, amino, alquilamino,

dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tihidroxilo;

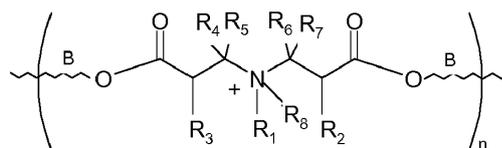
R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ y R₇ son cada uno hidrógeno; y

5 n es un número entero entre 5 y 10.000; opcionalmente en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Los polímeros de la presente invención son poli(β-amino-ésteres) y sales de los mismos. Los polímeros preferidos son biodegradables y biocompatibles. Normalmente, los polímeros tienen una o más aminas terciarias en la estructura principal del polímero. Los polímeros preferidos tienen una o dos aminas terciarias por unidad de repetición de la estructura principal. Los polímeros también pueden ser copolímeros en los que uno de los componentes es un poli(β-amino-éster). Los polímeros de la invención pueden prepararse fácilmente condensando aminas primarias con bis(ésteres de acrilato). Un polímero típico de la invención se representa mediante la siguiente fórmula:



15 en donde B es un conector como se ha definido anteriormente. Los grupos R₁ y R₂ pueden ser como se han definido anteriormente. En una realización, la sal es un compuesto de fórmula:



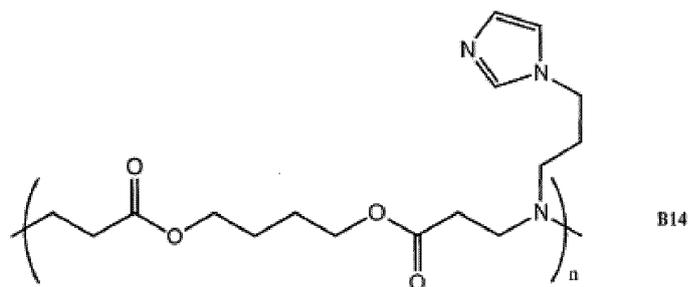
en la que

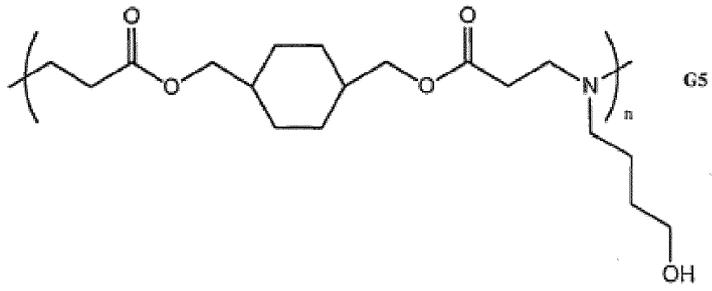
20 R₈ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo ramificado y no ramificado, alqueno ramificado y no ramificado, alquino ramificado y no ramificado, arilo, carbamoilo, éster carboxílico, amida, un grupo alcanoilo sustituido, cíclico, aromático cíclico, heterocíclico y heterocíclico aromático, en donde cada uno de los cuales puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alqueno ramificado y no ramificado, alquino ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tiol;

25 el contraión se selecciona del grupo que consiste en cloro, flúor, bromo, yodo, sulfato, nitrato, fumarato, acetato, carbonato, estearato, laurato y oleato; y

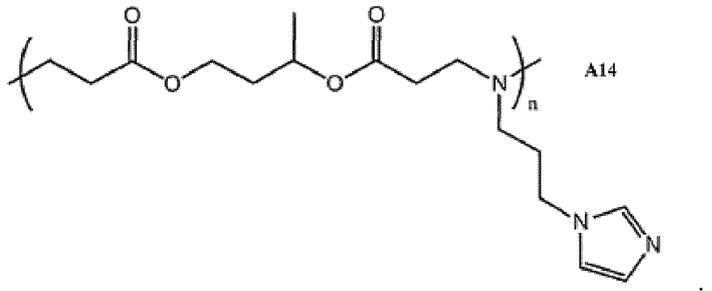
n es un número entero entre 5 y 10.000.

30 En una realización, R₈ es hidrógeno. En una realización, el conector B es polietileno o polietilenglicol. En una realización, el compuesto es uno de las siguientes fórmulas:

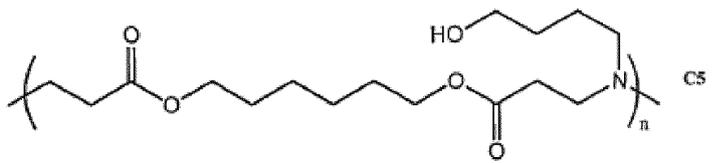




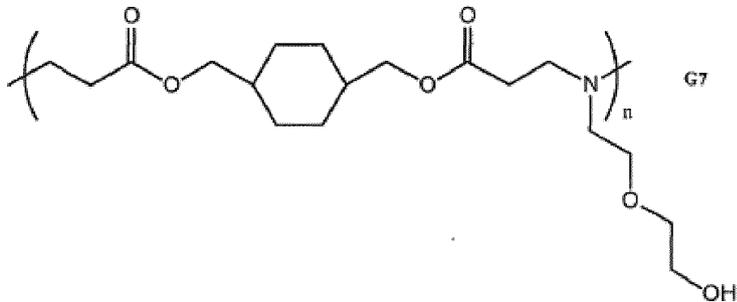
;



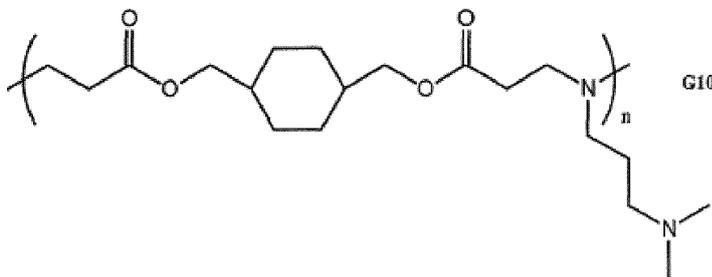
;



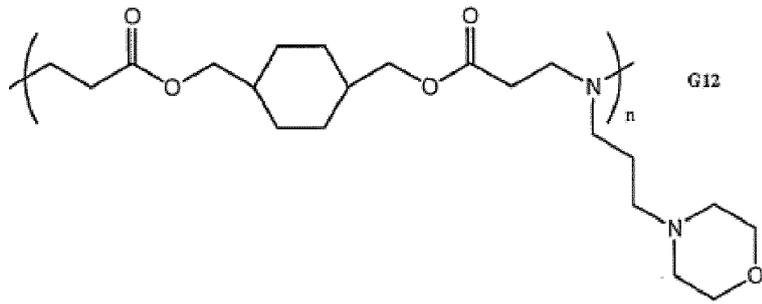
;



;

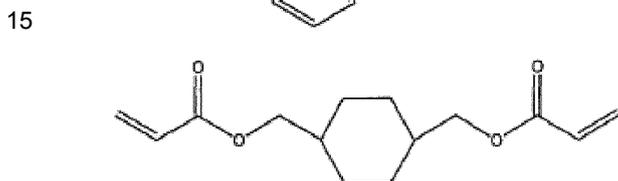
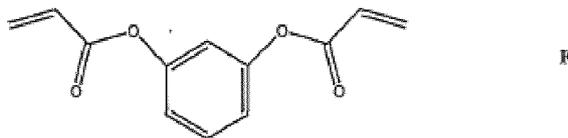
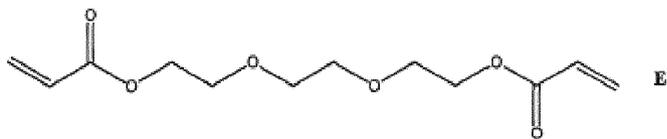
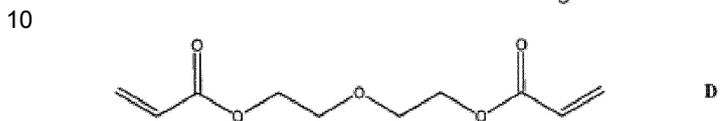
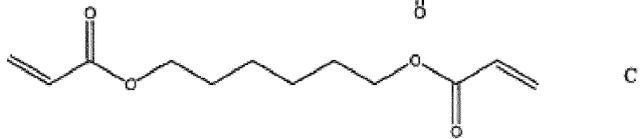
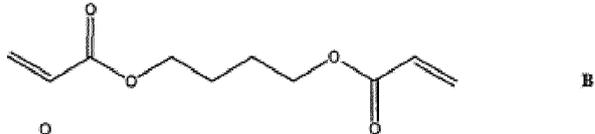
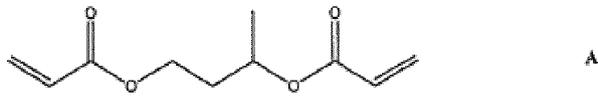


;

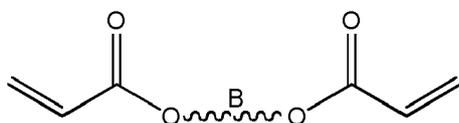


en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales de los mismos.

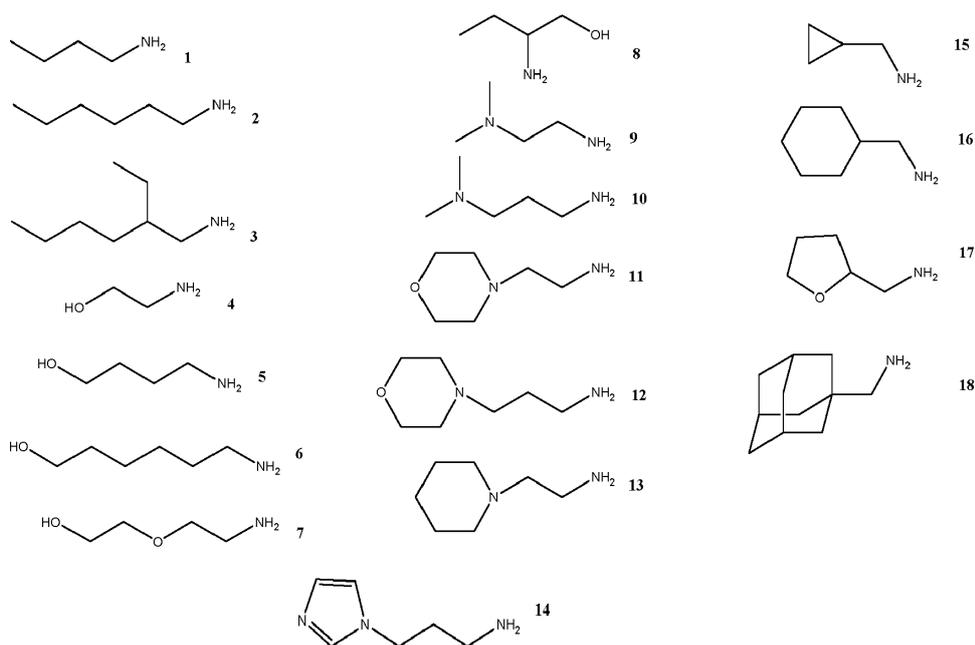
5 En una realización, el compuesto se prepara a partir de una amina primaria de fórmula NH_2R_1 y un bis(éster de acrilato) de cualquiera de las Fórmulas A a G;



20 En una realización, el compuesto se prepara a partir de un bis(éster de acrilato) de la fórmula



y una amina de cualquiera de las Fórmulas 1 a 18:



5

En una realización, el compuesto tiene un peso molecular de 5000 a más de 100.000 g/mol. En una realización, el compuesto tiene un peso molecular entre 4000 y 50.000 g/mol.

En una realización, comprende nanopartículas que contienen el polinucleótido y el compuesto.

En una realización de este tipo, el compuesto puede ser soluble en una solución acuosa a pH 7,4 e inferior.

10 En otra realización, la composición farmacéutica comprende micropartículas que contienen el polinucleótido encapsulado en una matriz del compuesto.

En una realización de este tipo, el compuesto puede ser insoluble en una solución acuosa de pH 7,2-7,4.

En una realización de este tipo, el compuesto puede ser insoluble en una solución acuosa de pH 7,2-7,4 pero es soluble en una solución acuosa a pH inferior a 7,2.

15 En una realización de este tipo, las micropartículas pueden tener un diámetro medio de entre 1 y 10 micrómetros.

En una realización de este tipo, en la que las micropartículas tienen un diámetro medio de menos de 5 micrómetros.

En una realización, el polinucleótido es ADN.

En una realización, el polinucleótido y el compuesto están asociados mediante una interacción electrónica.

En una realización, el polinucleótido es ARN.

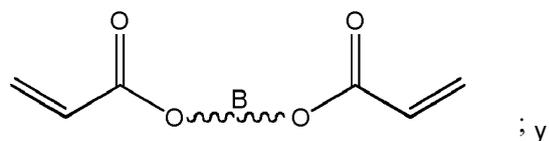
20 En una realización, el polinucleótido codifica una proteína o péptido.

En una realización, el polinucleótido es un agente antisentido o ARNi.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de la invención, en la que el compuesto se prepara:

proporcionando una amina primaria de fórmula NH_2R_1 ;

25 proporcionando un bis(éster de acrilato) de fórmula



haciendo reaccionar la amina primaria con el bis(éster de acrilato). En una realización preferida, los monómeros, aminas primarias y bis(ésteres de acrilato) disponibles comercialmente o que se pueden obtener fácilmente se someten a condiciones que dan lugar a la adición conjugada de la amina al bis(éster de acrilato). En una realización

particularmente preferida, cada uno de los monómeros se disuelve en un disolvente orgánico (por ejemplo, THF, dietil éter, cloruro de metileno, hexanos, etc.) y las soluciones resultantes se combinan y se calientan durante un tiempo suficiente para dar lugar a la polimerización de los monómeros. El polímero resultante se puede purificar a continuación utilizando técnicas conocidas en la materia.

5 En una realización, la etapa de reacción conlleva hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) en un disolvente orgánico.

En una realización de este tipo, el disolvente orgánico se puede seleccionar del grupo que consiste en THF, dietil éter, dimetoxietano, hexanos, metanol, etanol, isopropanol, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dimetilformamida, acetonitrilo, benceno y tolueno.

10 En una realización, la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura entre 0 y 75 °C.

En una realización, la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura entre 20 y 50 °C.

15 En una realización, la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura entre 30 y 60 °C.

20 De acuerdo con la invención, los polímeros se usan para formar complejos a escala nanométrica con ácidos nucleicos. Los complejos de polinucleótido/polímero pueden formarse añadiendo una disolución de polinucleótido a una disolución con agitación con vórtex del polímero a una concentración de ADN/polímero deseada. La razón de peso con respecto a peso del polinucleótido con respecto al polímero puede oscilar desde 1:0,1 hasta 1:50, preferiblemente desde 1:1 hasta 1:20, más preferiblemente desde 1:1 hasta 1:10. Los polímeros catiónicos condensan el polinucleótido en partículas solubles normalmente de 50-500 nm de tamaño. Estos complejos de polinucleótido/polímero pueden usarse en la administración de polinucleótidos a células. En una realización particularmente preferida, estos complejos se combinan con excipientes farmacéuticos formando composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a animales incluyendo seres humanos.

25 En otro aspecto la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden además, en las que las micropartículas se preparan:

proporcionando el polinucleótido;

proporcionando el compuesto; y

30 poniendo en contacto el polinucleótido y el compuesto para encapsular el polinucleótido en una matriz del compuesto.

35 Los polímeros pueden usarse para encapsular agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o profilácticos incluyendo polinucleótidos para formar micropartículas. Normalmente estas micropartículas son un orden de magnitud mayores que los complejos de polinucleótido/polímero. Las micropartículas oscilan desde 1 micra hasta 500 micras. En una realización particularmente preferida, estas micropartículas permiten la administración de polinucleótidos, péptidos, proteínas y/o moléculas pequeñas lábiles a un individuo. Las micropartículas pueden prepararse usando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para preparar micropartículas, tales como, por ejemplo, doble emulsión, y secado por pulverización. En una realización particularmente preferida, las micropartículas pueden usarse para una administración desencadenada por pH del contenido encapsulado debido a la naturaleza sensible al pH de los polímeros (es decir, ser más solubles a pH inferior).

40 En una realización, el polinucleótido es ADN.

En una realización, la etapa de puesta en contacto comprende secar por pulverización una mezcla del polinucleótido y el compuesto.

En una realización, la etapa de puesta en contacto comprende técnicas de doble emulsión – evaporación del disolvente.

45 En una realización preferida de cualquiera de las etapas anteriores, la compañía farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

DEFINICIONES

Los siguientes son términos químicos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones:

50 El término alquilo tal como se usa en el presente documento se refiere a radicales hidrocarbonados saturados, de cadena lineal o ramificada derivados de un resto hidrocarbonado que contiene entre uno y veinte átomos de carbono mediante eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan

a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo y dodecilo.

5 El término alcoxilo tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente, unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, terc-butoxilo, neopentoxilo y n-hexoxilo.

El término alquenilo indica un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarbonado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los grupos alquenilo incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo.

10 El término alquinilo tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los grupos alquinilo representativos incluyen etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo.

15 El término alquilamino, dialquilamino y trialquilamino tal como se usa en el presente documento se refiere a uno, dos o tres grupos alquilo, respectivamente, tal como se definió anteriormente, unidos al resto molecular original a través de un átomo de nitrógeno. El término alquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NHR', en la que R' es un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente; y el término dialquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NR'R'', en la que R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo. El término trialquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NR'R''R''', en la que R', R'' y R''' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo. Adicionalmente, R', R'' y/o R''' tomados juntos pueden ser opcionalmente -(CH₂)_k- en el que k es un número entero desde 2 hasta 6. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dietilaminocarbonilo, metiletilamino, iso-propilamino, piperidino, trimetilamino y propilamino.

Los términos alquiltioéter y tioalcoxilo se refieren a un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente, unido al resto molecular original a través de un átomo de azufre.

25 El término arilo tal como se usa en el presente documento se refiere a un sistema de anillo carbocíclico que tiene al menos un anillo aromático incluyendo, pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. Los grupos arilo pueden estar no sustituidos o sustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, alcoxilo, tioalcoxilo, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, acilamino, ciano, hidroxilo, halógeno, mercapto, nitro, carboxialdehído, carboxilo, alcoxicarbonilo y carboxamida ramificados y no ramificados. Además, los grupos arilo sustituidos incluyen tetrafluorofenilo y pentafluorofenilo.

30 El término ácido carboxílico tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de fórmula -CO₂H.

Los términos halo y halógeno tal como se usan en el presente documento se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

35 El término heterocíclico, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillo de 3 a 10 miembros, no aromático, parcialmente insaturado o completamente saturado, que incluye anillos individuales de 3 a 8 átomos de tamaño y sistemas de anillo bi y tricíclicos que pueden incluir grupos heterocíclicos aromáticos o arilo de seis miembros aromáticos condensados con un anillo no aromático. Estos anillos heterocíclicos incluyen los que tienen desde uno hasta tres heteroátomos seleccionados independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno, en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado.

40 El término grupo heterocíclico aromático, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical aromático cíclico que tiene desde cinco hasta diez átomos de anillo de los cuales un átomo de anillo se selecciona de azufre, oxígeno y nitrógeno; cero, uno o dos átomos de anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente de azufre, oxígeno y nitrógeno; y los átomos de anillo restantes son carbono, estando unido el radical al resto de la molécula a través de cualquiera de los átomos de anillo, tales como, por ejemplo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo.

45 Los grupos heterocíclicos aromáticos y heterocíclicos específicos que pueden incluirse en los compuestos de la invención incluyen: 3-metil-4-(3-metilfenil)piperazina, 3-metilpiperidina, 4-(bis-(4-fluorofenil)metil)piperazina, 4-(difenilmetil)piperazina, 4-(etoxicarbonil)piperazina, 4-(etoxicarbonilmetil)piperazina, 4-(fenilmetil)piperazina, 4-(1-feniletíl)piperazina, 4-(1,1-dimetiletóxicarbonil)piperazina, 4-(2-(bis-(2-propenil)amino)etil)piperazina, 4-(2-(dietilamino)etil)piperazina, 4-(2-clorofenil)piperazina, 4-(2-cianofenil)piperazina, 4-(2-etoxifenil)piperazina, 4-(2-etilfenil)piperazina, 4-(2-fluorofenil)piperazina, 4-(2-hidroxietil)piperazina, 4-(2-metoxietil)piperazina, 4-(2-metoxifenil)piperazina, 4-(2-metilfenil)piperazina, 4-(2-metiltiofenil)piperazina, 4-(2-nitrofenil)piperazina, 4-(2-nitrofenil)piperazina, 4-(2-feniletíl)piperazina, 4-(2-piridil)piperazina, 4-(2-pirimidinil)piperazina, 4-(2,3-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,4-difluorofenil)piperazina, 4-(2,4-dimetoxifenil)piperazina, 4-(2,4-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,5-dimetilfenil)piperazina, 4-(2,6-dimetilfenil)piperazina, 4-(3-clorofenil)piperazina, 4-(3-metilfenil)piperazina, 4-(3-

trifluorometilfenil)piperazina, 4-(3,4-diclorofenil)piperazina, 4-(3,4-dimetoxifenil)piperazina, 4-(3,4-dimetilfenil)piperazina, 4-(3,4-metilendioxfenil)piperazina, 4-(3,4,5-trimetoxifenil)piperazina, 4-(3,5-diclorofenil)piperazina, 4-(3,5-dimetoxifenil)piperazina, 4-(4-(fenilmetoxi)fenil)piperazina, 4-(4-(3,1-dimetiletil)fenilmetil)piperazina, 4-(4-cloro-3-trifluorometilfenil)piperazina, 4-(4-clorofenil)-3-metilpiperazina, 4-(4-clorofenil)piperazina, 4-(4-clorofenilmetil)piperazina, 4-(4-fluorofenil)piperazina, 4-(4-metoxifenil)piperazina, 4-(4-metilfenil)piperazina, 4-(4-nitrofenil)piperazina, 4-(4-trifluorometilfenil)piperazina, 4-ciclohexilpiperazina, 4-etilpiperazina, 4-hidroxi-4-(4-clorofenil)metilpiperidina, 4-hidroxi-4-fenilpiperidina, 4-hidroxipirrolidina, 4-metilpiperazina, 4-fenilpiperazina, 4-piperidinilpiperazina, 4-(2-furanil)carbonil)piperazina, 4-((1,3-dioxolan-5-il)metil)piperazina, 6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-metilquinolina, 1,4-diazacicloheptano, 2,3-dihidroindolilo, 3,3-dimetilpiperidina, 4,4-etilendioxipiperidina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, azaciclooctano, decahidroquinolina, piperazina, piperidina, pirrolidina, tiomorfolina y triazol.

El término carbamoilo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amida de fórmula $-\text{CONH}_2$.

El término carbonildioxilo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carbonato de fórmula $-\text{O}-\text{CO}-\text{OR}$.

El término hidrocarburo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grupo químico que comprende hidrógeno y carbono. El hidrocarburo puede estar sustituido o no sustituido. El hidrocarburo puede ser insaturado, saturado, ramificado, no ramificado, cíclico, policíclico o heterocíclico. Los hidrocarburos ilustrativos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, alilo, vinilo, n-butilo, terc-butilo, etinilo, ciclohexilo, metoxilo, dietilamino. Tal como conocería un experto en esta técnica, deben satisfacerse todas las valencias al hacer cualquier sustitución.

