

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 216**

51 Int. Cl.:

C08B 37/18 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/EP2013/053422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13704973 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2825565**

54 Título: **Polímeros catiónicos a base de glucógeno**

30 Prioridad:

15.03.2012 EP 12159710

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

21.11.2019

73 Titular/es:

**AZIENDE CHIMICHE RIUNITE ANGELINI
FRANCESCO A.C.R.A.F. S.P.A. (100.0%)
Viale Amelia, 70
00181 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**RUSSO, VINCENZO;
LIBERATI, ELISA y
CAZZOLLA, NICOLA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 732 216 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

Polímeros catiónicos a base de glucógeno.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polímeros catiónicos a base de glucógeno, a complejos que comprenden dichos polímeros y a por lo menos un compuesto aniónico, y a la utilización de dichos complejos para el suministro de compuestos aniónicos.

10

En particular, los polímeros catiónicos a base de glucógeno resultan útiles como vectores no víricos para la transfección de ácidos nucleicos.

15 **Técnica anterior**

Para reducir los efectos secundarios de los principios activos y para maximizar su eficacia terapéutica, se han desarrollado sistemas de liberación controlada en los que la forma farmacéutica controla la etapa de liberación del principio activo y asimismo sistemas aptos para suministrar y dirigir el principio activo a una diana farmacológica específica.

20

En particular, los sistemas de suministro y dirección deben interactuar con los principios activos de manera que el complejo obtenido sea estable durante el almacenamiento y la administración, pero que libere el principio activo en la diana farmacológica correcta.

25 Típicamente, las interacciones que se forman entre el sistema de administración y el principio activo son no covalentes, por ejemplo, electrostáticas, iónicas o interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno y similares.

30 El problema de desarrollar sistemas de suministro y dirección se ha resuelto parcialmente para principios activos de bajo peso molecular y parcialmente para polímeros y moléculas de peso molecular elevado, por ejemplo ácidos nucleicos.

35 En particular, el procedimiento voluntario de inserción de secuencias de ácidos nucleicos y/o constructos genéticos en células diana con el fin de compensar la ausencia de un gen, sobreexpresar un gen, silenciar la expresión de un gen o introducir nuevas funciones en dicha célula se indica, en el campo de la terapia génica, mediante el término "transfección".

40 Este procedimiento aparentemente resulta prometedor tanto para el tratamiento de enfermedades genéticas como en el desarrollo de estrategias para el tratamiento y la prevención de enfermedades crónicas.

Sin embargo, al administrarse *in vivo* en forma nativa, los ácidos nucleicos, de manera muy similar a otras sustancias polianiónicas, resultan rápidamente degradados por enzimas catiónicas (por ejemplo nucleasas y proteasas) y resultan escasamente absorbidos por las células.

45 Los vectores génicos que se han estudiado y desarrollado hasta el momento incluyen sistemas víricos (retrovirus, adenovirus, etc.) y sistemas no víricos (liposomas, polímeros, péptidos, etc.).

50 Es conocido que los vectores víricos presentan una eficiencia de transfección más elevada que los sistemas no víricos. Sin embargo, la utilización de vectores víricos *in vivo* se ve limitada por numerosas desventajas, por ejemplo, el riesgo de replicación, la posibilidad de inducir reacciones inmunitarias, el hecho de que sólo se encuentran disponibles células subdivididas como dianas, la baja capacidad de carga de genes de tamaño grande o la inserción aleatoria de fragmentos de ADN.

55 Es conocido en la técnica que la utilización de terapias génicas basadas en vectores no víricos comprende numerosas ventajas, entre ellas la relativa seguridad y los bajos costes de preparación.