Los términos sustituido, esté precedido o no por el término “opcionalmente”, y sustituyente, tal como se usan en el presente documento, se refieren a la capacidad, tal como aprecia un experto en esta técnica, para cambiar un grupo funcional por otro grupo funcional siempre que se mantenga la valencia de todos los átomos. Cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Los sustituyentes pueden estar también sustituidos adicionalmente (por ejemplo, un sustituyente de grupo arilo puede tener otro sustituyente fuera del mismo, tal como otro grupo arilo, que está sustituido adicionalmente con flúor en una o más posiciones).

El término tiohidroxilo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un tiol de fórmula $-\text{SH}$.

El término ureido, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo urea de fórmula: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$.

Los siguientes son términos más generales usados durante toda la presente solicitud:

“Animal”: El término animal, tal como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos así como animales no humanos, incluyendo, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Preferiblemente, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). El animal puede ser un animal transgénico.

“Asociado con”: Cuando dos entidades están “asociadas con” entre sí tal como se describe en el presente documento, están unidas mediante una interacción covalente o no covalente directa o indirecta. Preferiblemente, la asociación es covalente. Las interacciones no covalentes deseables incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, etc.

“Biocompatible”: El término “biocompatible”, tal como se usa en el presente documento, pretende describir compuestos que no son tóxicos para las células. Los compuestos son “biocompatibles” si su adición a células in vitro da como resultado una muerte celular inferior o igual al 20%, y su administración in vivo no induce inflamación ni ningún otro efecto adverso de este tipo.

“Biodegradable”: Tal como se usa en el presente documento, compuestos “biodegradables” son aquéllos que, cuando se introducen en las células, se descomponen mediante la maquinaria celular o mediante hidrólisis dando componentes que las células pueden o bien volver a usar o bien desechar sin efecto tóxico significativo sobre las células (es decir, se destruye menos de aproximadamente el 20% de las células cuando se añaden los componentes a las células in vitro). Preferiblemente, los componentes no inducen inflamación ni ningún otro efecto adverso in vivo. En ciertas realizaciones preferidas, las reacciones químicas en las que se confía para descomponer los compuestos biodegradables no están catalizadas.

“Cantidad eficaz”: En general, la “cantidad eficaz” de un agente activo o dispositivo de administración de fármacos se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Tal como apreciarán los expertos habituales en esta técnica, la cantidad eficaz de un agente o dispositivo puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el agente que va a administrarse, la composición de la matriz de encapsulación, el tejido diana, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de micropartículas que contienen un antígeno que va a administrarse para inmunizar a un individuo es la cantidad que da como resultado una respuesta inmunitaria suficiente para prevenir la infección con un organismo que tiene el antígeno administrado.

“Péptido” o “proteína”: Según la presente invención, un “péptido” o una “proteína” comprende una cadena de al menos tres aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los términos “proteína” y “péptido” pueden usarse de manera intercambiable. Péptido puede referirse a un péptido individual o a una colección de péptidos. Los péptidos de la invención contienen preferiblemente sólo aminoácidos naturales, aunque pueden emplearse alternativamente aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza pero que pueden incorporarse en una cadena polipeptídica; véase, por ejemplo, <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif>, que muestra estructuras de aminoácidos no naturales que se han incorporado satisfactoriamente en canales iónicos funcionales) y/o análogos de aminoácido tal como se conocen en la técnica. Además, uno o más de los aminoácidos en un péptido de la invención pueden estar modificados, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un conector para la conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. En una realización preferida, las modificaciones del péptido conducen a un péptido más estable (por ejemplo, mayor semivida in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la ciclación del péptido, la incorporación de D-aminoácidos, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido.

“Polinucleótido” u “oligonucleótido”: Polinucleótido u oligonucleótido se refiere a un polímero de nucleótidos. Normalmente, un polinucleótido comprende al menos tres nucleótidos. El polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósido (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, C5-propinilcitidina, C5-propiniluridina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa), o grupos fosfato modificados (por ejemplo, enlaces de fosforotioato y 5'-N-fosforamida).

“Molécula pequeña”: Tal como se usa en el presente documento, la expresión “molécula pequeña” se refiere a compuestos orgánicos, ya se produzcan de manera natural o se creen artificialmente (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos ni ácidos nucleicos. Normalmente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 g/mol. Además, las moléculas pequeñas tienen normalmente múltiples enlaces carbono-carbono. Las moléculas pequeñas que se producen de manera natural conocidas incluyen, pero no se limitan a, penicilina, eritromicina, taxol, ciclosporina y rapamicina. Las moléculas pequeñas sintéticas conocidas incluyen, pero no se limitan a, ampicilina, metilicina, sulfametoxazol y sulfonamidas.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La figura 1 muestra el perfil de tiempo para la degradación de los polímeros 1-3 a 37°C a pH 5,1 y pH 7,4. La degradación se expresa como el porcentaje de degradación a lo largo del tiempo basándose en los datos de CPG.

La figura 2 muestra los perfiles de citotoxicidad de los polímeros 1-3 y PEI. La viabilidad de células NIH 3T3 se expresa como función de la concentración de polímero. Los pesos moleculares de los polímeros 1, 2 y 3 eran 5800, 11300 y 22500, respectivamente. El peso molecular de la PEI empleada era de 25000.

La figura 3 muestra el retardo del ADN de pCMV-Luc mediante el polímero 1 en electroforesis en gel de agarosa. Cada carril corresponde a una razón en peso de ADN/polímero diferente. Las razones son las siguientes: 1) 1:0 (ADN sólo); 2) 1:0,5; 3) 1:1; 4) 1:2; 5) 1:3; 6) 1:4; 7) 1:5; 8) 1:6; 9) 1:7; y 10) 1:8.

La figura 4 muestra los diámetros eficaces promedio de complejos de ADN/polímero formados a partir del plásmido pCMV-Luc y el polímero 3 ($M_n = 31.000$) como función de la concentración de polímero.

La figura 5 muestra los potenciales ζ promedio de complejos de ADN/polímero formados a partir del plásmido pCMV-Luc y el polímero 3 ($M_n = 31.000$) como función de la concentración de polímero. Los números para cada complejo corresponden a los números de complejo en la figura 4.

La figura 6 es una imagen de MEB de microesferas cargadas con rodamina/dextrano fabricadas a partir del polímero 1.

La figura 7 muestra los perfiles de liberación de rodamina/dextrano a partir de microesferas de PLGA y polímero 1 a diversos valores de pH. Las flechas indican los puntos a los que el tampón HEPES (pH 7,4) se intercambiaba por tampón acetato (pH 5,1).

La figura 8 muestra a) una imagen de microscopía de fluorescencia representativa de microesferas de polímero 1 cargadas con rodamina/dextrano suspendidas en tampón HEPES (pH 7,4). La figura 8b muestra una muestra de microesferas de polímero 1 cargadas a pH 7,4 tras la adición de tampón acetato (pH 5,1). La dirección de la difusión del ácido es desde la parte superior derecha hasta la inferior izquierda de la imagen (tiempo transcurrido ≈ 5 segundos).

La figura 9 muestra el ensayo de electroforesis en gel usado para identificar polímeros complejantes de ADN. Las anotaciones de los carriles corresponden a los 70 miembros solubles en agua de la biblioteca de examen. Para cada polímero, los ensayos se realizaron a razones de ADN/polímero de 1:5 (pocillo izquierdo) y 1:20 (pocillo derecho). Los carriles marcados con C* contienen ADN solo (sin polímero) y se usaron como control.

5 La figura 10 muestra los datos de transfección como una función de la estructura para un ensayo que emplea pCMV-Luc (600 ng/pocillo, ADN/polímero = 1:20). Las unidades de luz son arbitrarias y no están normalizadas con respecto a la proteína celular total; los experimentos se realizaron por triplicado (barras de error no mostradas). Los cuadrados negros representan polímeros insolubles en agua, los cuadrados blancos representan polímeros solubles en agua que no complejaron el ADN en la figura 9. La columna de derecha (marcada con "**") presenta valores para los siguientes experimentos control: sin polímero (verde), PEI (rojo) y Lipofectamine (azul claro).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

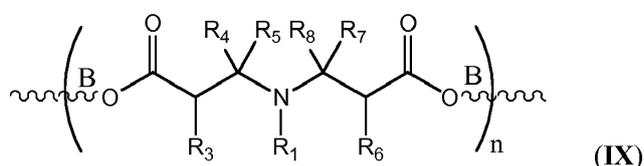
Se divulgan en el presente documento sistemas de administración y encapsulación poliméricos mejorados basados en el uso de polímeros de polímeros de β -amino-éster. Los sistemas pueden usarse en las técnicas de administración de fármacos/farmacéutica para administrar polinucleótidos, proteínas, moléculas pequeñas, péptidos, antígenos, fármacos, etc. a un paciente, tejido, órgano, célula, etc.

Los polímeros de β -amino-éster divulgados en el presente documento proporcionan varios usos diferentes en la técnica de administración de fármacos. Los polímeros con sus estructuras principales que contienen aminas terciarias pueden usarse para complejar polinucleótidos y de ese modo potenciar la administración de polinucleótido e impedir su degradación. Los polímeros también pueden usarse en la formación de nanopartículas o micropartículas que contienen agentes encapsulados. Debido a las propiedades de los polímeros de ser biocompatibles y biodegradables, estas partículas formadas son también biodegradables y biocompatibles y pueden usarse para proporcionar una liberación controlada, sostenida del agente encapsulado. Estas partículas también pueden ser sensibles a cambios en el pH dado el hecho de que estos polímeros normalmente no son sustancialmente solubles en disolución acuosa a pH fisiológico sino que son más solubles a pH inferior.

Polímeros

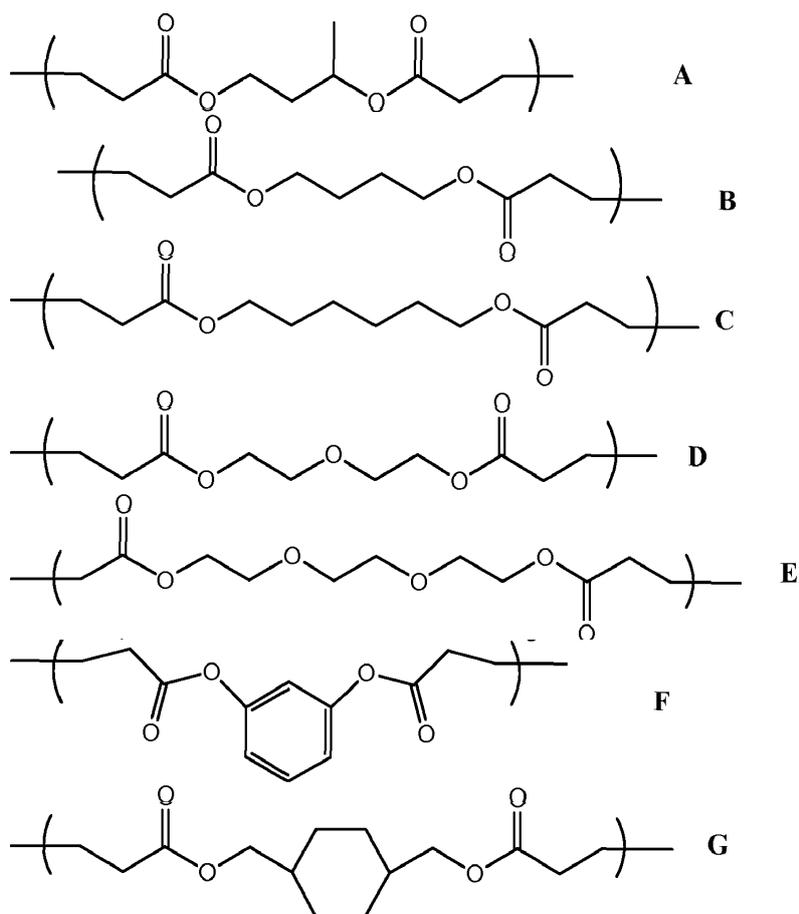
Los polímeros de las composiciones farmacéuticas de la presente invención son poli(β -amino-ésteres) que contienen aminas terciarias en sus estructuras principales y sales de los mismos. Los pesos moleculares de los polímeros de la invención pueden oscilar desde 5.000 g/mol hasta más de 100.000 g/mol, más preferiblemente desde 4.000 g/mol hasta 50.000 g/mol. En una realización particularmente preferida, los polímeros de la invención son relativamente no citotóxicos. En otra realización particularmente preferida, los polímeros de la invención son biocompatibles y biodegradables. En una realización particularmente preferida, los polímeros de la presente invención tienen pK_a en el intervalo de 5,5 a 7,5, más preferiblemente entre 6,0 y 7,0. En otra realización particularmente preferida, el polímero puede diseñarse para que tenga un pK_a deseado de entre 3,0 y 9,0, más preferiblemente entre 5,0 y 8,0. Los polímeros de la invención son particularmente atractivos para la administración de fármacos por varios motivos: 1) contienen grupos amino para interactuar con el ADN y otros agentes cargados negativamente, para tamponar el pH, para provocar endosomolisis, etc.; 2) contienen enlaces poliéster degradables; 3) pueden sintetizarse a partir de materiales de partida comercialmente disponibles; y 4) son sensibles al pH y podrían diseñarse por ingeniería genética futuras generaciones con un pK_a deseado.

Los polímeros de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden definir generalmente mediante la fórmula (IX):



El conector B es una cadena de átomos que une covalentemente los grupos éster. El conector puede contener átomos de carbono o heteroátomos (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.). El conector tiene una longitud de 1 a 30 átomos, más preferiblemente una longitud de 1-15 átomos. El conector está sustituido en al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alqueno ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, halógeno, arilo, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, tioéter, alquiltioéter, tiol y ureido. Tal como apreciaría un experto en la técnica, cada uno de estos grupos puede estar sustituido a su vez. Cada uno de R1, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 puede ser como se define en el presente documento. En el polímero de la invención, n es un número entero comprendido entre 5 y 10.000, más preferiblemente entre 10 y 500.

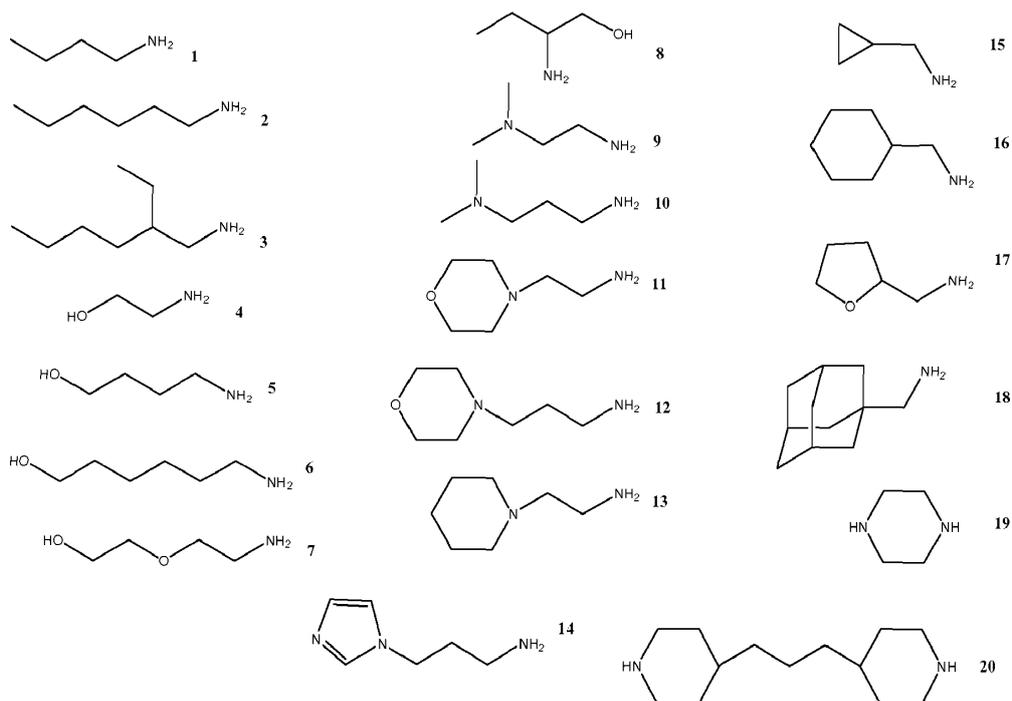
En una realización, la unidad de bis(éster de acrilato) en el polímero de la invención se elige del siguiente grupo de unidades de bis(éster de acrilato) (A-G):



5

En ciertas realizaciones, el polímero comprende el bis(éster de acrilato) G.

En otra realización, la amina en el polímero de la invención se elige del siguiente grupo de aminas (1-18):

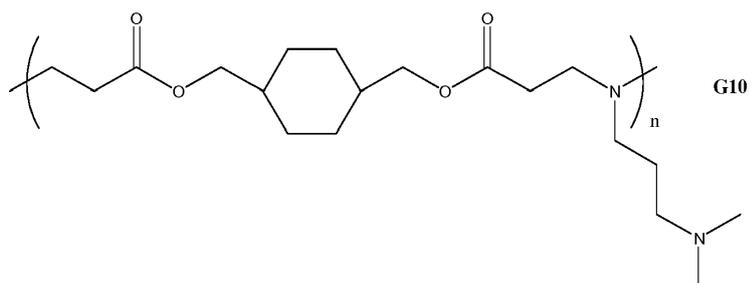
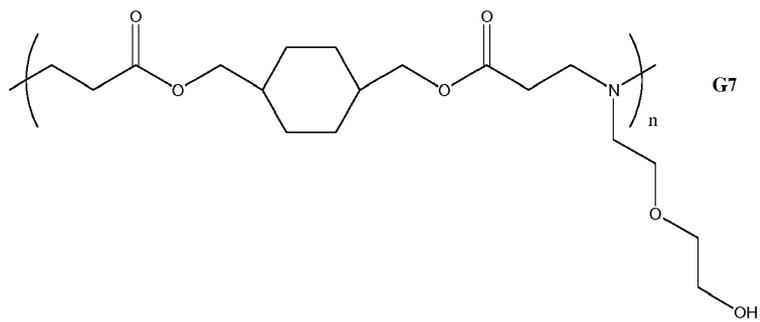
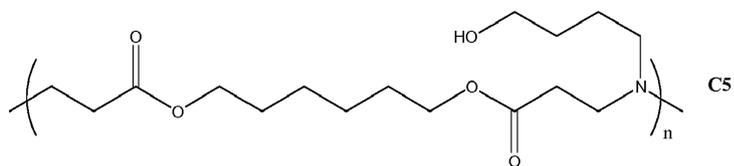
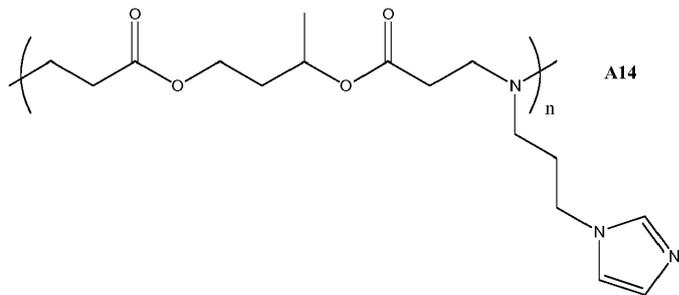
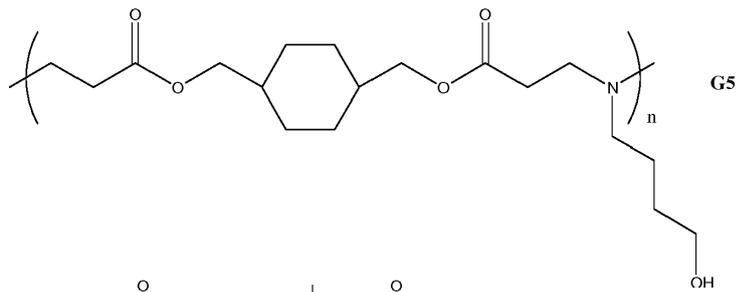
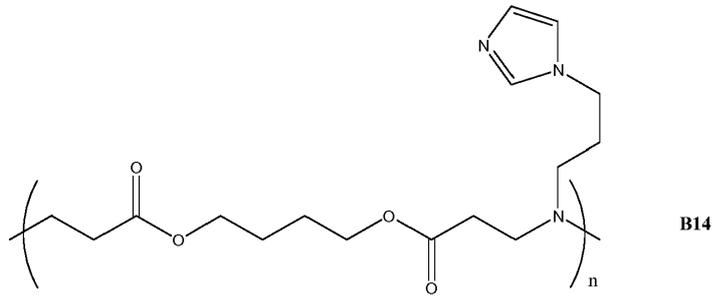


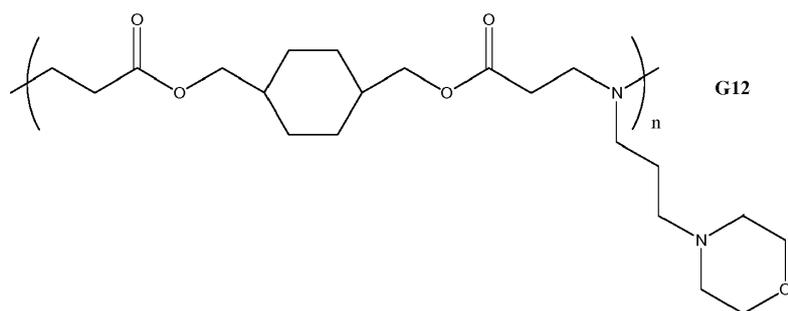
10

15

En ciertas realizaciones, el polímero comprende la amina 5. En otras realizaciones, el polímero comprende la amina 14.

Los ejemplos particulares de los polímeros de la presente invención incluyen:





En una realización particularmente preferida, el conector B es un polímero de polietileno. En otra realización particularmente preferida, el conector B es un polímero de polietilenglicol. Como conector B se pueden utilizar otros polímeros biodegradables y biocompatibles.

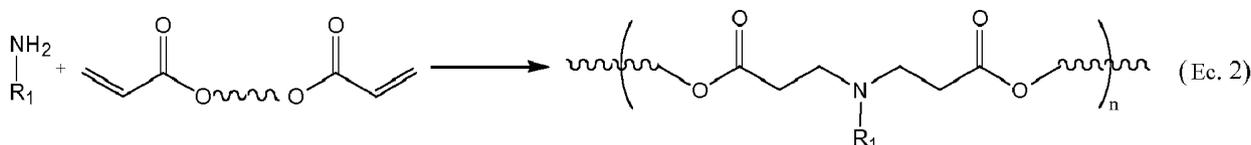
5

En otra realización particularmente preferida, el polímero de la presente invención es un copolímero en el que una de las unidades de repetición es un poli(β -amino-éster) de la presente invención. Otras unidades de repetición que van a usarse en el copolímero incluyen, pero no se limitan a, polietileno, poli(glicolida-co-lactida) (PLGA), ácido poliglicólico, polimetacrilato, etc.

10 Síntesis de polímeros

Los polímeros de la invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, los polímeros se preparan a partir de materiales de partida comercialmente disponibles. En otra realización preferida, los polímeros se preparan a partir de materiales de partida preparados de manera fácil y/o económica.

15 En una realización particularmente preferida, los polímeros de la invención se preparan mediante la adición conjugada de una amina primaria a un bis(éster de acrilato). El esquema de reacción que utiliza aminas primarias se muestra a continuación:



20 Las aminas primarias útiles en este método incluyen, pero no se limitan a, metilamina, etilamina, isopropilamina, anilina, anilinas sustituidas y etanolamina. Los bis(ésteres de acrilato) útiles en este método incluyen, pero no se limitan a, diacrilato de 1,4-butanodiol, dimetacrilato de 1,4-butanodiol, diacrilato de 1,2-etanodiol, diacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato de 2,5-hexanodiol y diacrilato de 1,3-propanodiol. Cada uno de los monómeros se disuelve en un disolvente orgánico (por ejemplo, THF, CH_2Cl_2 , MeOH, EtOH, CHCl_3 , hexanos, CCl_4 , dimetoxietano, dietil éter, etc.). Se prefieren los disolventes orgánicos debido a la susceptibilidad de hidrólisis de los poliésteres. Las soluciones resultantes se combinan y la mezcla de reacción se calienta para generar el polímero deseado. En una realización particularmente preferida, la mezcla de reacción se mantiene a 20°C. En otra realización particularmente preferida, la mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 50°C. Aún en otra realización particularmente preferida, la mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 75°C. La mezcla de reacción también puede enfriarse hasta aproximadamente 0°C. La reacción de polimerización también puede estar catalizada. En otra realización preferida, pueden usarse uno o más tipos de monómeros de amina y/o monómeros de diacrilato en la reacción de polimerización. Por ejemplo, puede usarse una combinación de etanolamina y etilamina para preparar un polímero más hidrófilo que uno preparado usando etilamina sólo, y también más hidrófobo que uno preparado usando etanolamina sólo.

35 El polímero sintetizado puede purificarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, precipitación, cristalización, cromatografía, etc. En una realización particularmente preferida, el polímero se purifica a través de precipitaciones repetidas en disolvente orgánico (por ejemplo, dietil éter, hexano, etc.). En una realización particularmente preferida, el polímero se aísla como una sal de clorhidrato. Tal como apreciaría un experto en esta técnica, el peso molecular del polímero sintetizado y el grado de reticulación pueden determinarse mediante las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, materiales de partida, concentración, orden de adición, disolvente, etc.) usadas en la síntesis (Odián Principles in Polymerization 3^a ed., Nueva York: John Wiley & Sons, 1991; Stevens Polymer Chemistry: An Introduction 2^a ed., Nueva York: Oxford University Press, 1990).

40 En una realización, se prepara en paralelo una biblioteca de diferentes polímeros. Se añade una amina y/o bis(éster de acrilato) diferentes a cada vial en un conjunto de viales usados para preparar la biblioteca. La serie de viales se

incuba a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficientes para permitir que se produzca la polimerización de los monómeros. En una realización, los viales se incuban a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 5 días. Los polímeros pueden examinarse entonces usando técnicas de alto rendimiento para identificar polímeros con una característica deseada (por ejemplo, solubilidad en agua, solubilidad a diferentes pH, capacidad para unirse a polinucleótidos, capacidad para unirse a heparina, capacidad para unirse a moléculas pequeñas, capacidad para formar micropartículas, capacidad para aumentar la eficiencia de transfección, etc.). En ciertas realizaciones, los polímeros pueden examinarse para determinar propiedades o características útiles en terapia génica (por ejemplo, capacidad para unirse a polinucleótidos, aumento en la eficiencia de transfección). En otras realizaciones los polímeros pueden examinarse para determinar propiedades o características útiles en la técnica de la ingeniería de tejidos (por ejemplo, capacidad para ayudar al crecimiento celular o tisular, capacidad para promover la unión celular).

Complejos de polinucleótido

Se conoce bien la capacidad de compuestos catiónicos para interactuar con polinucleótidos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas. Se han preparado polímeros catiónicos tales como poli(lisina) y estudiado para determinar su capacidad para complejar polinucleótidos. Sin embargo, los polímeros estudiados hasta la fecha han incorporado aminas en los extremos terminales de aminas accesibles o cadenas laterales conformacionalmente flexibles, cortas (por ejemplo, poli(lisina)) en la superficie de poliaminas esféricas o globulares (por ejemplo, dendrímeros de PAMAM y PEI). Se cree que la interacción del polímero con el polinucleótido impide al menos parcialmente la degradación del polinucleótido. Neutralizando la carga en la estructura principal del polinucleótido, el complejo neutro o ligeramente cargado positivamente también puede pasar más fácilmente a través de membranas hidrófobas (por ejemplo, citoplasmática, lisosómica, endosómica, nuclear) de la célula. En una realización particularmente preferida, el complejo está ligeramente cargado positivamente. En otra realización particularmente preferida, el complejo tiene un potencial ζ positivo, más preferiblemente el potencial ζ es de entre +1 y +30.

Los poli(β -amino-ésteres) de la presente invención presentan aminas terciarias en la estructura principal del polímero. Aunque estas aminas están más impedidas, están disponibles para interactuar con un polinucleótido. Los polinucleótidos o derivados de los mismos se ponen en contacto con los polímeros de la invención en condiciones adecuadas para formar complejos de polinucleótido/polímero. El polímero está preferiblemente al menos parcialmente protonado para formar un complejo con el polinucleótido cargado negativamente. En una realización preferida, los complejos de polinucleótido/polímero forman nanopartículas que son útiles en la administración de polinucleótidos a células. En una realización particularmente preferida, el diámetro de las nanopartículas oscila desde 50-500 nm, más preferiblemente el diámetro de las nanopartículas oscila desde 50-200 nm y lo más preferiblemente desde 90-150 nm. Las nanopartículas pueden estar asociadas con un agente de direccionamiento tal como se describe a continuación.

Polinucleótido

El polinucleótido que va a complejarse o encapsularse mediante los polímeros de la invención puede ser cualquier ácido nucleico incluyendo pero sin limitarse a ARN y ADN. Los polinucleótidos pueden ser de cualquier tamaño o secuencia, y pueden ser mono o bicatenarios. En ciertas realizaciones preferidas, el polinucleótido es mayor de 100 pares de bases de longitud. En otras ciertas realizaciones preferidas, el polinucleótido es mayor de 1000 pares de bases de longitud y puede ser mayor de 10.000 pares de bases de longitud. El polinucleótido está preferiblemente purificado y sustancialmente puro. Preferiblemente, el polinucleótido tiene una pureza mayor del 50%, más preferiblemente una pureza mayor del 75% y lo más preferiblemente una pureza mayor del 95%. El polinucleótido puede proporcionarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. En ciertas realizaciones preferidas, el polinucleótido se ha diseñado por ingeniería genética usando técnicas recombinantes (para una descripción más detallada de estas técnicas, véase Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch, y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)). El polinucleótido puede obtenerse también de fuentes naturales y purificarse de componentes contaminantes encontrados normalmente en la naturaleza. El polinucleótido también puede sintetizarse químicamente en un laboratorio. En una realización preferida, el polinucleótido se sintetiza usando química en fase sólida convencional.

El polinucleótido puede modificarse por medios químicos o biológicos. En ciertas realizaciones preferidas, estas modificaciones conducen a un aumento de estabilidad del polinucleótido. Las modificaciones incluyen metilación, fosforilación, ocupación de extremos, etc.

Pueden usarse también derivados de polinucleótidos en la presente invención. Estos derivados incluyen modificaciones en las bases, azúcares y/o enlaces fosfato del polinucleótido. Las bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las encontradas en los siguientes análogos de nucleósido: 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina. Los azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, 3'-azido-2',3'-didesoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, arabinosa (el epímero 2' de

la ribosa), azúcares acíclicos y hexosas. Los nucleósidos pueden unirse entre sí mediante enlaces distintos del enlace fosfodiéster encontrado en ADN y ARN que se producen de manera natural. Los enlaces modificados incluyen, pero no se limitan a, enlaces de fosforotioato y 5'-N-fosforamida. Pueden usarse combinaciones de las diversas modificaciones en un único polinucleótido. Estos polinucleótidos modificados pueden proporcionarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; sin embargo, tal como apreciarán los expertos en esta técnica, los polinucleótidos modificados se preparan preferiblemente usando química sintética *in vitro*.

Los polinucleótidos que van a administrarse pueden estar en cualquier forma. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un plásmido circular, un plásmido linealizado, un cósmido, un genoma viral, un genoma viral modificado, un cromosoma artificial, etc.

El polinucleótido puede ser de cualquier secuencia. En ciertas realizaciones preferidas, el polinucleótido codifica para una proteína o un péptido. Las proteínas codificadas pueden ser enzimas, proteínas estructurales, receptores, receptores solubles, canales iónicos, proteínas farmacéuticamente activas, citocinas, interleucinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, factores de coagulación, albúmina, factores de crecimiento, hormonas, insulina, etc. El polinucleótido puede comprender también regiones reguladoras para controlar la expresión de un gen. Estas regiones reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, promotores, elementos potenciadores, elementos represores, caja TATA, sitios de unión ribosómicos, sitios de terminación para la transcripción, etc. En otras realizaciones particularmente preferidas, el polinucleótido no está destinado a codificar para una proteína. Por ejemplo, el polinucleótido puede usarse para fijar un error en el genoma de la célula que está transfectándose.

El polinucleótido también puede proporcionarse como un agente antisentido o ARN de interferencia (ARNi) (Fire y otros, *Nature* 391; 806-811, 1998).

La terapia antisentido pretende incluir, por ejemplo, la administración o provisión *in situ* de oligonucleótidos mono o bicatenarios o sus derivados que se hibridan específicamente, por ejemplo, se unen, en condiciones celulares, con ARNm celular y/o ADN genómico, o mutantes de los mismos, de modo que inhiben la expresión de la proteína codificada, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción (Crooke "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" *Biochim, Biophys. Acta* 1489(1):31-44, 1999; Crooke "Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2):123-126, discussion 127, 2000; *Methods in Enzymology* volúmenes 313-314, 1999). La unión puede ser mediante complementariedad de pares de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de la unión a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice (es decir, formación de triple hélice) (Chan y otros, *J. Mol. Med.* 75(4):267-282, 1997).

En una realización particularmente preferida, el polinucleótido que va a administrarse comprende una secuencia que codifica para una proteína o un péptido antigénico. Pueden administrarse nanopartículas que contienen estos polinucleótidos a un individuo para inducir una respuesta inmunológica suficiente para disminuir la posibilidad de una infección posterior y/o aliviar los síntomas asociados con una infección de este tipo. El polinucleótido de estas vacunas puede combinarse con interleucinas, interferones, citocinas y adyuvantes tales como toxina del cólera, alumbre, adyuvante de Freund, etc. Se conoce un gran número de compuestos adyuvantes; los National Institutes of Health han preparado un compendio útil de muchos de tales compuestos y puede encontrarse en el sitio web (<http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf>; véase también Allison *Dev. Biol. Stand.* 92:3-11, 1998; Unkeless y otros, *Annu. Rev. Immunol.* 6:251-281, 1998; y Phillips y otros, *Vaccine* 10:151-158, 1992).

La proteína o los péptidos antigénicos codificados por el polinucleótido pueden derivarse de organismos bacterianos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Leptospirosis interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Camphylobacter jejuni*; de virus tales como de la viruela, de la gripe A y B, virus sincitial respiratorio, parainfluenza, del sarampión, VIH, de la varicela zóster, del herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, rotavirus, rinovirus, adenovirus, papilomavirus, poliovirus, de las paperas, de la rabia, de la rubéola, virus de coxsackie, de la encefalitis equina, de la encefalitis japonesa, de la fiebre amarilla, de la fiebre del valle del Rift, virus de la hepatitis A, B, C, D y E, y de organismos fúngicos, protozoarios y parasitarios tales como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni*.

Micropartículas

Los poli(β -amino-ésteres) divulgados en el presente documento pueden usarse también para formar dispositivos de administración de fármacos. Los polímeros de la invención pueden usarse para encapsular agentes incluyendo polinucleótidos, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, metales, compuestos organometálicos, etc. Los polímeros de la invención tienen varias propiedades que los hacen particularmente adecuados en la preparación de dispositivos de administración de fármacos. Éstas incluyen 1) la capacidad del polímero para complejar y "proteger"

agentes lábiles; 2) la capacidad para tamponar el pH en el endosoma; 3) la capacidad para actuar como una "esponja de protones" y provocar endosomolisis; y 4) la capacidad para neutralizar la carga en agentes cargados negativamente. En una realización preferida, los polímeros se usan para formar micropartículas que contienen el agente que va a administrarse. En una realización particularmente preferida, el diámetro de las micropartículas oscila entre 500 nm y 50 micras, más preferiblemente desde 1 micra hasta 20 micras y lo más preferiblemente desde 1 micra hasta 10 micras. En otra realización particularmente preferida, las micropartículas oscilan desde 1-5 micras. El polímero de encapsulación puede combinarse con otros polímeros (por ejemplo, PEG, PLGA) para formar las microesferas.

Métodos de preparación de micropartículas

Las micropartículas de la invención pueden prepararse usando cualquier método conocido en esta técnica. Éstos incluyen, pero no se limitan a, secado por pulverización, emulsión simple y doble emulsión - evaporación del disolvente, extracción con disolvente, separación de fases, coacervación simple y compleja y otros métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Métodos particularmente preferidos de preparación de las partículas son el secado por pulverización y el procedimiento de doble emulsión. Las condiciones usadas en la preparación de las micropartículas pueden alterarse para producir partículas de una propiedad o un tamaño deseado (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El método de preparación de la partícula y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, velocidad de flujo de aire, etc.) usados pueden depender también del agente que está encapsulándose y/o de la composición de la matriz de polímero.

Se describen en la bibliografía métodos desarrollados para preparar micropartículas para la administración de agentes encapsulados (por ejemplo, véase Doubrow, M., Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz y Langer, J. Controlled Release 5:13-22, 1987; Mathiowitz y otros, Reactive Polymers 6; 275-283, 1987; Mathiowitz y otros, J. Appl. Polymer Sci. 35:755-774, 1988).

Si las partículas preparadas mediante cualquiera de los métodos anteriores tienen un tamaño que oscila fuera del intervalo deseado, las partículas pueden clasificarse por tamaños, por ejemplo, usando un tamiz.

Agente

Los agentes que van a administrarse mediante el sistema divulgado en el presente documento pueden ser agentes terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos. Cualquier compuesto químico que vaya a administrarse a un individuo puede administrarse usando las micropartículas de la invención. El agente puede ser una molécula pequeña, un compuesto organometálico, un ácido nucleico, una proteína, un péptido, un polinucleótido, un metal, un compuesto químico marcado isotópicamente, un fármaco, una vacuna, un agente inmunológico, etc.

Los agentes pueden ser compuestos orgánicos con actividad farmacéutica. El agente puede ser un fármaco usado clínicamente. El fármaco puede ser un antibiótico, un agente antiviral, un anestésico, un agente esteroideo, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un antígeno, una vacuna, un anticuerpo, un descongestivo, un antihipertensor, un sedante, un agente anticonceptivo, un agente progestacional, un analgésico, un antidepresivo, un antipsicótico, un agente bloqueante β -adrenérgico, un diurético, un agente activo cardiovascular, un agente vasoactivo, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente nutricional, etc.

El agente que va a administrarse puede ser una mezcla de agentes. Por ejemplo, puede administrarse un anestésico local en combinación con un agente antiinflamatorio tal como un esteroide. Pueden administrarse también anestésicos locales con agentes vasoactivos tales como epinefrina. Para dar otro ejemplo, puede combinarse un antibiótico con un inhibidor de la enzima producida comúnmente por bacterias para inactivar el antibiótico (por ejemplo, penicilina y ácido clavulánico).

Los agentes de diagnóstico incluyen gases; metales; agentes de obtención de imágenes comercialmente disponibles usados en tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (CAT), tomografía computerizada por emisión de fotón único, rayos X, fluoroscopia y obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI); y agentes de contraste. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso como agentes de contraste en MRI incluyen quelatos de gadolinio, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo. Los ejemplos de materiales útiles para la obtención de imágenes por CAT y rayos X incluyen materiales a base de yodo.

Los agentes profilácticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, complementos nutricionales y vacunas. Las vacunas pueden comprender proteínas o péptidos aislados, virus y organismos inactivados, virus y organismos muertos, virus u organismos alterados genéticamente, y extractos celulares. Pueden combinarse agentes profilácticos con interleucinas, interferones, citocinas y adyuvantes tales como toxina del cólera, alumbre, adyuvante de Freund, etc. Los agentes profilácticos incluyen antígenos de organismos bacterianos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*,

Leptospirosis interrogans, Borrelia burgdorferi, Campylobacter jejuni; antígenos de virus tales como de la viruela, de la gripe A y B, virus sincitial respiratorio, parainfluenza, del sarampión, VIH, de la varicela zóster, del herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, rotavirus, rinovirus, adenovirus, papilomavirus, poliovirus, de las paperas, de la rabia, de la rubéola, virus de coxsackie, de la encefalitis equina, de la encefalitis japonesa, de la fiebre amarilla, de la fiebre del valle del Rift, virus de la hepatitis A, B, C, D y E; y de organismos fúngicos, protozoarios y parásitarios tales como Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Candida albicans, Candida tropicalis, Nocardia asteroides, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis, Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, Entamoeba histolytica, Toxoplasma gondii, Trichomonas vaginalis, Schistosoma mansoni. Estos antígenos pueden estar en forma de organismos completos muertos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, hidratos de carbono o combinaciones de los mismos.

Agentes de direccionamiento

Las micro y nanopartículas de la invención pueden modificarse para incluir agentes de direccionamiento puesto que a menudo es deseable seleccionar como diana una célula, colección de células o un tejido particular. Se conocen en la técnica una variedad de agentes de direccionamiento que dirigen composiciones farmacéuticas a células particulares (véase, por ejemplo, Cotten y otros, Methods Enzym. 217:618, 1993). Los agentes de direccionamiento pueden incluirse por toda la partícula o pueden estar sólo en la superficie. El agente de direccionamiento puede ser una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, una glicoproteína, un lípido, una molécula pequeña, etc. El agente de direccionamiento puede usarse para seleccionar como diana células o tejidos específicos o puede usarse para promover la endocitosis o fagocitosis de la partícula. Los ejemplos de agentes de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LSL), transferrina, asialicoproteínas, proteína de la envuelta gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hidratos de carbono, ligandos de receptor, ácido siálico, etc. Si el agente de direccionamiento se incluye por toda la partícula, el agente de direccionamiento puede incluirse en la mezcla que se usa para formar las partículas. Si el agente de direccionamiento está sólo en la superficie, el agente de direccionamiento puede estar asociado (por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas, por enlaces de hidrógeno, de van der Waals u otras interacciones) con las partículas formadas usando técnicas químicas convencionales.

Composiciones farmacéuticas

Una vez que se han preparado las micropartículas o nanopartículas (polímero complejo con polinucleótido), pueden combinarse con uno o más excipientes farmacéuticos para formar una composición farmacéutica que es adecuada para administrarse a animales incluyendo seres humanos. Tal como apreciaría un experto en esta técnica, los excipientes pueden elegirse basándose en la vía de administración tal como se describe a continuación, el agente que está administrándose, el transcurso de tiempo de la administración del agente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y para su uso según la presente invención pueden incluir un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una carga, un diluyente, un material de encapsulación o un adyuvante de formulación de cualquier tipo no tóxico, inerte, sólido, semisólido o líquido. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes tales como Tween 80; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y también pueden estar presentes soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes de perfume, conservantes y antioxidantes, según el juicio del formulador. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a seres humanos y/o animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intranasal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (como mediante polvos, cremas, pomadas o gotas), por vía bucal o como una pulverización oral o nasal.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos (es decir, micropartículas, nanopartículas, complejos de polinucleótido/polímero), las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y agentes de perfume.

Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes de suspensión y agentes de dispersión o humectantes adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, disolución de cloruro de sodio isotónica y según la U.S.P. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijado insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. En una realización particularmente preferida, las partículas se suspenden en un fluido vehículo que comprende carboximetilcelulosa de sodio al 1% (p/v) y Tween 80 al 0,1% (v/v).

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando las partículas con vehículos o excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por tanto se funden en la cavidad rectal o vaginal y liberan las micropartículas.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, las partículas se mezclan con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, inerte, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o extendedores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica también puede comprender agentes de tamponamiento.

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina llenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberan el/los principio(s) activo(s) sólo, o preferentemente, en una cierta parte del tubo digestivo, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina llenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de la invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. Las partículas se mezclan en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario según se requiera. Se contempla también que las formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos y gotas oculares están dentro del alcance de esta invención.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de las partículas de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de las partículas de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales tales como clorofluorohidrocarburos.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la administración controlada de un compuesto al organismo. Tales formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispensando las micropartículas o nanopartículas en un medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de la velocidad o bien dispersando las partículas en un gel o una matriz polimérica.

Éstos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán adicionalmente tras la consideración de los siguientes ejemplos, que pretenden ilustrar ciertas realizaciones particulares de la invención pero no pretenden limitar su alcance, tal como se define mediante las reivindicaciones.

Ejemplos

5 Ejemplo de referencia 1 - Poli(β -amino-ésteres) degradables: Síntesis, caracterización y autoensamblaje con ADN de plásmido

Sección experimental

Consideraciones generales. Todas las manipulaciones que implicaban células vivas o materiales estériles se realizaron en un flujo laminar usando técnica estéril convencional. Se registraron espectros de ^1H -RMN (300,100 MHz) y ^{13}C -RMN (75,467 MHz) en un espectrómetro Varian Mercury. Todos los valores de desplazamientos químicos se dan en ppm y se mencionan con respecto a una señal de carbono o protón residual del disolvente. Se realizó la cromatografía de permeación en gel (CPG) de la fase orgánica usando una bomba isocrática serie 1100 de Hewlett Packard, un inyector modelo 7125 de Rheodyne con un bucle de inyección de 100 μl y dos columnas PL-Gel mixed-D en serie (5 μm , 300 x 7,5 mm, Polymer Laboratories, Amherst, MA). Se usó THF/piperidina 0,1 M como eluyente a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Se recogieron los datos usando un refractómetro interferométrico Optilab DSP (Wyatt Technology, Santa Bárbara, CA) y se procesaron usando el paquete informático TriSEC GPC (Viscotek Corporation, Houston, TX). Los pesos moleculares y las polidispersidades de los polímeros se notifican con respecto a patrones de poliestireno monodispersados. La CPG de la fase acuosa la realizó American Polymer Standards (Mentor, OH) usando columnas Ultrahydrogel L y 120A en serie (Waters Corporation, Milford, MA). Se usó agua (ácido acético al 1%, NaCl 0,3 M) como eluyente a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Se recogieron los datos usando un refractómetro diferencial Knauer y se procesaron usando un paquete informático GPC-PRO 3.13 para IBM/PC (Viscotek Corporation, Houston, TX). Los pesos moleculares y las polidispersidades de los polímeros se notifican con respecto a patrones de poli(2-vinilpiridina). Para los ensayos de citotoxicidad, se midió la absorbancia usando un lector de microplacas MR5000 de Dynatech Laboratories a 560 nm.

Materiales. Se adquirieron N,N'-dimetiletilendiamina, piperazina y 4,4'-trimetilendipiperidina de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Se adquirió diacrilato de 1,4-butanodiol de Alfa Aesar Organics (Ward Hill, MA). Se adquirió bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Se produjo ADN de plásmido (pCMV-Luc) en E. coli (DH5 α , un regalo por generosidad de Zycos, Inc., Cambridge, MA), se aisló con un kit Qiagen, y se purificó mediante precipitación en etanol. Se adquirieron células NIH 3T3 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) y se hicieron crecer a 37°C, CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco, 90%; suero bovino fetal, 10%; penicilina, 100 unidades/ml; estreptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todos los demás materiales y disolventes se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional.

Procedimiento de polimerización general. En un experimento típico, se pesaron diacrilato de 1,4-butanodiol (0,750 g, 0,714 ml, 3,78 mmoles) y diamina (3,78 mmoles) en dos viales separados y se disolvieron en THF (5 ml). Se añadió la disolución que contenía la diamina a la disolución de diacrilato por medio de una pipeta. Se añadió una barra agitadora recubierta de teflón, se selló el vial con un tapón de rosca revestido de teflón y se calentó la reacción a 50°C. Tras 48 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se añadió mediante goteo lentamente agitando enérgicamente dietil éter o hexanos. Se recogió el polímero y se secó a vacío antes del análisis.

Síntesis del polímero 1. Se preparó el polímero 1 según el procedimiento general resumido anteriormente. ^1H -RMN δ (CDCl₃, 300 MHz) 4,11 (t a, 4H), 2,75 (t a, J=7,05 Hz, 4 H), 2,53 (s a, 4H), 2,50 (t a, (osc.), J=7,20 Hz, 4H), 2,28 (s a, 6H), 1,71, (m a, 4H), ^{13}C -RMN δ (CDCl₃, 75,47 MHz) 172,55, 64,14, 55,31, 53,39, 42,47, 32,54, 25,53.

Síntesis del polímero 2. Se preparó el polímero 2 según el procedimiento general resumido anteriormente. ^1H -RMN δ (CDCl₃, 300 MHz) 4,11 (t a, 4H), 2,74 (t a, J=7,35, 4H), 2,56 (m a, 12H), 1,71 (t a, 4H). ^{13}C -RMN δ (CDCl₃, 75,47 MHz) 172,24, 64,19, 53,55, 52,75, 32,27, 25,52.

Síntesis del polímero 3. Se preparó el polímero 3 según el procedimiento general resumido anteriormente. ^1H -RMN δ (CDCl₃, 300 MHz) 4,11 (t a, 4H), 3,00 (m a, 4H), 2,79 (m a, 4H), 2,65 (m a, 4H), 2,11 (m a, 4H), 1,70 (m a, 8H), 1,25 (m a, 12H). ^{13}C -RMN δ (CDCl₃, 75,47 MHz) 172,37, 64,13, 53,89 (a), 36,74, 35,58, 32,11 (a), 25,45, 24,05.

Estudios de degradación de polímeros. Se disolvieron las sales de clorhidrato de los polímeros 1-3 en tampón acetato (1 M, pH = 5,1) o tampón HEPES (1 M, pH = 7,4) a una concentración de 5 mg/ml (el uso de concentraciones milimolares de tampón dio como resultado una reducción sustancial del pH durante la degradación debido a la producción de productos de degradación ácidos). Se incubaron las muestras a 37°C en un rotor mecánico, y se extrajeron alícuotas (1 ml) a intervalos de tiempo apropiados. Se congelaron las alícuotas inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Se extrajo el polímero de las sales de tampón secadas usando THF/piperidina 0,1 M (1 ml), y se analizaron las muestras directamente mediante CPG.

Formación de complejos de ADN/polímero y ensayos de retardo en gel de agarosa. Se formaron complejos de ADN/polímero añadiendo 50 μl de una disolución de ADN de plásmido (pCMV Luc, 2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ en agua) a una

disolución con agitación suave con vórtex de la sal de clorhidrato de los polímeros 1-3 (50 μ l en MES 25 mM, pH = 6,0, concentraciones ajustadas para proporcionar la razones en peso deseadas de ADN/polímero). Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras lo cual se hicieron pasar 20 μ l en un gel de agarosa al 1% (HEPES, 20 mM, pH = 7,2, 65 V, 30 min.). Se cargaron las muestras sobre el gel con un tampón de carga que consistía en Ficoll 400 al 10% (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en HEPES (25 mM, pH = 7,2). No se incluyó azul de bromofenol como indicador visual en el tampón de carga, puesto que este colorante cargado parecía interferir con la complejación del polímero y el ADN. Se visualizaron bandas de ADN bajo iluminación UV mediante tinción con bromuro de etidio.

Dispersión de luz láser cuasi-elástica (Quasi-Elastic Laser Light Scattering) (QELS) y medición de los potenciales ζ . Se realizaron experimentos de QELS y mediciones del potencial ζ usando un detector de dispersión de luz dinámica ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, láser de 15 mW, haz incidente = 676 nm). Se formaron complejos de ADN/polímero tal como se describió anteriormente para los ensayos de retardo en gel de agarosa. Se diluyeron las muestras con 900 μ l de HEPES (20 mM, pH = 7,0), se añadieron a una muestra de complejo de ADN/polímero con agitación suave con vórtex (volumen total = 1 ml, pH = 7,0). Se determinaron los tamaños de partícula promedio y los potenciales ζ a 25°C. Se recogieron funciones de correlación a un ángulo de dispersión de 90°, y se calcularon los tamaños de partícula usando la opción MAS del software de determinación de tamaños de partícula de BIC (versión 2.30) usando la viscosidad y el índice de refracción del agua pura a 25°C. Los tamaños de partícula se expresan como diámetros eficaces suponiendo una distribución logarítmica normal. Se midieron las movilidades electroforéticas promedio a 25°C usando el software de análisis del potencial zeta BIC PALS y se calcularon los potenciales zeta usando el modelo de Smoluchowsky para suspensiones acuosas. Se realizaron tres mediciones en cada muestra, y los resultados se notifican como diámetros promedio y potenciales zeta.

Ensayos de citotoxicidad. Se hicieron crecer células NIH 3T3 inmortalizadas en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra inicial de 10.000 células/pocillo en 200 μ l de medio de crecimiento (medio de Eagle modificado por Dulbecco al 90%, suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 μ g/ml). Se hicieron crecer las células durante 24 horas, tras lo cual se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por 180 μ l de medio libre de suero. Se añadieron cantidades apropiadas de polímero en alícuotas de 20 μ l. Se incubaron las muestras a 37°C durante 5 horas y se determinó la actividad metabólica de cada pocillo usando un ensayo de MTT/azul de tiazolilo: a cada pocillo se le añadieron 25 μ l de una disolución 5 mg/ml de disolución madre de MTT en tampón PBS estéril. Se incubaron las muestras a 37°C durante 2 horas, y se añadieron 100 μ l de tampón de extracción (SDS al 20% p/v en DMF/agua (1:1), pH = 4,7) a cada pocillo. Se incubaron las muestras a 37°C durante 24 horas. Se midió la absorbancia óptica a 560 nm con un lector de microplacas y se expresó como un porcentaje con respecto a las células control.

Resultados y discusión

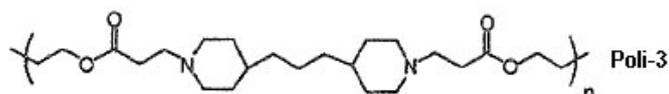
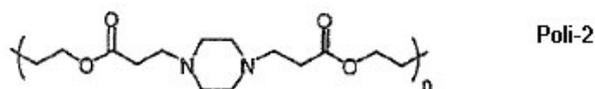
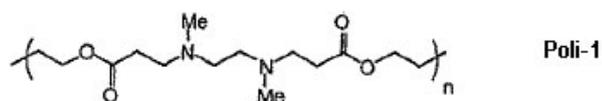
Síntesis y caracterización de polímeros

La síntesis de poli(amido-aminas) lineales que contenían aminas terciarias en sus estructuras principales se notificó por Ferruti y otros en 1970 por medio de la adición de aminas bifuncionales a bisacrilamidas (Anderson Nature 392 (Supl.):25-30, 1996; Friedman Nature Med. 2:144-147, 1996; Crystal Science 270:404-410, 1995; Mulligan Science 260:926-932, 1993). Las poli(amido-aminas) lineales se investigaron inicialmente como heparina y biomateriales complejantes de iones (Ferruti y otros, Advances in Polymer Science 58:55-92, 1984; Ferruti y otros, Biomaterials 15: 1235-1241, 1994; Ferruti y otros, Macromol. Chem. Phys. 200:1644-1654, 1999; Ferruti y otros, Biomaterials 15:1235-1241, 1994). Se ha visto aumentado el uso de poli(amido-aminas) dendríticas (PAMAM) en aplicaciones de transferencia génica debido a su capacidad para complejar ADN (Kukowska-Latallo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4897-4902, 1996; Tang y otros, Bioconjugate Chem. 7:703-714, 1996; Haensler y otros, Bioconjugate Chem. 4:372-379, 1993), y un informe reciente describe la aplicación de una familia de poli(amido-aminas) lineales en estudios de citotoxicidad y transfección celular (Hill y otros, Biochim. Biophys. Acta 1427:161-174, 1999). Por el contrario, las poli(éster-aminas) análogas formadas a partir de la adición de tipo Michael de aminas bifuncionales a ésteres de diacrilato han recibido una menor atención (Danusso y otros, Polymer 11:88-113, 1970; Ferruti y otros, Polymer 26:1336, 1985; Ferruti y otros, Advances in Polymer Science 58:55-92, 1984; Ferruti y otros, Biomaterials 15:1235-1241, 1994; Ferruti y otros, Macromol. Chem. Phys. 200:1644-1654, 1999; Ferruti y otros, Biomaterials 15:1235-1241, 1994; Kargina y otros, Vysokomol. Soedin. Seriya A 28:1139-1144, 1986; Rao y otros, J. Bioactive and Compatible Polymers 14:54-63, 1999).

El enfoque de poli(amino-éster) presenta una base particularmente atractiva para el desarrollo de nuevos vectores de transfección poliméricos por diversos motivos: 1) los polímeros contienen las aminas requeridas y enlaces fácilmente degradables, 2) posiblemente podrían sintetizarse múltiples análogos directamente a partir de materiales de partida comercialmente disponibles y 3) si los polímeros resultantes eran útiles como agentes de condensación de ADN, podrían diseñarse fácilmente por ingeniería genética futuras generaciones de polímero para presentar valores de pK_a de amina que abarquen el intervalo de pH fisiológicamente relevante. Este último punto era particularmente interesante, debido a que la capacidad de tamponamiento de las poliaminas se ha implicado recientemente como un factor que influye en el escape de ADN de endosomas celulares tras la endocitosis (Boussif

y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7297-7301, 1995; Haensler y otros, Bioconjugate Chem. 4:372-379, 1993; Behr Chimia 51:34-36, 1997; Demeneix y otros, en Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery (Felgner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151; Kabanov y otros, en Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998). Aunque se requiere la complejación de ADN con un polímero catiónico para compactar y proteger el ADN durante acontecimientos tempranos en el proceso de transfección, el ADN y el polímero deben descomplejarse en última instancia en el núcleo para permitir una transcripción eficaz (Luo y otros, Nat. Biotechnol. 18:33-37, 2000). En vista de este requisito, los policonaciones degradables podrían desempeñar un papel importante en acontecimientos de "desempaquetamiento de vectores" en el núcleo (Luo y otros, Nat. Biotechnol. 18:33-37, 2000; Schaffer y otros, Biotechnol. Bioeng. 67:598-606, 2000; Kabanov Pharm. Sci. Technol. Today 2:365-372, 1999). Finalmente, se hace la hipótesis de que los polímeros de esta estructura general, y los derivados de β -aminoácido en los que supuestamente se degradarían, serían significativamente menos tóxicos que la poli(lisina) y PEI. Tal como se resumió anteriormente, los policonaciones degradables (Putnam y otros, Macromolecules 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:6524-6525, 2000) y los polímeros lineales que contienen aminas relativamente impedidas ubicadas cerca de la estructura principal del polímero (Gonzalez y otros, Bioconjugate Chem. 10:1068-1074, 1999) son menos tóxicos que la poli(lisina) y PEI.

Se investigó la síntesis de los polímeros 1-3 por medio de la adición de las bis(aminas secundarias), N,N'-dimetiletilendiamina, piperazina y 4,4'-trimetildipiperidina, a diacrilato de 1,4-butanodiol (Danusso y otros, Polymer 11: 88-113, 1970; Kargina y otros, Vysokomol. Soedin. Seriya A 28:1139-1144, 1986). La polimerización de estos monómeros tuvo lugar en THF y CH_2Cl_2 a 50°C proporcionando los polímeros correspondientes en rendimientos de hasta el 86% (tabla 1). Se purificaron los polímeros a través de precipitación repetida en dietil éter o hexano. Se aisló el polímero 1 como un líquido viscoso transparente; se obtuvieron los polímeros 2 y 3 como sólidos blancos tras secar a alto vacío. Alternativamente, los polímeros 1-3 pudieron aislarse como sales de clorhidrato sólidas tras la adición de dietil éter/HCl a una disolución de polímero en THF o CH_2Cl_2 . Los tres polímeros eran solubles en disolventes orgánicos tales como THF, CH_2Cl_2 , CHCl_3 y MeOH y también eran solubles en agua a pH reducido. El polímero 1 y las sales de clorhidrato de los polímeros 1-3 eran abundantemente solubles en agua.



Los pesos moleculares de los polímeros 1-3 y sus correspondientes sales de clorhidrato se determinaron mediante cromatografía de permeación en gel (CPG) tanto de la fase orgánica como de la fase acuosa. Los pesos moleculares de los polímeros (M_n) oscilaban desde 5.800 para el polímero 1 hasta 32.000 para el polímero 3, con respecto a los patrones de poliestireno. Las distribuciones del peso molecular para estos polímeros eran monomodales con índices de polidispersidad (PDI) que oscilaban desde 1,55 hasta 2,55. En la tabla 1 se presentan datos de pesos moleculares representativos. Mientras que la síntesis de poli(amido-aminas) lineales se realiza generalmente usando alcoholes o agua como disolventes (Danusso y otros, Polymer 11:88-113, 1970; Ferruti y otros, Polymer 26:1336, 1985; Ferruti y otros, Advances in Polymer Science 58:55-92, 1984; Ferruti y otros, Biomaterials 15:1235-1241, 1994; Ferruti y otros, Macromol. Chem. Phys. 200:1644-1654, 1999; Ferruti y otros, Biomaterials 15:1235-1241, 1994), se emplearon THF anhidro y CH_2Cl_2 en la síntesis de poli(β -amino-ésteres) para minimizar las reacciones de hidrólisis durante la síntesis. Los rendimientos y los pesos moleculares de los polímeros sintetizados empleando CH_2Cl_2 como disolvente fueron generalmente mayores que los de los polímeros sintetizados en THF (tabla 1) (el polímero 1 no pudo sintetizarse en CH_2Cl_2). El color de la disolución de reacción evolucionó desde incoloro hasta un color rosa intenso casi inmediatamente tras la introducción de una disolución de N,N'-dimetiletilendiamina en CH_2Cl_2 en una disolución de diacrilato de 1,4-butanodiol en CH_2Cl_2 (véase la sección experimental anterior). El color evolucionó hasta naranja claro a lo largo del transcurso de la reacción, y se aisló un polímero naranja tras la precipitación en hexano. El polímero aislado era insoluble en CH_2Cl_2 , THF y agua a pH reducido y no se caracterizó estructuralmente. Este problema no se encontró para la reacción análoga en THF.).

Tabla 1. Datos de pesos moleculares representativos para los polímeros 1-3 (no de acuerdo con la invención).

Polímero	Disolvente	M _n ^c	PDI	Rendimiento, %
1 ^a	THF	---	---	---
1 ^a	CH ₂ Cl ₂	---	---	82%
2 ^a	THF	10.000	1,77	64%
2 ^a	CH ₂ Cl ₂	17.500	2,15	75%
3 ^a	THF	24.400	1,55	58%
3 ^a	CH ₂ Cl ₂	30.800	2,02	70%
1 ^b	THF	5.800	2,83	55%
2 ^b	CH ₂ Cl ₂	16.500	2,37	80% ^e
3 ^b	CH ₂ Cl ₂	31.200	2,55	86% ^e

^aCondiciones: [diamina] = [diacrilato de 1,4-butanodiol] = 0,38 M, 50°C, 48 h.

^bCondiciones: [diamina] = [diacrilato de 1,4-butanodiol] = 1,08 M, 50°C, 48 h.

^cEl Análisis de CPG se realizó en THF/piperidina 0,1 M y los pesos moleculares se notificaron frente a patrones de poliestireno.

^dNo se aisló ningún polímero en estas condiciones.

^eLa disolución de reacción se volvió muy viscosa y finalmente solidificó en estas condiciones.

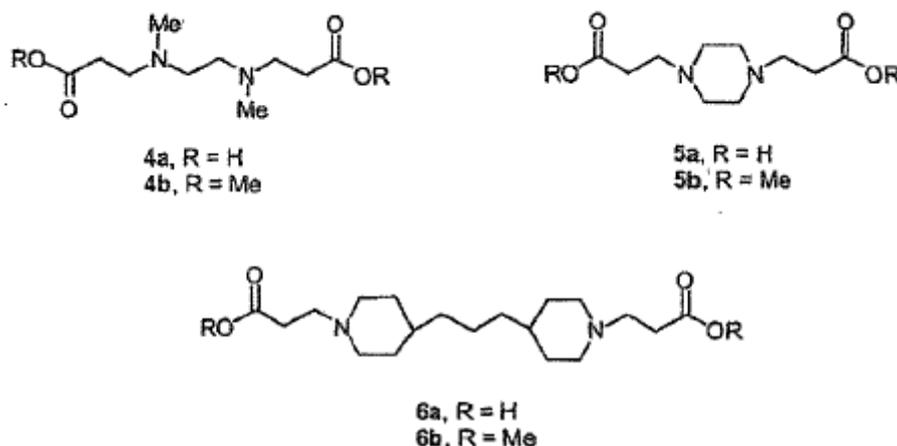
Se confirmaron las estructuras de los polímeros 1-3 mediante espectroscopía de ¹H y ¹³C-RMN. Estos datos indican que los polímeros se formaron a través de la adición conjugada de las aminas secundarias a los restos acrilato del diacrilato de 1,4-butanodiol y no a través de la formación de enlaces amida en las presentes condiciones de reacción. Adicionalmente, las aminas terciarias recién formadas en las estructuras principales de polímero no participan en reacciones de adición posteriores con monómero de diacrilato, lo que conduciría a la ramificación o la reticulación del polímero. Este resultado afortunado parece ser exclusivo de los polímeros de este tipo producidos a partir de monómeros de bis(amina secundaria). La síntesis de polímeros análogos empleando aminas primarias bifuncionales como monómeros (tales como 1,4-diaminobutano) puede conducir a la ramificación del polímero y a la formación de redes poliméricas reticuladas insolubles si las condiciones no se controlan explícitamente.

En vista de la yuxtaposición de aminas y ésteres dentro de las estructuras principales de los polímeros 1-3, inicialmente la preocupación era que la hidrólisis pudiera producirse demasiado rápidamente para que los polímeros tuvieran un uso práctico. Por ejemplo, poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) y poli[ácido α-(4-aminobutil)-L-glicólico] se degradan bastante rápidamente a pH casi neutro, teniendo semividas de aproximadamente 2 h (Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999) y 30 min. (Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:6524-6525, 2000), respectivamente (tales tiempos de degradación rápidos no excluyeron la aplicación de estos polímeros para la administración génica (véanse las referencias, Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:6524-6525, 2000). Sin embargo, velocidades de degradación extremadamente rápidas generalmente introducen preocupaciones adicionales en cuanto a la manipulación, el almacenamiento y la aplicación de polímeros degradables). Sin embargo, el análisis de los polímeros 1 y 2 mediante CPG acuosa usando ácido acético al 1%/agua como eluyente, reveló que la degradación era suficientemente lenta en medios ácidos. Por ejemplo, los perfiles de CPG de los polímeros 1 y 2 muestreados en estas condiciones a lo largo de un periodo de 4 - 5 horas no revelaron ningún cambio en los pesos moleculares o las polidispersidades (el polímero 3 no pudo analizarse mediante CPG acuosa). También estaba la preocupación de que pudiera producirse hidrólisis significativa de la estructura principal durante el aislamiento de las sales de clorhidrato de los polímeros 1-3. Para impedir la hidrólisis durante la protonación y el aislamiento de estos polímeros, se emplearon disolventes anhidro y se realizaron las reacciones bajo una atmósfera de argón. El análisis de los polímeros antes y después de la protonación no reveló hidrólisis observable. Por ejemplo, el perfil de CPG de una muestra del polímero 3 tras precipitación en CH₂Cl₂ con dietil éter 1,0 M/HCl (M_n = 15.300; PDI =1,90) era prácticamente idéntico al peso

molecular del polímero antes de la protonación ($M_n = 15.700$; PDI = 1,92) y no se manifestó ninguna especie de menor peso molecular (se recogieron datos de CPG comparativos empleando THF/piperidina 0,1 M como eluyente (véase la sección experimental anterior). Las sales de HCl de los polímeros eran insolubles en THF, pero eran solubles en THF/piperidina 0,1 M concomitante con la producción de un precipitado blanco fino que se filtró antes de la inyección). Pudieron almacenarse muestras sólidas de los polímeros 1-3 durante varios meses sin disminuciones detectables en el peso molecular.

Los polímeros 1-3 se diseñaron específicamente para degradarse por medio de hidrólisis de los enlaces éster en las estructuras principales de polímero. Sin embargo, una preocupación adicional en cuanto a la estabilidad y la biocompatibilidad globales de estos polímeros es el potencial para que se produzca degradación no deseada a través de una reacción de retro-Michael en condiciones fisiológicas. Debido a que estos polímeros se sintetizaron por medio de la reacción de tipo Michael de una amina secundaria con un éster de acrilato, es posible que los polímeros pudieran experimentar una reacción de retro-Michael para regenerar grupos acrilato libres, particularmente en condiciones ácidas. Los ésteres de acrilato son agentes alquilantes del ADN potenciales y, por tanto, son presuntos carcinógenos (para ejemplos recientes, véase: Schweikl y otros, *Mutat. Res.* 438:P71-P78, 1999; Yang y otros, *Carcinogenesis* 19:P1117-P1125, 1998). Debido a que se espera que estos polímeros se encuentren con el entorno de pH reducido dentro de las vesículas endosómicas de las células (pH = 5,0 - 5,5) durante la transfección, se abordó el potencial para que se produjera la degradación de estos polímeros a través de una ruta de retro-Michael.

En condiciones extremadamente ácidas (pH < 3) o básicas (pH > 12), los polímeros 1-3 se degradan rápida y exclusivamente para dar 1,4-butanodiol y los subproductos de bis(β -aminoácido) anticipados 4a-6a tal como se determina mediante espectroscopía de $^1\text{H-RMN}$. No se halló ninguna evidencia espectroscópica de adición de retro-Michael en estas condiciones. Cabe mencionar que sería menos probable que los productos de degradación de bis(β -aminoácido) 4a-6a experimentaran una reacción de retro-Michael, ya que los ácidos acrílicos son generalmente reactivos de la adición de Michael menos activados (Perlmutter, P., en *Conjugate Addition Reactions in Organic Synthesis*, Pergamon Press, Nueva York, 1992). No se observó degradación adicional de los compuestos 4a-6a en estas condiciones.



Se investigó la cinética de la degradación de polímero en la gama de condiciones que era posible que se encontraran estos polímeros durante la transfección. Se monitorizó la degradación a 37°C a valores de pH tamponado de 5,1 y 7,4 con el fin de aproximarse al pH de los entornos en el interior de vesículas endosómicas y el citoplasma, respectivamente. Se añadieron las sales de clorhidrato de los polímeros 1-3 al tampón apropiado, se incubaron a 37°C, y se extrajeron alícuotas en los tiempos apropiados. Se congelaron las alícuotas inmediatamente, se liofilizaron y se extrajo el polímero en THF/piperidina 0,1 M para el análisis mediante CPG. La figura 1 muestra los perfiles de degradación de los polímeros 1-3 como función del tiempo. Los polímeros se degradaban más lentamente a pH 5,1 que a pH 7,4. Los polímeros 1-3 mostraron perfiles de degradación similares a pH 5,1, teniendo cada polímero una semivida de aproximadamente 7-8 horas. Por el contrario, los polímeros 1 y 3 se degradaron completamente en menos de 5 horas a pH 7,4. Estos resultados concuerdan con los perfiles de pH-degradación de otros poliésteres que contienen amina, tales como poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), en los que se hace la hipótesis de que las funcionalidades de amina colgantes actúan como catalizadores nucleófilos intramoleculares y contribuyan a una degradación más rápida a mayor pH (Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122:6524-6525, 2000). Aunque no puede descartarse la posibilidad de ayuda intramolecular, es menos probable para los polímeros 1-3 debido a que las aminas terciarias en estos polímeros deben ser menos nucleófilas. La degradación del polímero 2 se producía más lentamente a pH 7,4 que a pH 5,1 (figura 1). Este comportamiento anómalo se debe lo más probablemente a la solubilidad incompleta del polímero 2 a pH 7,4 y a la naturaleza heterogénea resultante del medio de degradación (los polímeros 2 y 3 no son completamente solubles en agua a pH 7,4). Aunque el polímero 3 se disolvió de manera relativamente rápida durante el experimento de

degradación, fueron visibles partículas sólidas del polímero 2 durante varios días.

Ensayos de citotoxicidad

Se han estudiado ampliamente poli(lisina) y PEI como agentes de condensación de ADN y vectores de transfección (Luo y otros, *Nat. Biotechnol.* 18:33-37, 2000; Behr *Acc. Chem. Res.* 26:274-278, 1993; Zauner y otros, *Adv. Drug Del. Rev.* 30:97-113, 1998; Kabanov y otros, *Bioconjugate Chem.* 6:7-20, 1995; Boussif y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301, 1995; Behr *Chimia* 51:34-36, 1997; Demeneix y otros, en *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery* (Felgner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151; Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998) y son los patrones con los que a menudo se comparan nuevos vectores poliméricos (Putnam y otros, *Macromolecules* 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122: 6524-6525, 2000; Gonzalez y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074, 1999). Desafortunadamente, tal como se resumió anteriormente, estos polímeros están asociados también con niveles significativos de citotoxicidad y los altos niveles de expresión génica se realizan habitualmente sólo con un coste sustancial para la viabilidad celular. Para determinar el perfil de toxicidad de los polímeros 1-3, se realizó un ensayo de reducción con colorante MTT/azul de tiazolilo usando la línea celular NIH 3T3 y las sales de clorhidrato de los polímeros 1-3 como indicadores iniciales. La línea celular 3T3 se emplea comúnmente como población de examen de primer nivel para nuevos vectores de transfección, y el ensayo de MTT se usa generalmente como indicador inicial de citotoxicidad, ya que determina las influencias de las sustancias añadidas sobre el metabolismo y crecimiento celulares (Hansen y otros, *Immunol. Methods* 119: 203-210, 1989).

Se incubaron células con el polímero 1 ($M_n = 5.800$), el polímero 2 ($M_n = 11.300$) y el polímero 3 ($M_n = 22.500$) tal como se describió en la sección experimental. Tal como se muestra en la figura 2, las células incubadas con estos polímeros permanecieron viables al 100% con respecto a los controles a concentraciones de polímero de hasta 100 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados concuerdan extraordinariamente con los datos obtenidos para poblaciones de células tratadas con PEI ($M_n \approx 25.000$), incluidas como control positivo para el presente ensayo así como para facilitar la comparación con este agente de transfección bien conocido. Menos del 30% de las células tratadas con PEI siguieron siendo viables a una concentración de polímero de 25 $\mu\text{g/ml}$, y la viabilidad celular fue de tan sólo un 10% a mayores concentraciones de PEI en condiciones por lo demás idénticas. Se realizó un ensayo de MTT análogo usando bis(β -aminoácidos) 4a-6a sintetizados independientemente para examinar la citotoxicidad de los productos de degradación hidrolítica de estos polímeros. (Los bis(β -aminoácidos) 4a-6a deben o bien ser biológicamente inertes o bien presentar toxicidades leves o agudas que son inferiores que en los vectores de transfección policatiónicos tradicionales. En cualquier caso, la degradación de estos materiales debe facilitar un aclaramiento metabólico rápido). Los compuestos 4a-6a y 1,4-butanodiol no perturbaron el crecimiento celular ni el metabolismo en este ensayo de examen inicial (datos no mostrados). No puede hacerse una comparación más directa basada en la estructura/función entre los polímeros 1-3 y PEI debido a diferencias en el peso molecular y la estructura del polímero, contribuyendo ambos a la toxicidad de los policationes. No obstante, los excelentes perfiles de citotoxicidad de los polímeros 1-3 solos sugirieron que eran candidatos interesantes para un estudio adicional como agentes de condensación de ADN.

Autoensamblaje de los polímeros 1-3 con ADN de plásmido

Se conoce bien la tendencia de las poliaminas catiónicas a interactuar electrostáticamente con la estructura principal polianiónica del ADN en disolución acuosa. Siempre que los polímeros estén suficientemente protonados a pH fisiológico, y que las aminas sean estéricamente accesibles, tales interacciones pueden dar como resultado un proceso de autoensamblaje en el que los polímeros cargados negativa y positivamente forman conjugados bien definidos (Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998). La mayoría de las poliaminas investigadas como agentes complejantes de ADN y vectores de transfección han incorporado aminas en los extremos terminales de cadenas laterales cortas, conformacionalmente flexibles (por ejemplo, poli(lisina) y polímeros de metacrilato/metacrilamida) (Zauner y otros, *Adv. Drug Del. Rev.* 30:97-113, 1998; Kabanov y otros, *Bioconjugate Chem.* 6: 7-20, 1995; van de Wetering y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:589-597, 1999), o aminas accesibles sobre las superficies de poliaminas esféricas o globulares (por ejemplo, dendrímeros de PEI y PAMAM) (Boussif y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301, 1995; Kukowska-Latallo y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4897-4902, 1996; Tang y otros, *Bioconjugate Chem.* 7:703-714, 1996; Haensler y otros, *Bioconjugate Chem.* 4:372-379, 1993). Debido a que los polímeros 1-3 contienen aminas terciarias, y esas aminas terciarias están ubicadas en un entorno estéricamente ocupado (flanqueado en dos lados por las estructuras principales de polímero), inicialmente la preocupación era que las aminas protonadas no pudieran interactuar de manera suficientemente íntima con el ADN.

La capacidad de los polímeros 1-3 para complejar ADN de plásmido se demostró a través de un ensayo de desplazamiento en gel de agarosa. La electroforesis en gel de agarosa separa macromoléculas basándose tanto en la carga como en el tamaño. Por tanto, la inmovilización del ADN en un gel de agarosa en presencia de concentraciones crecientes de un policatión se ha usado ampliamente como ensayo para determinar el punto en el que se consigue la neutralización de la carga del ADN completa (Putnam y otros, *Macromolecules* 32:3658-3662, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122:6524-6525, 2000; Gonzalez y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074, 1999). Tal como se mencionó anteriormente, las sales de

clorhidrato de los polímeros 1-3 son solubles en agua. Sin embargo, los polímeros 2 y 3 no son completamente solubles a pH 7,2 a lo largo del intervalo completo de concentraciones de polímero deseadas. Por tanto, se prepararon complejos de ADN/polímero en tampón MES (25 mM, pH = 6,0). Se prepararon complejos de ADN/polímero añadiendo una disolución acuosa de ADN a disoluciones con agitación con vórtex de polímero en MES a concentraciones deseadas de ADN/polímero (véase la sección experimental). Los complejos de ADN/polímero resultantes siguieron siendo solubles tras la dilución en el tampón de ejecución de electroforesis (HEPES 20 mM, pH = 7,2) y se obtuvieron los datos a pH fisiológico. Como ejemplo representativo, la figura 3 representa la migración de ADN de plásmido (pCMV-Luc) en un gel de agarosa en presencia de concentraciones crecientes del polímero 1.

Tal como se muestra en la figura 3, el retardo de la migración del ADN comienza a razones de ADN/1 de tan sólo 1:0,5 (p/p) y la migración se retarda completamente a razones de ADN/polímero por encima de 1:1,0 (p/p) (en el presente documento se notifican razones en peso de ADN/polímero en vez de razones de carga de ADN/polímero. Aunque en la bibliografía se usan ambas convenciones, se encuentra que las razones en peso son más prácticas y universales, puesto que la carga global en una poliamina está sometida a variaciones del entorno en el pH y la temperatura. Aunque las razones de carga de ADN/polímero son descriptivas para polímeros tales como poli(lisina), son menos significativas para polímeros tales como PEI y 1-3 que incorporan menos aminas básicas). Los polímeros 2 y 3 inhiben completamente la migración del ADN de plásmido a razones (p/p) de ADN/polímero por encima de 1:10 y 1:1,5, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados varían notablemente con respecto a experimentos de retardo en gel realizados usando "monómeros" modelo. Puesto que los verdaderos monómeros y los productos de degradación de los polímeros 1-3 no representan adecuadamente las unidades de repetición de los polímeros, se usaron los bis(metil-ésteres) 4b - 6b para examinar el grado en el que son necesarias la polivalencia y la unión cooperativa de los policationes 1-3 para lograr la inmovilización del ADN. Los "monómeros" 4b - 6b no inhibieron la migración del ADN a razones (p/p) de ADN/"monómero" de hasta 1:30 (datos no mostrados).

Los motivos para la complejación menos eficaz empleando el polímero 2 en los ensayos de electroforesis en gel anteriores resultan lo más probablemente de diferencias en los valores de pK_a de las aminas en estos polímeros. La medición directa de los valores de pK_a de los polímeros 1-3 es complicada por su degradabilidad. Sin embargo, se predice que el intervalo de valores de pK_a de las aminas en los polímeros 1 y 2 se extiende desde aproximadamente 4,5 y 8,0 para el polímero 1, hasta 3,0 y 7,0 para el polímero 2, basándose en comparaciones con poli(β -amino-amidas) estructuralmente relacionadas. (Se han notificado los valores de pK_a de poli(β -amino-amidas) estructuralmente relacionadas que contienen unidades de piperazina y dimetiletilendiamina en sus estructuras principales. Barbucci y otros, *Polymer* 21:81-85, 1980; Barbucci y otros, *Polymer* 19:1329-1334, 1978; Barbucci y otros, *Macromolecules* 14:1203-1209, 1981). Como resultado, el polímero 2 debe protonarse en menor grado que el polímero 1 a pH fisiológico o casi neutro y, por tanto, sería un agente de condensación de ADN menos eficaz. El intervalo de valores de pK_a para el polímero 3 debe ser mayor que el intervalo para los polímeros 1 y 2 debido al aumento de distancia entre los átomos de nitrógeno. Por consiguiente, el polímero 3 forma complejos con ADN a concentraciones sustancialmente reducidas con respecto al polímero 2.

Los ensayos de retardo en gel de agarosa son útiles en la determinación del grado en el que los policationes interaccionan con el ADN. Sin embargo, para ser agentes de transfección útiles, los policationes deben poder autoensamblar también ADN de plásmido para dar complejos de polímero/ADN suficientemente pequeños como para entrar en una célula a través de endocitosis. Para la mayoría de los tipos de células, este requisito de tamaño es del orden de 200 nm o menos (Zauner y otros, *Adv. Drug Del. Rev.* 30:97-113, 1998), aunque pueden acomodarse también partículas más grandes (Demeneix y otros, en *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery* (Feigner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151; Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998). La capacidad de los polímeros 1-3 para compactar ADN de plásmido para dar estructuras de tamaño nanométrico se determinó mediante dispersión de luz láser cuasi-elástica (QELS), y las cargas superficiales relativas de los complejos resultantes se cuantificaron a través de mediciones de potenciales ζ . Las partículas de ADN/polímero usadas para determinar el tamaño de partícula y las mediciones de potenciales ζ se formaron tal como se describió anteriormente para ensayos de electroforesis en gel de agarosa y se diluyeron en tampón HEPES 20 mM (pH = 7,0) para el análisis, tal como se describió en la sección experimental.

El polímero 1 formó complejos con diámetros que oscilaban desde 90-150 nm a razones de ADN/polímero por encima de 1:2 (p/p), y el polímero 2 condensó ADN dando partículas del orden de 60-125 nm a razones de ADN/polímero por encima de 1:10. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos a partir de los experimentos anteriores de electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, las partículas en estos experimentos se agregaron a lo largo de un periodo de horas proporcionando complejos más grandes con diámetros en el intervalo de 1-2 micras. La tendencia de estas partículas a agregarse puede racionalizarse mediante los bajos potenciales ζ de las partículas de ADN/polímero observadas en estas condiciones. Por ejemplo, los complejos formados a partir del polímero 1 a razones de ADN/polímero por encima de 1:10 tenían potenciales ζ promedio de +4,51 ($\pm 0,50$) mV. Los potenciales ζ de los complejos formados a partir del polímero 2 a razones de ADN/polímero por encima de 1:20 fueron inferiores, alcanzando un valor limitante de +1,04 (0,57) mV. Estas diferencias se correlacionan con los valores de pK_a estimados para estos polímeros, ya que se esperaría que las superficies de las partículas formadas a partir del polímero 1 estuvieran ligeramente más protonadas que las partículas formadas a partir del polímero 2 a pH

= 7,0.

El polímero 3 formó complejos con diámetros en el intervalo de 50-150 nm a razones de ADN/polímero por encima de 1:2. Como ejemplo representativo, la figura 4 muestra los diámetros eficaces promedio de partículas formadas con el polímero 3 como función de la concentración de polímero. Los diámetros de las partículas variaban dentro del intervalo anterior de experimento a experimento en condiciones por lo demás idénticas, posiblemente debido a diferencias sutiles durante la agitación o la adición de las disoluciones de ADN durante la formación de los complejos. (El orden de adición de las disoluciones de polímero y de ADN tuvo un impacto considerable sobre la naturaleza de los complejos de ADN/polímero resultantes. Con el fin de formar partículas pequeñas, por ejemplo, fue necesario añadir la disolución de ADN a una disolución de polímero con agitación con vórtex. Para los casos en los que se añadieron disoluciones de polímero a ADN, sólo se observaron agregados de tamaño micrométrico. Por tanto, es posible que las diferencias sutiles en la agitación o la velocidad de adición pudieran ser responsables de la variación en el tamaño de partícula). Los potenciales ζ para los complejos formados a partir del polímero 3 eran del orden de +10 a +15 mV a razones de ADN/polímero por encima de 1:1, y los complejos no se agregaron de manera extensa a lo largo de un periodo de 18 horas (pH = 7, 25°C). Los potenciales ζ positivos de estos complejos pueden ser significativos más allá del contexto de estabilidad de partícula, ya que las cargas positivas netas en las superficies de las partículas pueden desempeñar un papel en el desencadenamiento de la endocitosis (Kabanov y otros, *Bioconjugate Chem.* 6:7-20, 1995; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122:6524-6525, 2000; Behr *Chimia* 51:34-36, 1997; Demeneix y otros, en *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery* (Felgner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151; Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998).

Las partículas formadas a partir del polímero 3 también eran relativamente estables a 37°C. Por ejemplo, se incubó una muestra de ADN/3 (ADN/3 = 1:5, diámetro promedio = 83 nm) a 37°C durante 4 horas. Tras 4 horas, se observó una distribución bimodal que consistía en una fracción con un promedio de 78 nm (>98% en número, 70% en volumen) y una fracción de agregados más grandes con diámetros promedio de aproximadamente 2,6 micras. Estos resultados sugieren que la degradación de complejos formados a partir del polímero 3 se producía más lentamente que la degradación del polímero en disolución, o que la degradación parcial no afectaba significativamente a la estabilidad de las partículas. También se ha observado la estabilidad aparentemente aumentada de los complejos de ADN/polímero formados a partir de policaciones degradables con respecto a la degradación de los polímeros en disolución para complejos de ADN/polímero formados a partir de poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999).

Los datos de tamaños de partícula y potenciales ζ en las figuras 4 y 5 concuerdan con modelos de condensación de ADN observados con otros policaciones (Kabanov y otros, *Bioconjugate Chem.* 6; 7-20, 1995; Putnam y otros, *Macromolecules* 32: 3658-3662, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5633-5639, 1999; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122:6524-6525, 2000; Gonzalez y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074, 1999). El ADN se compacta para dar partículas pequeñas cargadas negativamente a concentraciones de polímero muy bajas y los tamaños de partícula aumentan con la concentración de polímero creciente. (No pudieron obtenerse datos exactos de dispersión de luz para especies asociadas a ADN solo o ADN/polímero a razones de ADN/polímero inferiores a 1:0,5, puesto que el ADN flexible, no condensado no dispersa la luz de manera tan extensa como el ADN compactado (Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998). Los complejos alcanzan un diámetro máximo a medida que se logra la neutralidad de carga y se produce la agregación. Los tamaños de partícula disminuyen bruscamente a concentraciones de ADN/polímero por encima de la neutralidad de carga hasta las razones a las que el polímero adicional no contribuye a una reducción en el diámetro de partícula. Este modelo se confirma mediante mediciones de los potenciales ζ realizadas en complejos formados a partir de estos polímeros. Tal como se muestra en la figura 5, los potenciales ζ de partículas de polímero/ADN formadas a partir del polímero 3 fueron negativos a concentraciones de polímero bajas y la neutralidad de carga se logró cerca de razones de ADN/polímero de 1:0,75, dando como resultado una agregación extensa. Los potenciales ζ de las partículas se aproximaban a un valor limitante que oscilaba desde +10 hasta +15 mV a razones de ADN/polímero por encima de 1:2.

Los diámetros promedio de los complejos descritos anteriormente entran dentro de los requisitos generales de tamaño para la endocitosis celular. Se han iniciado experimentos de transfección empleando la línea celular NIH 3T3 y el gen indicador de luciferasa (pCMV-Luc). Hasta ahora, los polímeros 1 y 2 no han mostrado ninguna actividad de transfección en los ensayos de examen iniciales. Por el contrario, el polímero 3 ha demostrado eficiencias de transfección que superan las de PEI en ciertas condiciones. Se realizaron experimentos de transfección según el siguiente protocolo general: Se hicieron crecer células en placas de 6 pocillos a una densidad de siembra inicial de 100.000 células/pocillo en 2 ml de medio de crecimiento. Se hicieron crecer las células durante 24 horas tras lo cual se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por 2 ml de medio libre de suero. Se formaron complejos de ADN/polímero tal como se describió en la sección experimental [2 μ g de ADN, ADN/3 = 1:2 (p/p), 100 μ l en MES (pH = 6,0)] y se añadieron a cada pocillo. Se formaron complejos de ADN/PEI a una razón en peso de 1:0,75, una razón que se halló generalmente en el laboratorio que era óptima para transfecciones de PEI. Se llevaron a cabo las transfecciones en medio libre de suero durante 4 horas, tras lo cual se sustituyó el medio por medio de crecimiento durante 20 horas adicionales. Se determinaron las eficiencias de transfección relativas usando kits de ensayo de proteína celular (Pierce) y de luciferasa (Promega). Los resultados se expresan como unidades relativas de luz

(URL) por mg de proteína celular total: para complejos del polímero 3, $1,07 (\pm 43) \times 10^6$ URL/mg; para complejos de PEI, $8,07 (\pm 16) \times 10^5$ URL/mg). No se detectó expresión de luciferasa para los experimentos control empleando ADN desnudo o realizados en ausencia de ADN. Estos datos de transfección son los resultados de experimentos de examen iniciales. Estos datos sugieren que los polímeros de esta estructura general tienen potencial como vectores sintéticos para la administración génica y son candidatos interesantes para un estudio adicional. La eficacia relativa del polímero 3 con respecto a PEI es interesante ya que los presentes experimentos de examen iniciales se realizaron en ausencia de cloroquina y el polímero 3 no incorpora actualmente un medio obvio para facilitar el escape endosómico. Sin embargo, debe observarse que los valores de pK_a de las aminas en estos polímeros pueden "afinarse" para entrar más directamente dentro del intervalo de pH fisiológicamente relevante usando este enfoque sintético modular. Por tanto, será posible modificar por ingeniería genética adicionalmente el carácter de "esponja de protones" (Behr *Chimia* 51:34-36,1997; Demeneix y otros, en *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery* (Felgner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151; Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998) de estos polímeros y, por tanto, potenciar sus eficiencias de transfección, directamente a través de la incorporación de o la copolimerización con diferentes monómeros de diamina.

Sumario

Se notifica una estrategia general para la preparación de nuevos vectores de transfección de ADN poliméricos degradables. Se sintetizaron los poli(β -amino-ésteres) 1-3 por medio de la adición conjugada de N,N'-dimetiletilendiamina, piperazina y 4,4'-trimetilendipiperidina a diacrilato de 1,4-butanodiol. Las aminas en los monómeros de bis(amina secundaria) participan activamente en los procesos de formación de enlaces durante la polimerización, obviando la necesidad de procesos de protección/desprotección de amina que caracterizan la síntesis de otros poli(amino-ésteres). Por consiguiente, este enfoque permite la generación de una variedad de poliésteres estructuralmente diversos que contienen aminas terciarias en sus estructuras principales en una sola etapa a partir de materiales de partida comercialmente disponibles. Los polímeros 1-3 se degradaban hidrolíticamente en medios ácidos y alcalinos proporcionando 1,4-butanodiol y los β -aminoácidos 4a-6a y se investigó la cinética de degradación a pH 5,1 y 7,4. Los polímeros se degradaban más rápidamente a pH 7,4 que a pH 5,1, concordando con los perfiles de pH/degradación notificados para otros poli(amino-ésteres). Un ensayo de examen inicial diseñado para determinar los efectos de los polímeros 1-3 sobre el metabolismo y crecimiento celulares sugirió que estos polímeros y sus productos de degradación hidrolítica no eran citotóxicos con respecto a PEI, un polímero catiónico no degradable empleado convencionalmente como vector de transfección.

Los polímeros 1-3 interactuaban electrostáticamente con ADN de plásmido a pH fisiológico, iniciando procesos de autoensamblaje que daban como resultado complejos de ADN/polímero a escala nanométrica. Se usaron electroforesis en gel de agarosa, dispersión de luz dinámica cuasi-elástica (QEIS) y mediciones de potenciales zeta para determinar el grado de las interacciones entre los polielectrolitos con cargas opuestas. Se encontró que los tres polímeros condensaban ADN dando partículas de ADN/polímero solubles del orden de 50-200 nm. Las partículas formadas a partir de los polímeros 1 y 2 se agregaron de manera extensa, mientras que las partículas formadas a partir del polímero 3 mostraron potenciales ζ positivos (por ejemplo, de +10 a +15 mV) y no se agregaron durante hasta 18 horas. Las dimensiones de tamaño nanométrico y las citotoxicidades reducidas de estos complejos de ADN/polímero sugieren que los polímeros 1-3 pueden ser útiles como vectores de transfección génica poliméricos degradables. Una perfecta comprensión de las relaciones estructura/actividad existentes para esta clase de polímero acelerará el diseño de alternativas a base de polímeros más seguras con respecto a vectores de transfección virales para terapia génica.

Ejemplo de referencia 2 – Liberación rápida, desencadenada por pH de microesferas de poli(β -amino-éster) biodegradables dentro del intervalo de pH intracelular

Sección experimental

Fabricación de microesferas. Se realizó el procedimiento optimizado para la fabricación de microesferas de la siguiente manera general: se suspendió una disolución acuosa de dextrano conjugado con rodamina (200 μ l de una disolución 10 μ g/ μ l, $M_n \approx 70$ kD) en una disolución de poli-1 en CH_2Cl_2 (200 mg de poli-1 en 4 ml de CH_2Cl_2 , $M_n \approx 10$ kD), y se sonicó la mezcla durante 10 segundos formando una emulsión primaria. Se añadió la emulsión rosa turbio directamente a una disolución rápidamente homogeneizada (5.000 rpm) de poli(alcohol vinílico) [50 ml, PVA al 1% (p/p)] formando la emulsión secundaria. Se homogeneizó la emulsión secundaria durante 30 segundos antes de añadirla a una segunda disolución acuosa de PVA [100 ml, PVA al 0,5% (p/p)]. El análisis directo de la suspensión de microesferas usando un analizador de micropartículas Coulter reveló un tamaño de partícula medio de aproximadamente 5 micrómetros. Se agitó la emulsión secundaria durante 2,5 horas a temperatura ambiente, se transfirió a una sala fría (4°C) y se agitó durante 30 minutos adicionales. Se aislaron las microesferas a 4°C por medio de centrifugación, se resuspendieron en agua fría y se centrifugaron de nuevo para eliminar el PVA en exceso. Se resuspendieron las esferas en agua (15 ml) y se liofilizaron proporcionando un polvo rosa esponjoso. Se realizó la caracterización de las microesferas liofilizadas mediante microscopías óptica, de fluorescencia y electrónica de barrido tal como se describe. Se determinó el potencial zeta usando un analizador ZetaPALS de Brookhaven Instruments.

Discusión

Las micropartículas formadas a partir de polímeros biodegradables son atractivas para su uso como dispositivos de administración, y se ha empleado una variedad de microesferas a base de polímero para la liberación sostenida de compuestos terapéuticos (Anderson Nature 392 (supl.): 25-30, 1996; Friedman Nature Med. 2; 144-147, 1996; Crystal Science 270:404-410, 1995; Mulligan Science 260:926-932, 1993; Luo y otros, Nat. Biotechnol. 18:33-37, 2000; Behr Acc. Chem. Res. 26:274-278, 1993). Sin embargo, para compuestos terapéuticos a base de moléculas pequeñas, proteínas y ADN que requieren administración intracelular y traslado hasta el citoplasma, existe una demanda creciente de nuevos materiales que faciliten la liberación desencadenada en respuesta a estímulos ambientales tales como pH (Zauner y otros, Adv. Drug Del. Rev. 30:97-113, 1998). Tras la endocitosis, se reduce el pH dentro de los compartimentos endosómicos celulares, y el material extraño se degrada tras la fusión con vesículas lisosómicas (Kabanov y otros, Bioconjugate Chem. 6:7-20, 1995). Nuevos materiales que liberan cargas útiles moleculares tras cambios en el pH dentro del intervalo intracelular y facilitan el escape de entornos intracelulares hostiles podrían tener un impacto fundamental y de amplio alcance sobre la administración de fármacos hidrolítica y/o enzimáticamente lábiles (Zauner y otros, Adv. Drug Del. Rev. 30: 97-113, 1998; Kabanov y otros, Bioconjugate Chem. 6:7-20, 1995). En el presente documento, se notifica la fabricación de microesferas de polímero sensibles al pH que liberan el contenido encapsulado cuantitativa y esencialmente de manera instantánea tras cambios en el pH dentro del intervalo intracelular.

La síntesis del poli(β -amino-éster) 1 se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1 (Miller Angew. Chem. Int. Ed. 37:1768-1785, 1998; Hope y otros, Molecular Membrane Technology 15:1-14, 1998; Deshmukh y otros, New J. Chem. 21: 113-124, 1997). Poli-1 es hidrolíticamente degradable, no fue citotóxico en ensayos de examen iniciales y actualmente está en investigación como vector sintético para la administración de ADN en aplicaciones de terapia génica. La solubilidad del polímero en medios acuosos se ve influida directamente por el pH de la disolución. Específicamente, el polímero sólido, no protonado, es insoluble en medios acuosos en el intervalo de pH de 7,0 a 7,4, y la transición entre solubilidad e insolubilidad se produce a un pH de alrededor de 6,5. Basándose en las diferencias entre pH extracelular y endosómico (7,4 y 5,0 - 6,5, respectivamente), se hace la hipótesis de que las microesferas formadas a partir de poli-1 podrían ser útiles para la encapsulación y la liberación desencadenada de compuestos dentro del intervalo de pH intracelular.

La encapsulación de compuestos terapéuticos dentro de microesferas de polímero se logra a menudo empleando un proceso de doble emulsión (O'Donnell y otros, Adv. Drug Delivery Rev. 28:25-42, 1997). El proceso de doble emulsión está bien establecido para la fabricación de microesferas a partir de polímeros hidrófobos tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), un polímero biodegradable empleado convencionalmente en el desarrollo de dispositivos de administración de fármacos (Anderson y otros, Adv. Drug Delivery Rev, 28:5-24, 1997; Okada Adv. Drug Delivery Rev. 28:43-70, 1997). Experimentos preliminares demostraron la viabilidad del proceso de doble emulsión para la encapsulación de compuestos solubles en agua usando poli-1. Se eligió dextrano conjugado con rodamina como modelo para estudios posteriores de encapsulación y liberación por diversos motivos: 1) la rodamina es fluorescente, permitiendo que se determinen perfiles de carga y de liberación mediante espectroscopía de fluorescencia, 2) podían obtenerse imágenes de las microesferas cargadas directamente mediante microscopía de fluorescencia y 3) la intensidad de fluorescencia de la rodamina no se ve relativamente afectada por el pH dentro del intervalo fisiológico (Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª ed., Molecular Probes, Inc., 1996, pág. 29).

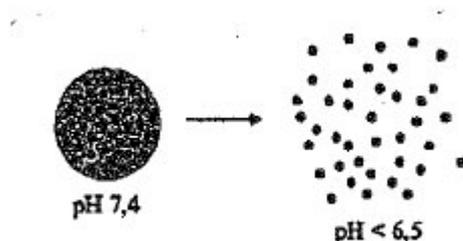
Se fabricaron microesferas que encapsulaban dextrano marcado a partir de poli-1, y se compararon con los controles formados a partir de PLGA. Las distribuciones de tamaño de las microesferas formadas a partir de poli-1 se correlacionaban bien con las distribuciones de las microesferas de PLGA dentro del intervalo de 5-30 μm . Los tamaños de partícula promedio podían controlarse mediante variaciones en parámetros experimentales tales como las velocidades de homogenización y las razones de disolvente acuoso/orgánico (O'Donnell y otros, Adv. Drug Delivery Rev. 28:25-42, 1997). Al contrario que las microesferas de PLGA, sin embargo, las esferas formadas a partir de poli-1 se agregaban de manera extensa durante las etapas de centrifugación y lavado (véase la sección experimental anterior). Las microesferas resuspendidas a pH 7,4 consistían principalmente en agregados grandes, y las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) revelaron agrupaciones de esferas que parecían estar unidas o "soldadas" físicamente (datos no mostrados).

Se encontró que la agregación podía limitarse si la centrifugación y el lavado se realizaban a temperaturas reducidas (4°C), presumiblemente debido al endurecimiento de las esferas de polímero a esta menor temperatura. Las imágenes de MEB de microesferas de poli-1 cargadas con dextrano preparadas en el intervalo de 8-10 μm revelaron fracturas significativas y la formación de grandes orificios en sus superficies. Las microesferas seleccionadas en el intervalo de 4-6 μm , sin embargo, estaban esencialmente libres de grietas, orificios y otros defectos (figura 6). Se fabricaron microesferas formuladas para experimentos de liberación posteriores en el intervalo menor (< 6 μm). Las eficiencias de encapsulación para microesferas de poli-1 cargadas, determinadas disolviendo las esferas a pH 5,1 y midiendo la intensidad de fluorescencia, fueron de tanto como el 53%.

Las suspensiones de microesferas de poli-1 secadas a pH = 7,4 consistían principalmente en microesferas individuales, aisladas, tal como se determina mediante microscopía óptica y de fluorescencia (figura 8a). El potencial zeta (ζ) de las suspensiones de micropartículas de microesferas de poli-1 a pH 7 fue de +3,75 ($\pm 0,62$) mV, lo que

sugiere que las superficies de las microesferas portan una carga positiva global a pH fisiológico. Esto podría ser relevante para la selección de estas microesferas para la captación celular, debido a que cargas positivas netas en las superficies de las partículas pueden desempeñar un papel en el desencadenamiento de la endocitosis (Zauner y otros, *Adv. Drug Delivery Rev.* 30:97-113, 1998).

- 5 Las microesferas de poli-1 suspendidas a pH 7,4 siguieron siendo estables frente a la agregación y la degradación durante varias semanas (mediante inspección visual), pero las microesferas se disolvieron instantáneamente cuando el pH del medio de suspensión se redujo a entre 5,1 y 6,5.



- 10 La liberación de dextrano marcado a partir de microesferas de poli-1 se determinó cuantitativamente mediante microscopía de fluorescencia (figura 7). El perfil de liberación a pH 7,4 se caracterizaba por una pequeña ráfaga inicial en fluorescencia (7-8%) que alcanzó un valor limitante de aproximadamente el 15% tras 48 horas. Este experimento demostró que la degradación de poli-1 era relativamente lenta en estas condiciones y que podía retenerse más del 90% de material encapsulado en la matriz de polímero durante periodos de tiempo adecuadamente largos a pH fisiológico.

- 15 Para examinar la aplicación de microesferas de poli-1 en la liberación desencadenada de fármacos encapsulados en el intervalo de pH endosómico, se realizó un experimento similar en el que el pH del medio de suspensión se cambió desde 7,4 hasta 5,1 durante el transcurso del experimento. Tal como se muestra en la figura 7, las microesferas se disolvieron rápidamente cuando el tampón de suspensión se intercambiò por tampón acetato (0,1 M, pH = 5,1), dando como resultado una liberación esencialmente instantánea y cuantitativa del dextrano marcado que permanecía en las matrices de polímero. Muy al contrario, la liberación a partir de microesferas de PLGA cargadas con dextrano no aumentó durante hasta 24 horas después de que se redujera el pH del medio de suspensión (figura 7). La figura 8 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de: (a) una muestra de microesferas cargadas con dextrano a pH 7,4; y (b) una muestra a la que se añadió una gota de tampón acetato en el borde superior derecho del cubreobjetos del microscopio. La rápida liberación de dextrano conjugado con rodamina se visualizó como rayas que se extendían desde las microesferas que se disolvían en la dirección de la difusión del ácido añadido y un aumento global en la fluorescencia del fondo (tiempo transcurrido \approx 5 segundos).

- 30 Cuando se seleccionan compuestos terapéuticos para administración intracelular por medio de endocitosis o fagocitosis, no sólo es importante considerar un medio mediante el que el fármaco pueda liberarse de su vehículo, sino también un medio mediante el que el fármaco pueda escapar de los compartimentos endosómicos antes de enviarse a vesículas lisosómicas (Luo y otros, *Nat. Biotechnol.* 18: 33-37,2000; Zauner y otros, *Adv. Drug Delivery Rev.* 30:97-113, 1998). Una estrategia para facilitar el escape endosómico es la incorporación de bases débiles, o "esponjas de protones," que se cree que tamponan el entorno ácido dentro de un endosoma y perturban las membranas endosómicas aumentando la presión osmótica interna dentro de la vesícula (Demeneix y otros, en *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery* (Felgner y otros, Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1996, págs. 146-151). Las microesferas de poli-1 pueden liberar material encapsulado en el intervalo de pH endosómico por medio de un mecanismo (disolución) que implica la protonación de aminas en la matriz de polímero. Por tanto, además de la rápida liberación del fármaco, las microesferas de poli-1 pueden proporcionar también un medio de perturbación de la membrana de escape endosómico, potenciando la eficacia prolongando las vidas útiles de fármacos hidrolíticamente inestables contenidos en la matriz de polímero.

- 40 Las microesferas fabricadas a partir de poli-1 podrían representar una importante adición al arsenal de materiales sensibles al pH aplicados para la administración de fármacos intracelular, tales como formulaciones de polímero/liposoma sensibles al pH (Gerasimov y otros, *Adv. Drug Delivery Rev.* 38:317-338, 1999; Linhart y otros, *Langmuir* 16:122-127, 2000; Linhardt y otros, *Macromolecules* 32:4457-4459, 1999). Al contrario que muchas formulaciones liposómicas, las microesferas de polímero son físicamente robustas y pueden secarse en almacenamiento durante periodos prolongados sin deformación, descomposición ni degradación (Okada *Adv. Drug Delivery Rev.* 28:43-70, 1997), una importante consideración para la formulación y el envasado de nuevos sistemas de administración terapéutica. Las microesferas investigadas en este estudio actual entran dentro de intervalo de tamaños de las partículas comúnmente usadas para dirigir la administración a macrófagos (Hanes y otros, *Adv. Drug Delivery Rev.* 28:97-119, 1997). Los perfiles de pH-liberación rápidos para las microesferas de poli-1 descritos anteriormente pueden por tanto ser útiles en el diseño de nuevas vacunas a base de ADN que actualmente emplean PLGA como material de encapsulación (Singh y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:811-816, 2000; Ando y otros, *J. Pharm. Sci.* 88:126-130, 1999; Hedley y otros, *Nat. Med.* 4:365-368, 1998).

Ejemplo 3 – Descubrimiento acelerado de vectores de transfección sintéticos: Síntesis en paralelo y examen de una biblioteca de polímeros degradables

Introducción

5 La administración segura y eficaz de ADN terapéutico a células representa un obstáculo fundamental para el éxito clínico de la terapia génica (Luo y otros, *Nat. Biotechnol.* 18:33-37, 2000; Anderson *Nature* 392 supl.:25-30, 1996). Los desafíos a los que se enfrentan los vectores de administración sintéticos están particularmente claros, ya que tanto los polímeros catiónicos como los liposomas son menos eficaces en la mediación de la transferencia génica que los vectores virales. La incorporación de nuevos criterios de diseño ha conducido a avances recientes hacia sistemas de administración funcionales (Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 123: 2460-2461, 2001; Lim y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 122:6524-6525, 2000; Hwang y otros, *Bioconjugate Chem.* 12:280-290,2001; Putnam y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1200-1205,2001; Bennis y otros, *Bioconjugate Chem.* 11:637-645, 2000; Midoux y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:406-411, 1999). Sin embargo, el paradigma para el desarrollo de vectores de administración génica poliméricos sigue siendo la incorporación de estos elementos de diseño en materiales como parte de un proceso lineal iterativo, un enfoque eficaz, aunque lento, para el descubrimiento de nuevos vectores. En el presente documento, se notifica un enfoque en paralelo adecuado para la síntesis de grandes bibliotecas de oligómeros y polímeros catiónicos degradables y el descubrimiento de nuevas familias de vectores sintéticos a través de ensayos de selección basados en células rápidos (para un informe sobre la síntesis en paralelo y la selección de polímeros degradables para la ingeniería de tejidos, véase: Brocchini y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 119:4553-4554, 1997).

Sección experimental

20 **Consideraciones generales.** Todas las manipulaciones que implicaban células vivas o materiales estériles se realizaron en una cabina de flujo laminar usando técnica estéril convencional. Se realizó la cromatografía de permeación en gel (CPG) usando una bomba isocrática serie 1100 de Hewlett Packard, un inyector modelo 7125 de Rheodyne con un bucle de inyección de 100 μ l y dos columnas PL-Gel mixed-D en serie (5 μ m, 300 x 7,5 mm, Polymer Laboratories, Amherst, MA). Se usó THF/piperidina 0,1 M como eluyente a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Se recogieron los datos usando un refractómetro interferométrico Optilab DSP (Wyatt Technology, Santa Bárbara, CA) y se procesaron usando el paquete informático TriSEC GPC (Viscotek Corporation, Houston, TX). Los pesos moleculares y las polidispersidades de los polímeros se notifican con respecto a patrones de poliestireno monodispersados.

30 **Materiales.** Se adquirieron los monómeros 1-20 de amina primaria y amina secundaria de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Lancaster (Lancashire, UK), Alfa Aesar Organics (Ward Hill, MA) y Fluka (Milwaukee, WI). Se adquirieron los monómeros A-G de Polysciences, Inc. (Warrington, PA), Alfa Aesar y Scientific Polymer Products, Inc. (Ontario, NY). Se adquirieron todos los monómeros con la mayor pureza disponible (desde el 97% hasta 99+%) y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Se adquirió ADN de plásmido que contenía el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (pCMV-Luc) de Elim Biopharmaceuticals, Inc. (San Francisco, CA) y se usó sin purificación adicional. Se adquirió bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Se adquirieron los fibroblastos de riñón de mono (células COS-7) usados en los ensayos de transfección de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) y se hicieron crecer a 37°C, CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco, 90%; suero bovino fetal, 10%; penicilina, 100 unidades/ml; estreptomycin, 100 μ g/ml. Se adquirieron los kits de detección de luciferasa detección usados en los ensayos de transfección de alto rendimiento de Tropix (Bedford, MA). Todos los demás materiales y disolventes se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional.

45 **Síntesis de la biblioteca de polímeros.** Las 140 reacciones de polimerización se realizaron simultáneamente como una serie de viales etiquetados individualmente según el siguiente protocolo general. Se indican excepciones individuales cuando sea apropiado. Se cargaron los monómeros 1-20 de amina (2,52 mmoles) en viales etiquetados apropiadamente (tal como se muestra a continuación): se midieron los monómeros líquidos y se transfirieron cuantitativamente usando pipetas de microlitros; se pesaron los monómeros sólidos directamente en cada vial. Se añadió CH₂Cl₂ anhidro (1 ml) a cada vial. Se añadió un equivalente de diacrilatos A-F líquidos (2,52 mmoles) a cada vial de reacción apropiado usando una pipeta de microlitros, y se tapó el vial de manera apretada con un tapón revestido de teflón. Se añadió un equivalente de diacrilato G semisólido a los viales apropiados como una disolución en CH₂Cl₂ (2,52 mmoles, 1 ml de una disolución 2,52 M en CH₂Cl₂) y se taparon los viales de manera apretada. Se añadió una alícuota adicional de CH₂Cl₂ (2 ml) a los viales de reacción que contenían 19 y 20 para ayudar a la solubilidad de estos monómeros. Se dispusieron los viales tapados de manera apretada en dos rejillas de tubos de ensayo de plástico y se fijaron a un agitador orbital en un horno a 45°C. (PRECAUCIÓN: el calentamiento de los viales tapados representa un posible peligro de explosión. Se monitorizó la temperatura del horno periódicamente durante una semana antes del experimento para garantizar una estabilidad térmica fiable. Se encontró que las temperaturas variaban dentro de +/- 1°C durante este periodo de tiempo. Se monitorizaron varios viales de prueba antes de realizar el experimento mayor). Se agitaron los viales de reacción energicamente a 45°C durante 5 días y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Se colocaron los viales en un desecador grande y se colocaron a vacío de aspirador durante 1 día y a alto vacío durante 5 días adicionales para garantizar la eliminación completa del disolvente. Se analizaron las muestras obtenidas mediante CPG (55% de la biblioteca total, véase la tabla 2) y se usaron directamente en todos los experimentos de examen posteriores. Las series de muestras 19 y 20 no son de

ES 2 672 153 T3

acuerdo con la invención.

Tabla 2: Inspección por CPG del 55% de la biblioteca de examen que muestra pesos moleculares (M_w) y polidispersidades (mostradas entre paréntesis).

	A	B	C	D	E	F	G
1	5900 (1,93)	4725 (1,89)			5220 (1,95)	1690 (1,74)	
2	6920 (1,87)	6050 (1,78)			5640 (1,85)		
3	6690 (1,79)	6050 (1,78)				2060 (1,76)	
4	7810 (2,49)	5720 (2,20)	9720 (2,49)	7960 (4,08)	7940 (3,25)		
5	10800 (2,75)	5000 (2,50)	15300 (3,17)	17200 (6,91)	15300 (3,92)	Insol.	9170 (2,50)
6	21000 (3,70)	10200 (3,4)		18000 (6,06)			
7	14300 (3,25)	11880 (3,3)	20200 (3,44)	10300 (4,26)	15500 (4,89)		22500 (3,92)
8	2310 (1,62)	11520 (3,60)		2230 (1,73)			
9	1010 (1,33)	2505 (1,67)	1240 (1,16)			Insol.	
10		<1000	Insol.				
11	6800 (1,91)	Insol.	9440 (1,79)	5550 (2,23)	6830 (1,93)	1990 (1,43)	6420 (1,75)
12	9310 (2,06)	9100 (2,53)	11900 (2,18)	5810 (1,77)			12300 (1,85)
13	2990 (1,64)	3180 (2,12)	3680 (1,64)	2550 (1,82)	3230 (1,82)		3580 (1,64)
14	1350 (1,35)	3180 (2,12)	2110 (1,69)	1400 (1,4)	1752 (1,46)		2025 (1,62)

15		1550 (1,51)				
16		16380 (2,60)				
17		8520 (2,13)		7290 (1,94)		
18		<1000				
19	12400 (2,28)	18445 (2,17)	39700 (1,90)	17400 (1,93)	14800 (1,98)	13900 (1,86)
20	16900 (2,40)	46060 (3,29)	49600 (2,25)	30700 (2,72)	18700 (2,72)	17100 (2,22)

Determinación de la solubilidad en agua. Se determinaron las solubilidades de todas las muestras simultáneamente a una concentración de 2 mg/ml de la siguiente manera general. Se pesó cada muestra de polímero (5 mg) en un vial de centelleo de 12 ml y se añadieron 2,5 ml de tampón acetato (25 mM, pH = 5,0) a cada muestra usando una pipeta. Se agitaron las muestras enérgicamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Se observó cada muestra visualmente para determinar la solubilidad.

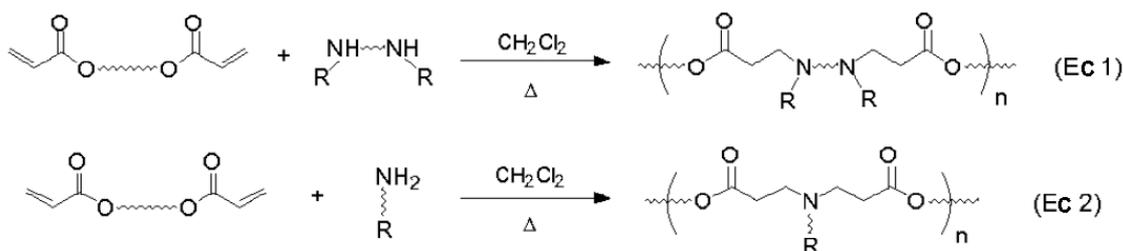
Ensayo de electroforesis en gel de agarosa. Se realizó el ensayo de electroforesis en gel de agarosa usado para determinar la capacidad de los polímeros para formar complejos con el ADN de la siguiente manera. Usando las disoluciones preparadas en el ensayo de solubilidad anterior (2 mg/ml en tampón acetato, 25 mM, pH = 5,0), se dispusieron disoluciones madre de los 70 polímeros solubles en agua en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Se formaron complejos de ADN/polímero a una razón de 1:5 (p/p) transfiriendo 10 µl de cada disolución de polímero desde la placa de disolución madre hasta una nueva placa usando una pipeta multicanal. Se diluyó adicionalmente cada polímero con 90 µl de tampón acetato (25 mM, pH = 5,0, volumen total = 100 µl) y se agitó la placa durante 30 segundos en un agitador mecánico. Se añadió una disolución acuosa de ADN de plásmido (100 µl de una disolución 0,04 µg/µl) a cada pocillo en la placa y se mezclaron enérgicamente las disoluciones usando una pipeta multicanal y un agitador mecánico. Se formaron complejos de ADN/polímero a una razón de 1:20 (p/p) de la misma manera con las siguientes excepciones: se transfirieron 40 µl de disolución madre de polímero a una nueva placa y se diluyeron con 60 µl de tampón acetato (volumen total = 100 µl) antes de añadir la disolución acuosa de ADN (100 µl). Se incubaron complejos de ADN/polímero a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras lo cual se cargaron muestras de cada disolución (15 µl) en un gel de agarosa al 1% (HEPES, 20 mM, pH = 7,2, bromuro de etidio 500 ng/ml) usando una pipeta multicanal. NOTA: Se cargaron las muestras en el gel con un tampón de carga que consistía en Ficoll 400 al 10% (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en HEPES (25 mM, pH = 7,2). No se incluyó azul de bromofenol como indicador visual en el tampón de carga, puesto que este colorante cargado parecía interferir con la complejación del polímero y el ADN. Se cargaron las muestras según el patrón mostrado en la figura 9, de modo que las muestras correspondientes a razones de ADN/polímero de 1:5 y 1:20 se sometieron a ensayo en posiciones adyacentes en el gel. Se procesó el gel a 90 V durante 30 minutos y se visualizaron bandas de ADN mediante tinción con bromuro de etidio.

Protocolo general para ensayos de transfección celular. Se realizaron ensayos de transfección por triplicado de la siguiente manera general. Se hicieron crecer células COS-7 en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra inicial de 15.000 células/pocillo en 200 µl de medio de crecimiento libre de rojo de fenol (medio de Eagle modificado por Dulbecco al 90%, suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 µg/ml). Se hicieron crecer las células durante 24 horas en un incubador, tras lo cual se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por 200 µl de medio Optimem (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) complementado con HEPES (concentración total = 25 mM). Se prepararon complejos de polímero/ADN preparados a partir de los 56 polímeros de complejación de ADN/solubles en agua identificados previamente tal como se describió anteriormente a una razón de 1:20 (p/p) usando un plásmido comercialmente disponible que contenía el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (pCMV-Luc). Se añadió un volumen apropiado de cada muestra a las células usando una pipeta multicanal (por ejemplo, 15 µl proporcionaban 300 ng de ADN/pocillo; 30 µl proporcionaban 600 ng de ADN/pocillo). Se realizaron controles empleando poli(etilenoimina) (PEI) y polilisina, preparadas a razones de ADN/polímero de 1:1, de manera similar y se

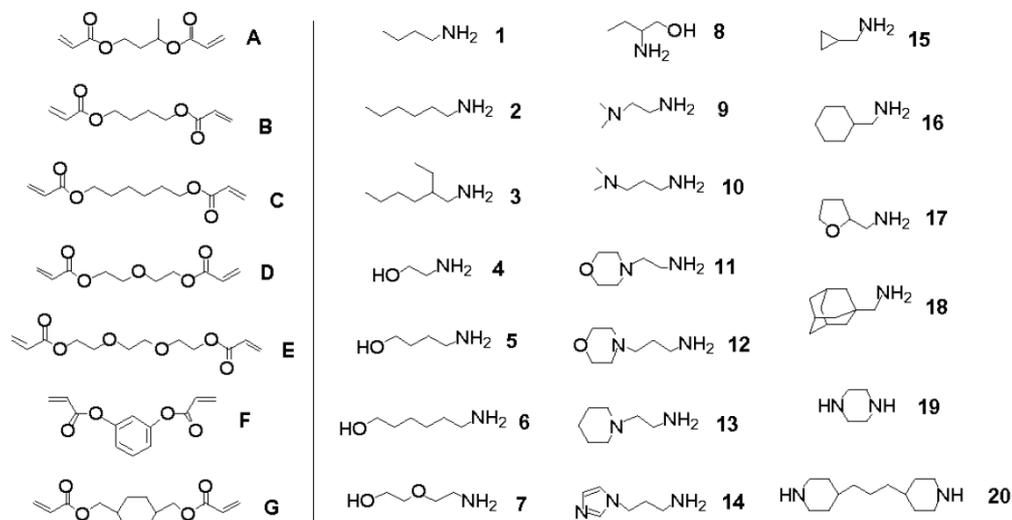
incluyeron con controles de ADN y no de ADN. Se realizaron controles empleando Lipofectamine 2000 (invitrogen Corp.) a varias concentraciones (0,1, 0,2, 0,4 y 0,6 μ l) tal como se describe en el manual técnico para este producto (<http://lifetechnologies.com>). Se incubaron las células durante 4 horas, tras lo cual se retiró el medio de crecimiento libre de suero y se sustituyó por 100 μ l de medio de crecimiento libre de rojo de fenol. Se incubaron las células durante un periodo de tiempo adicional (normalmente variaba entre 36 y 60 horas) y se determinó la expresión de luciferasa usando un kit de ensayo comercialmente disponible (Tropix, Inc., Bedford, MA). Se cuantificó la luminiscencia en placas de polipropileno blancas, de fondo sólido, de 96 pocillos, usando un lector de placas de bioluminiscencia de 96 pocillos. Se expresó la luminiscencia en unidades relativas de luz y no se normalizó con respecto a la proteína celular total en este ensayo.

Resultados y discusión

Los poli(β -amino-ésteres) son hidrolíticamente degradables, condensan ADN de plásmido a pH fisiológico y se sintetizan fácilmente por medio de la adición conjugada de aminas primarias o secundarias a diacrilatos (ec. 1 y 2) (Lynn y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:10761-10768, 2000). Un examen inicial de polímeros modelo identificó estos materiales como vehículos génicos potenciales y demostró que las variaciones estructurales podían tener un impacto significativo sobre la eficiencias de transfección y de unión a ADN (Lynn y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:10761-10768, 2000). Se razona que este enfoque proporcionaba un marco atractivo para la elaboración de grandes bibliotecas de polímeros estructuralmente únicos por diversos motivos: 1) los monómeros de diamina y diacrilato son materiales de partida económicos, comercialmente disponibles, 2) la polimerización puede lograrse directamente en una única etapa sintética y 3) las etapas de purificación son generalmente innecesarias ya que no se generan subproductos durante la polimerización.



La escasez de bis(aminas secundarias) comercialmente disponibles limita el grado de diversidad estructural que puede lograrse usando el enfoque sintético anterior. Sin embargo, el conjunto de monómeros útiles, comercialmente disponibles, se expande significativamente cuando las aminas primarias se consideran potenciales elementos de construcción de bibliotecas. Debido a que la adición conjugada de aminas a grupos acrilato tolera generalmente funcionalidades tales como alcoholes, éteres y aminas terciarias (Ferruti y otros, Adv. Polym. Sci. 58:55-92, 1984), se cree que la incorporación de monómeros de amina primaria funcionalizados en la presente estrategia sintética serviría para ampliar la diversidad estructural. Se seleccionaron los monómeros A-G de acrilato y los monómeros 1-20 de amina para la síntesis de una biblioteca de examen inicial.



Se eligió el tamaño de la biblioteca construida a partir de este conjunto de monómeros (7 diacrilatos x 20 aminas = 140 polímeros estructuralmente únicos) para que fuera suficientemente grande como para incorporar suficiente

diversidad, pero suficientemente pequeño como para ser práctico sin necesidad de automatización en los estudios iniciales. Al principio no estaba claro si un polímero tal como G16 (formado a partir de los monómeros G y 16 hidrófobos y estéricamente voluminosos) sería soluble en agua a pH fisiológico o si podría condensar ADN de manera suficiente. Sin embargo, se incorporaron deliberadamente monómeros de este tipo para explorar completamente el espacio de la diversidad, y previendo que esta biblioteca puede ser útil en última instancia como población de examen para el descubrimiento de materiales para aplicaciones distintas de la administración génica. (Para un informe sobre la síntesis en paralelo y la selección de polímeros degradables para ingeniería de tejidos, véase: Brocchini y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 119:4553-4554, 1997; Lynn y otros, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:1707-1710, 2001).

Se realizaron reacciones de polimerización simultáneamente como una serie de viales etiquetados individualmente. Las reacciones se realizaron en cloruro de metileno a 45°C durante 5 días, y se aislaron los polímeros mediante eliminación del disolvente proporcionando 600-800 mg de cada material. Las reacciones realizadas en esta escala proporcionaron cantidades de cada material suficientes para el análisis de rutina mediante CPG y todos los ensayos posteriores de unión a ADN, de toxicidad y de transfección. Una inspección del 55% de la biblioteca mediante CPG indicó pesos moleculares que oscilaban desde 2000 hasta 50000 (con respecto a los patrones de poliestireno). Ya que para la transfección y complejación de ADN no se requieren altos pesos moleculares (tal como se muestra a continuación) (Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998), esta biblioteca proporcionó una colección de polímeros y oligómeros adecuados para ensayos de examen posteriores.

De los 140 miembros de la biblioteca de examen, 70 muestras eran suficientemente solubles en agua (2 mg/ml, tampón acetato 25 mM, pH = 5,0) como para incluirse en un ensayo de unión a ADN electroforético (figura 9). Para realizar este ensayo tan rápida y eficazmente como fuera posible, se mezclaron las muestras con ADN de plásmido a razones de 1:5 y 1:20 (ADN/polímero, p/p) en placas de 96 pocillos y se cargaron en una placa de gel de agarosa que podía someter a ensayo hasta 500 muestras usando una pipeta multicanal. Se sometieron a ensayo las 70 muestras de polímero soluble en agua simultáneamente a dos razones de ADN/polímero diferentes en menos de 30 minutos. Tal como se muestra en la figura 9, 56 de las 70 muestras de polímero soluble en agua interaccionaron suficientemente con el ADN como para retardar la migración a través de la matriz de gel (por ejemplo, A4 o A5), empleando la razón de ADN/polímero de 1:20 como criterio de exclusión. Se descartaron catorce polímeros de una consideración adicional (por ejemplo, A7 y A8), ya que estos polímeros no complejaban ADN suficientemente.

Los materiales de complejación de ADN identificados en el ensayo anterior se investigaron adicionalmente en ensayos de transfección empleando ADN de plásmido y la línea celular COS-7. Se realizaron todos los ensayos simultáneamente con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (pCMV-Luc) y se determinaron los niveles de proteína expresada usando un kit de ensayo comercialmente disponible y un lector de placas de luminiscencia de 96 pocillos. La figura 10 muestra los datos generados a partir de un ensayo empleando pCMV-Luc (600 ng/pocillo) a razones de ADN/poli de 1:20 (p/p). La mayoría de los polímeros examinados no mediaba la transfección por encima de un nivel típico de los controles de ADN "desnudo" (sin polímero) en estas condiciones. Sin embargo, varios pocillos expresaron niveles mayores de proteína y los polímeros correspondientes se identificaron como "resultados positivos" en este ensayo. Los polímeros B14 ($M_w = 3180$) y G5 ($M_w = 9170$), por ejemplo, proporcionaron niveles de transfección 4-8 veces superiores que los experimentos control empleando poli(etilenoimina) (PEI), un polímero empleado convencionalmente como vector de transfección sintético (Boussif y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301, 1995), y niveles de transfección dentro de o superando el intervalo de proteína expresada usando Lipofectamine 2000 (disponible de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)), un destacado sistema de vector de transfección a base de lípidos comercialmente disponible. Los polímeros A14, C5, G7, G10 y G12 se identificaron también como "resultados positivos" en el experimento anterior, pero los niveles de expresión génica fueron inferiores que con B14 y G5.

Las diferencias estructurales entre los polímeros sintéticos descartan normalmente un conjunto general de condiciones de transfección óptimas. Por ejemplo, los polímeros C5, C14 y G14 eran tóxicos a las concentraciones más altas empleadas anteriormente (determinado por la ausencia de células en los pocillos que contenían estos polímeros tal como se observó con inspección visual. Estos polímeros eran menos tóxicos y mediaban la transfección a menor concentración), pero mediaban la transfección a menores concentraciones de ADN y polímero (datos no mostrados). El sistema de ensayo descrito anteriormente puede modificarse fácilmente para evaluar los polímeros como función de la concentración de ADN, la razón de ADN/polímero, las densidades de siembra de células o los tiempos de incubación. Se requerirá investigación adicional para evaluar más completamente el potencial de esta biblioteca de examen, y experimentos para este fin se encuentran actualmente en marcha.

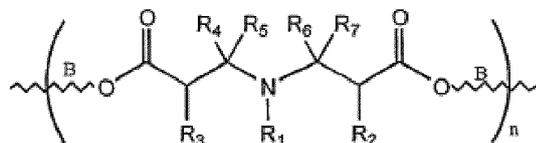
Los ensayos anteriores se realizaron en ausencia de cloroquina, una base débil añadida comúnmente para potenciar la transfección in vitro (Putnam y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1200-1205, 2001; Bennis y otros, *Bioconjugate Chem.* 11:637-645, 2000; Midoux y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:406-411, 1999; Kabanov y otros, en *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998), y los resultados reflejan por tanto las capacidades intrínsecas de esos materiales para mediar la transfección. Los polímeros que contienen monómero 14 son estructuralmente similares a otros polímeros "esponja de protones" que contienen histidina (Putnam y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1200-1205, 2001; Bennis y otros, *Bioconjugate Chem.* 11:637-645, 2000; Midoux y otros, *Bioconjugate Chem.* 10:406-411, 1999), y podrían potenciar

la transfección tamponando compartimentos intracelulares ácidos y mediando el escape endosómico (Putnam y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1200-1205, 2001; Bennis y otros, Bioconjugate Chem. 11:637-645, 2000; Midoux y otros, Bioconjugate Chem. 10:406-411, 1999; Boussif y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7297-7301, 1995). La eficacia de los polímeros que contienen monómero 5 es sorprendente en este contexto, ya que estos materiales no incorporan un medio obvio para facilitar el escape endosómico. Aunque todavía no se entiende la eficacia de estos últimos polímeros, su descubrimiento ayuda a validar el presente enfoque en paralelo y destaca el valor de incorporar diversidad estructural, ya que estos polímeros no pueden haberse descubierto según iban surgiendo. Los polímeros que incorporan los diacrilatos D y E hidrófilos no han producido "resultados positivos" en ninguna condición hasta ahora, proporcionando una posible base para el desarrollo de bibliotecas más centradas útiles para la dilucidación de las relaciones estructura/actividad.

Se ha generado una biblioteca de 140 oligómeros y polímeros degradables útiles para el descubrimiento de nuevos materiales de complejación de ADN y vectores de administración génica. Varios de estos materiales pueden condensar ADN para dar estructuras suficientemente pequeñas como para internalizarse por células y liberar el ADN en una forma transcripcionalmente activa. El tiempo total requerido actualmente para ensayos de diseño, síntesis y examen inicial de bibliotecas es aproximadamente de dos semanas. Sin embargo, la incorporación de robótica y monómeros adicionales podría acelerar significativamente el ritmo al que se identifican nuevos materiales de complejación de ADN y vectores de transfección competentes.

REIVINDICACIONES

1. – Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido y un compuesto de fórmula:



o una sal del mismo, en la que:

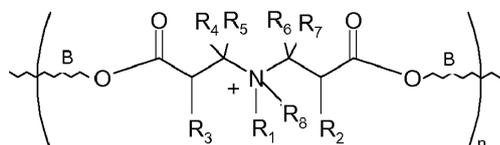
5 el conector B se selecciona del grupo que consiste en cadenas de carbono de 1 a 30 átomos de carbono, cadenas de carbono que contienen heteroátomos de 1 a 30 átomos y cadenas de carbono y cadenas de carbono que contienen heteroátomos con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tiol;

15 R₁ se selecciona del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, arilo, carbamoilo, éster carboxílico, amida, un grupo alcanilo sustituido, cíclico, cíclico aromático, heterocíclico y heterocíclico aromático, en donde cada uno de los cuales puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tihidroxilo;

20 R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ y R₇ son cada uno hidrógeno; y

n es un número entero entre 5 y 10.000; opcionalmente en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la sal es un compuesto de fórmula:



25 en la que

30 R₈ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, arilo, carbamoilo, éster carboxílico, amida, un grupo alcanilo sustituido, cíclico, aromático cíclico, heterocíclico y heterocíclico aromático, en donde cada uno de los cuales puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupos alquilo ramificado y no ramificado, alquenilo ramificado y no ramificado, alquinilo ramificado y no ramificado, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, arilo, ureido, heterocíclico, heterocíclico aromático, cíclico, cíclico aromático, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, carbonilo, carbonildioxilo, alquiltioéter y tiol;

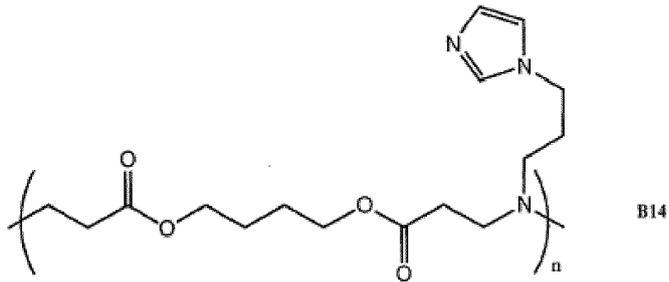
35 el contraanión se selecciona del grupo que consiste en cloro, flúor, bromo, yodo, sulfato, nitrato, fumarato, acetato, carbonato, estearato, laurato y oleato; y

n es un número entero entre 5 y 10.000.

3. – La composición farmacéutica según la reivindicación 2 en la que R₈ es hidrógeno.

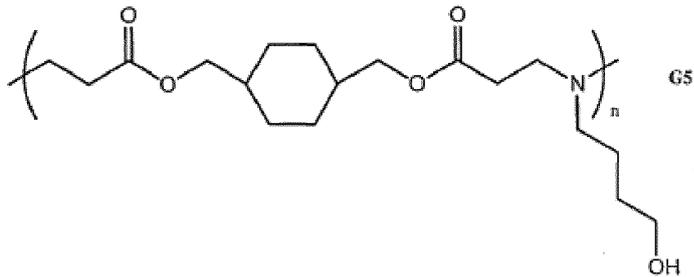
4. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que el conector B es polietileno o polietilenglicol.

40 5. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



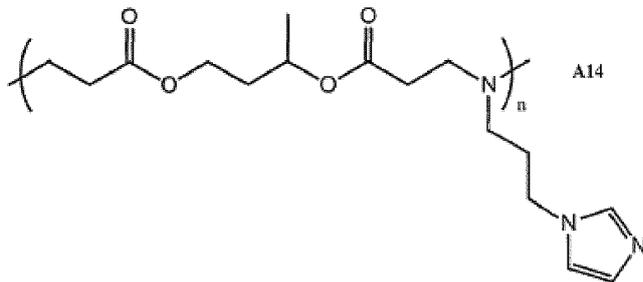
en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

6. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



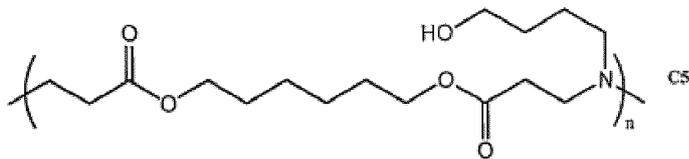
5 en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

7. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

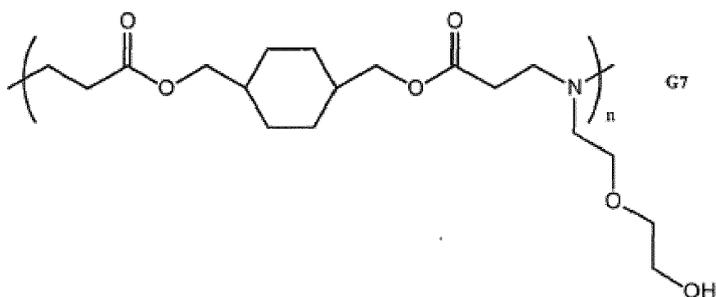
8. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



10

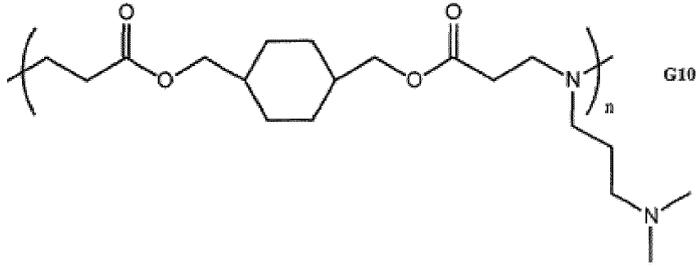
en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

9. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



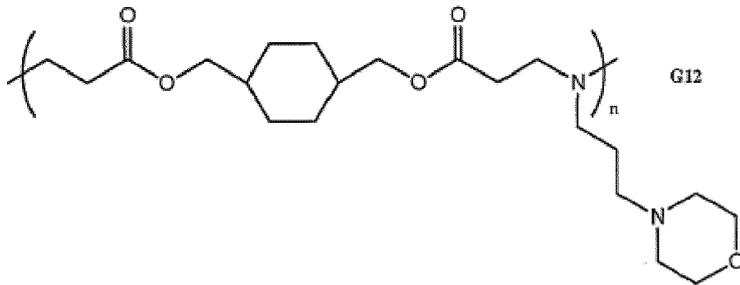
en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

10. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

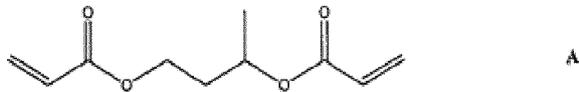
11. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es de fórmula:



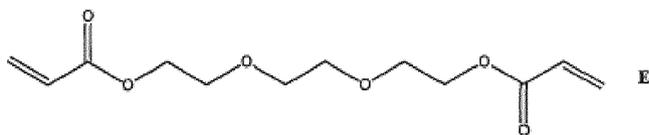
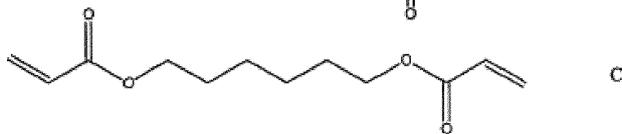
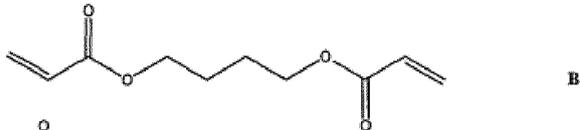
5

en la que n es un número entero entre 5 y 10.000; y derivados y sales del mismo.

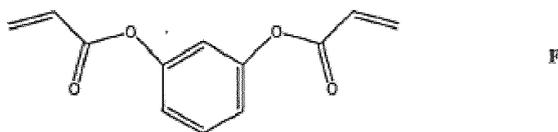
12. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que el compuesto se prepara a partir de una amina primaria de fórmula NH_2R_1 y un bis(éster de acrilato) de cualquiera de las Fórmulas A a G:

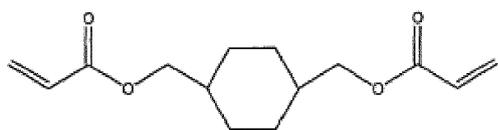


10



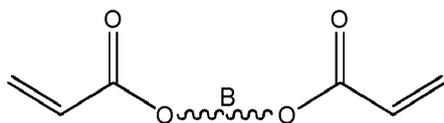
15





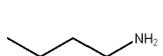
G

13. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que el compuesto se prepara a partir de un bis(éster de acrilato) de fórmula



5

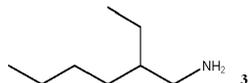
y una amina de cualquiera de las Fórmulas 1 a 18:



1



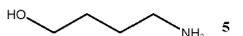
2



3



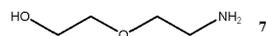
4



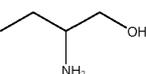
5



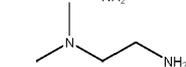
6



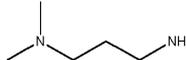
7



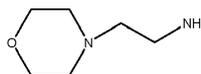
8



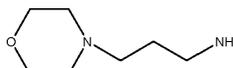
9



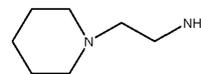
10



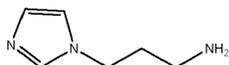
11



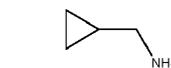
12



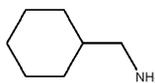
13



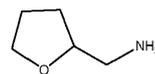
14



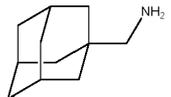
15



16



17



18

10

14. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el compuesto tiene un peso molecular de 5000 a más de 100.000 g/mol.

15. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el compuesto tiene un peso molecular entre 4000 y 50.000 g/mol.

16. – La composición farmacéutica según cualquiera las reivindicaciones 1 a 15 que comprende nanopartículas que contienen el polinucleótido y el compuesto.

17. – La composición farmacéutica según la reivindicación 16 en la que el compuesto es soluble en una solución acuosa a pH 7,4 e inferior.

18. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende micropartículas que contienen el polinucleótido encapsulado en una matriz del compuesto.

19. – La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que el compuesto es insoluble en una solución acuosa de pH 7,2-7,4.

20. – La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que el compuesto es insoluble en una solución acuosa de pH 7,2-7,4 pero es soluble en una solución acuosa a un pH inferior a 7,2.

21. – La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que las micropartículas tienen un diámetro medio de entre 1 y 10 micrómetros.

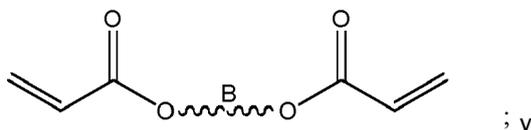
22. – La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que las micropartículas tienen un diámetro medio inferior a 5 micrómetros.

23. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el polinucleótido es ADN.

24. – La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto se prepara:

proporcionando una amina primaria de fórmula NH_2R_1 ;

5 proporcionando un bis(éster de acrilato) de fórmula



haciendo reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato).

25. – La composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que la etapa de reacción conlleva hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) en un disolvente orgánico.

10 26.- La composición farmacéutica según la reivindicación 25, en la que el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en THF, dietil éter, glima, hexanos, metanol, etanol, isopropanol, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dimetilformamida, acetonitrilo, benceno y tolueno.

27.- La composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura de entre 0 y 75°C.

15 28.- La composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura de entre 20 y 50°C.

29.- La composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que la etapa de reacción comprende hacer reaccionar la amina primaria y el bis(éster de acrilato) a una temperatura de entre 30 y 60°C.

30.- La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que las micropartículas se preparan:

20 proporcionando el polinucleótido;

proporcionando el compuesto; y

poniendo en contacto el polinucleótido y el compuesto con el fin de encapsular el polinucleótido en una matriz del compuesto.

31.- La composición farmacéutica según la reivindicación 30, en la que el polinucleótido es ADN.

25 32.- La composición farmacéutica según la reivindicación 30, en la que la etapa de puesta en contacto comprende secar por pulverización una mezcla del polinucleótido y el compuesto.

33.- La composición farmacéutica según la reivindicación 30, en la que la etapa de puesta en contacto comprende técnicas doble emulsión - evaporación del disolvente.

30 34.- La composición farmacéutica según la reivindicación 30, en la que la etapa de puesta en contacto comprende una técnica de inversión de fases.

35. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el polinucleótido y el compuesto se asocian mediante una interacción electrostática.

36. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el polinucleótido es ARN.

35 37. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el polinucleótido codifica una proteína o péptido.

38. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el polinucleótido es un agente antisentido o ARNi.

40 39. – La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-38 que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

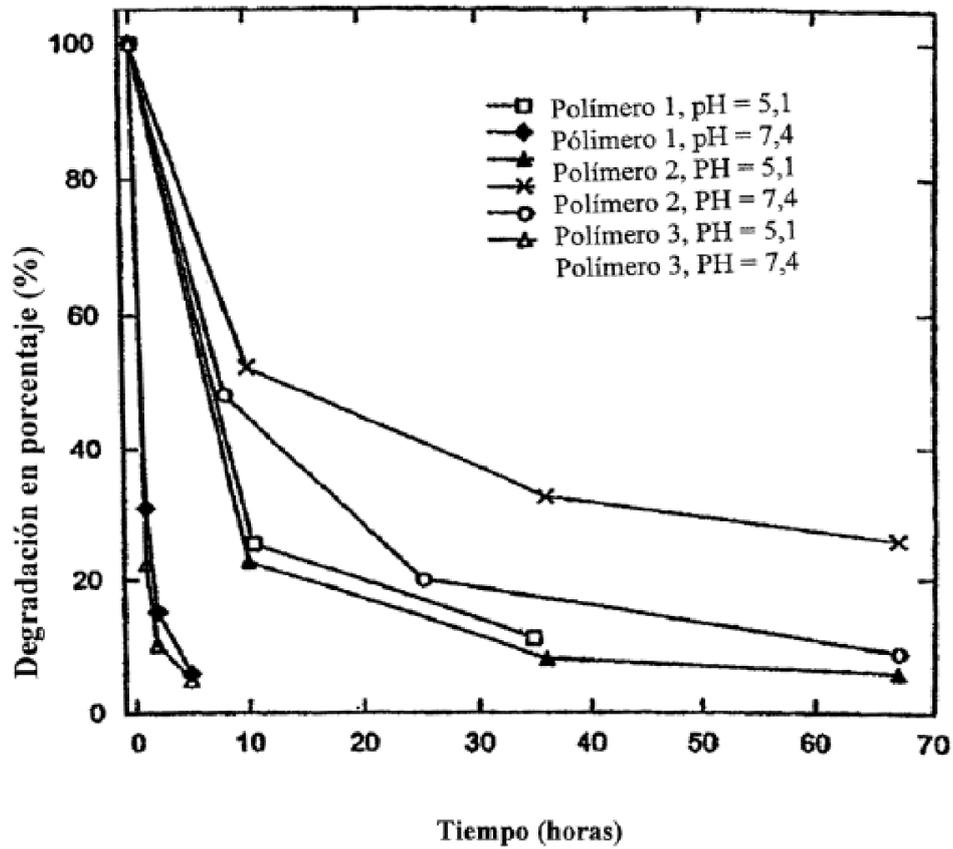


Figura 1: Degradación de los polímeros 1-3 a 37°C a pH 5,1 y pH 7,4. La degradación se expresa como el porcentaje de degradación a lo largo del tiempo basándose en los datos de CPG.

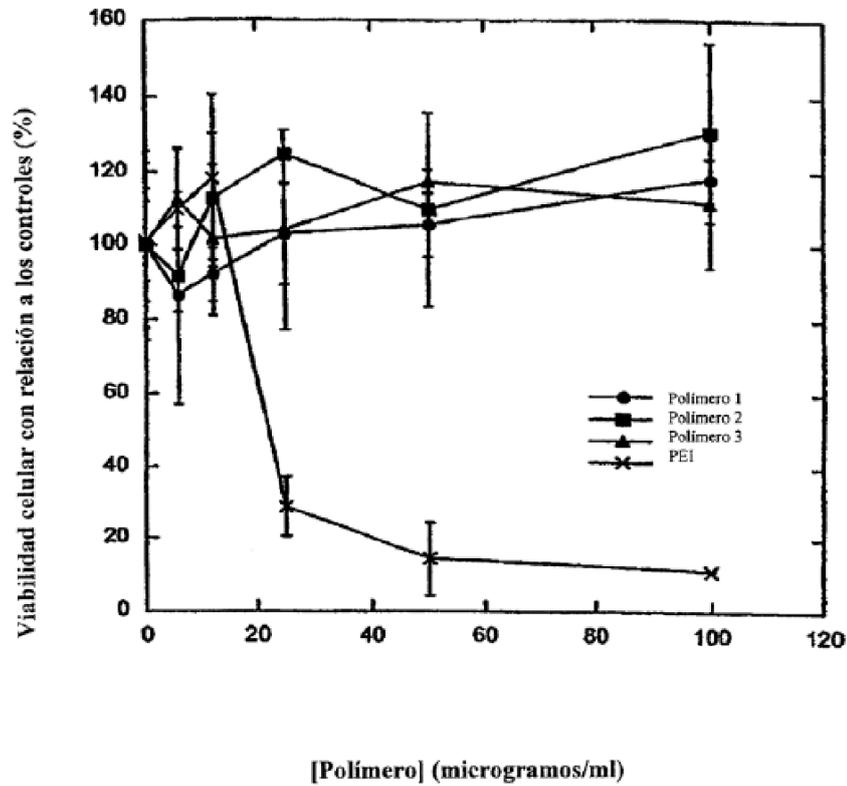


Figura 2: Perfiles de citotoxicidad de los polímeros 1-3 y PEI. La viabilidad de células NIH 3T3 se expresa como función de la concentración de polímero. Los pesos moleculares de los polímeros 1, 2 y 3 eran 5800, 11300 y 22500, respectivamente. El peso molecular de la PEI empleada era de 25000.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

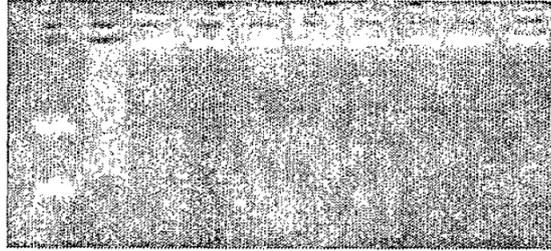


Figura 3: retardo de electroforesis en gel de agarosa del ADN de pCMV-Luc mediante el polímero 1. Los números de carril corresponden a las siguientes razones en peso de ADN/polímero diferentes: 1) 1:0 (ADN solo), 2) 1:0,5, 3) 1:1, 4) 1:2, 5) 1:3, 6) 1:4, 7) 1:5, 8) 1:6, 9) 1:7, 10) 1:8.

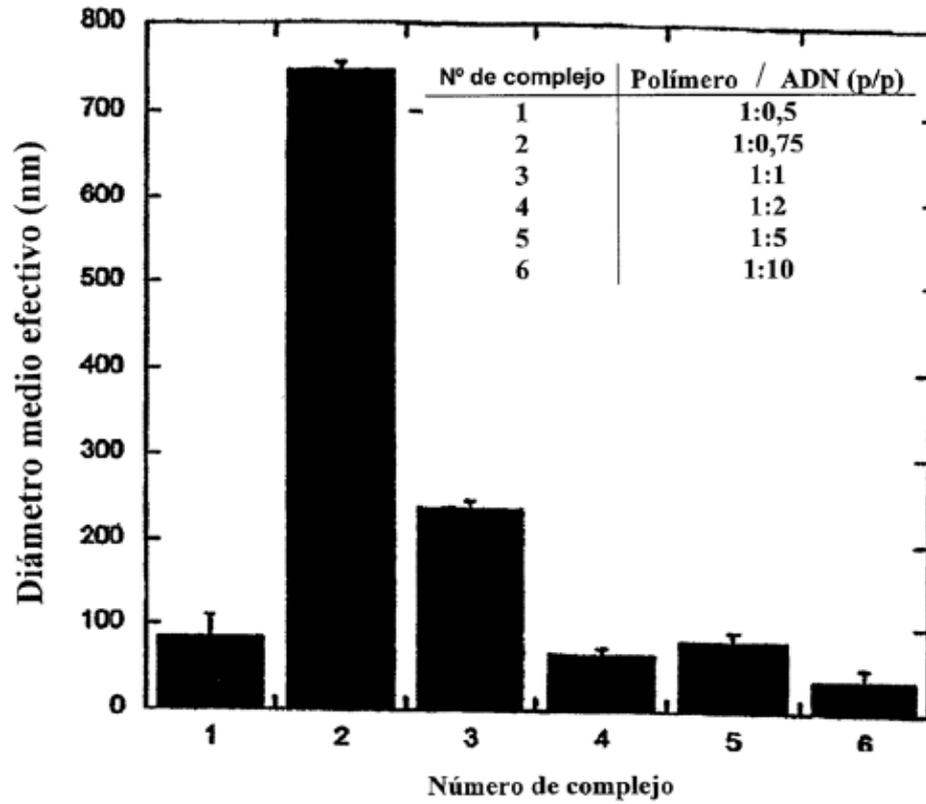


Figura 4: Diámetros eficaces promedio de complejos de ADN/polímero formados a partir del plásmido pCMV-Luc y el polímero 3 ($M_n = 31.000$) como función de la concentración de polímero.

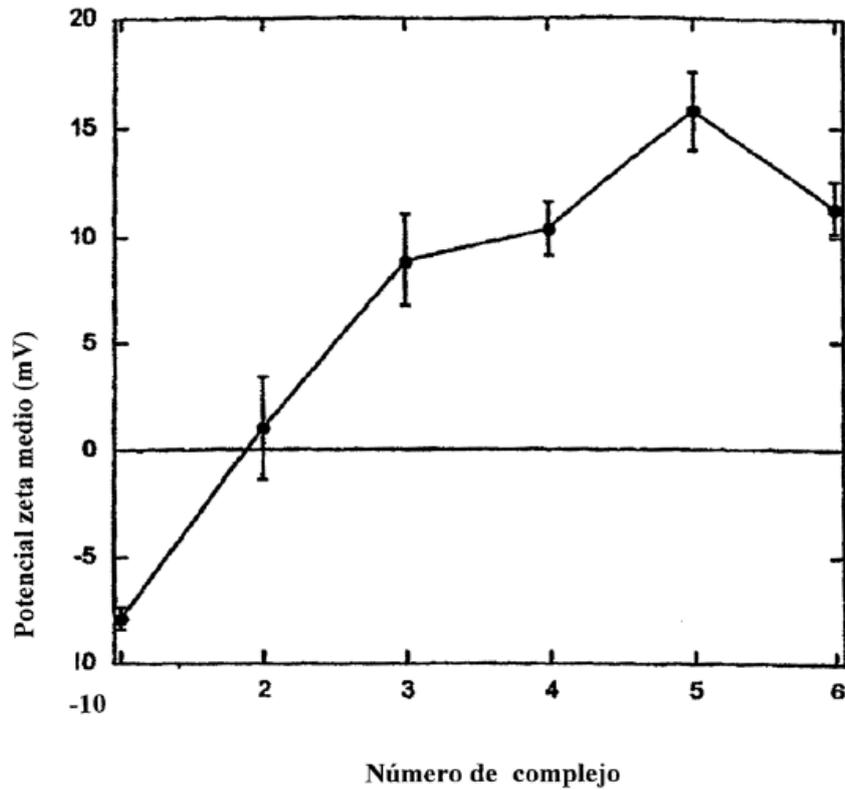


Figura 5: Potenciales ζ promedio de complejos de ADN/polímero formados a partir del plásmido pCMV-Luc y el polímero 3 ($M_n = 31.000$) como función de la concentración de polímero. Los números para cada complejo corresponden a los números de complejo en la figura 4.

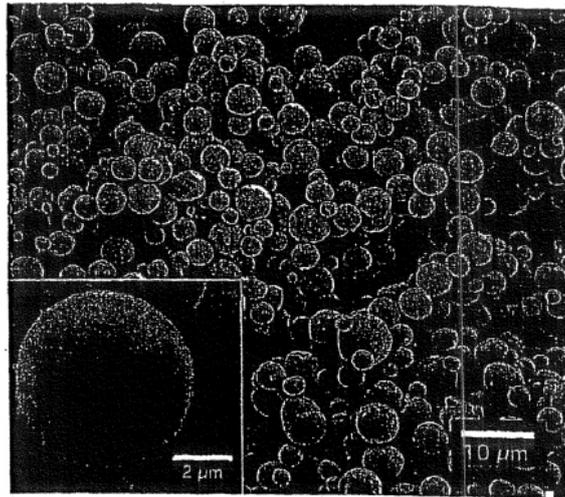
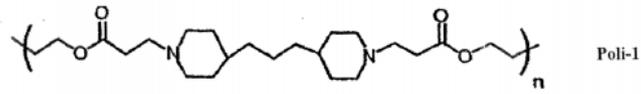
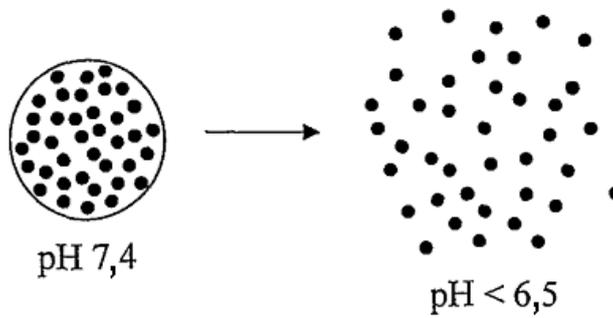


Figura 6: Imagen de MEB de microesferas cargadas con rodamina/dextrano fabricadas a partir del polímero 1.

Esquema 1



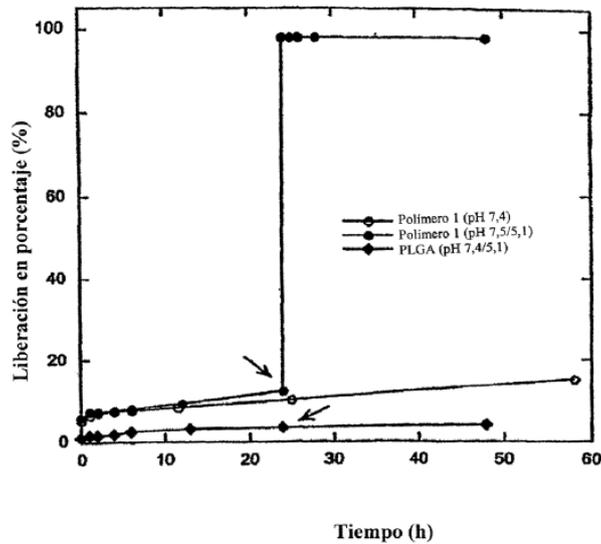


Figura 7: Perfiles de liberación de rodamina/dextrano a partir de microesferas de PLGA y polímero 1 a diversos valores de pH. Las flechas indican los puntos a los que el tampón HEPES (pH = 7,4) se intercambió por tampón acetato (pH = 5,1).

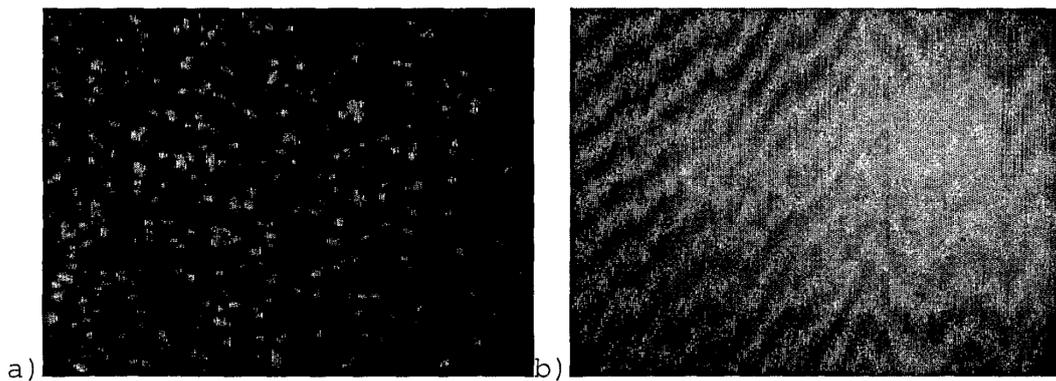


Figura 8: a) Imagen de microscopía de fluorescencia representativa de microesferas de polímero 1 cargadas con rodamina/dextrano suspendidas en tampón HEPES (pH = 7,4). b) Muestra una muestra de microesferas de polímero 1 cargadas a pH 7,4 tras la adición de tampón acetato (pH = 5,1). La dirección de la difusión del ácido es desde la parte superior derecha hasta la inferior izquierda de la imagen (tiempo transcurrido \approx 5 segundos).

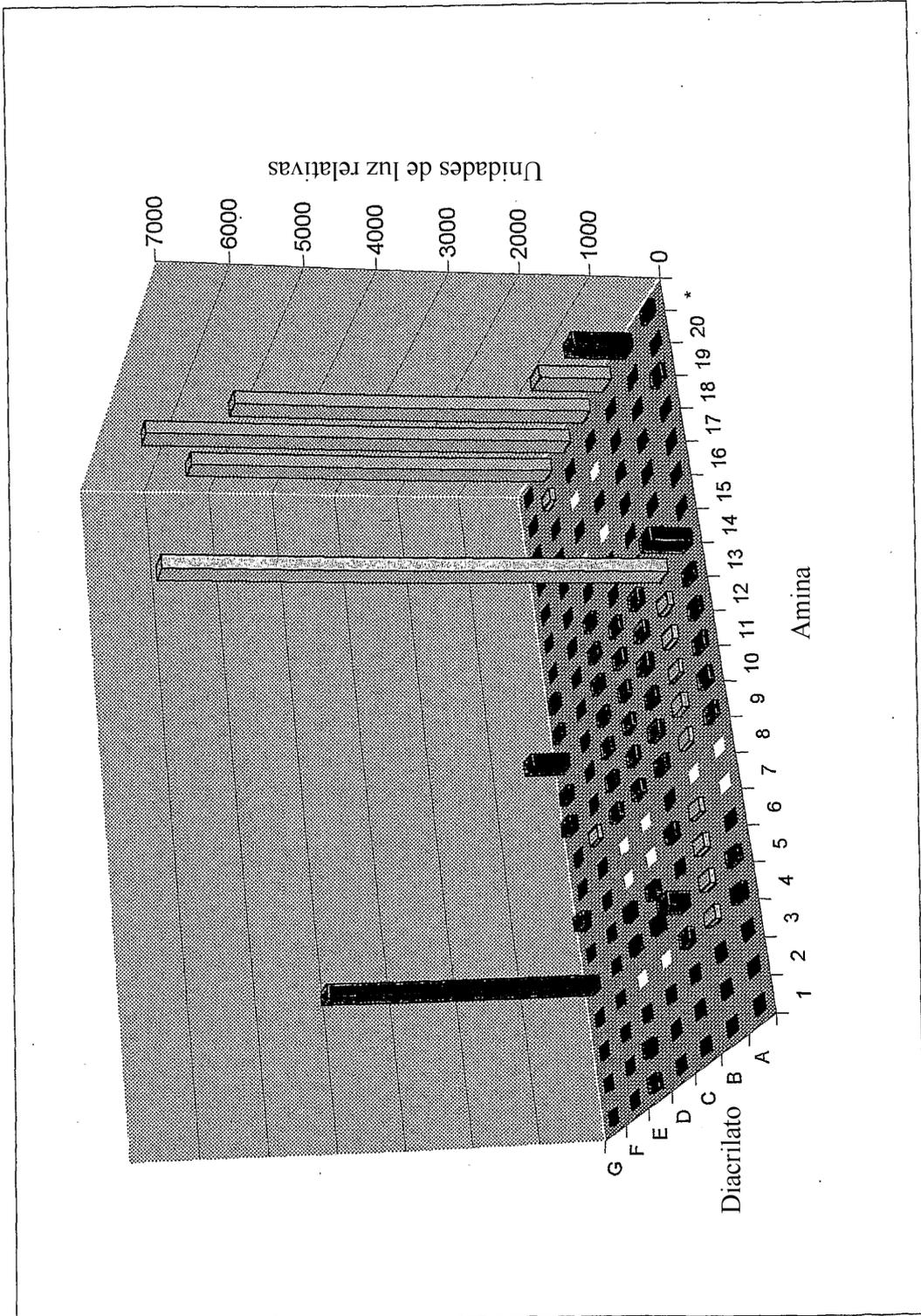


Figura 10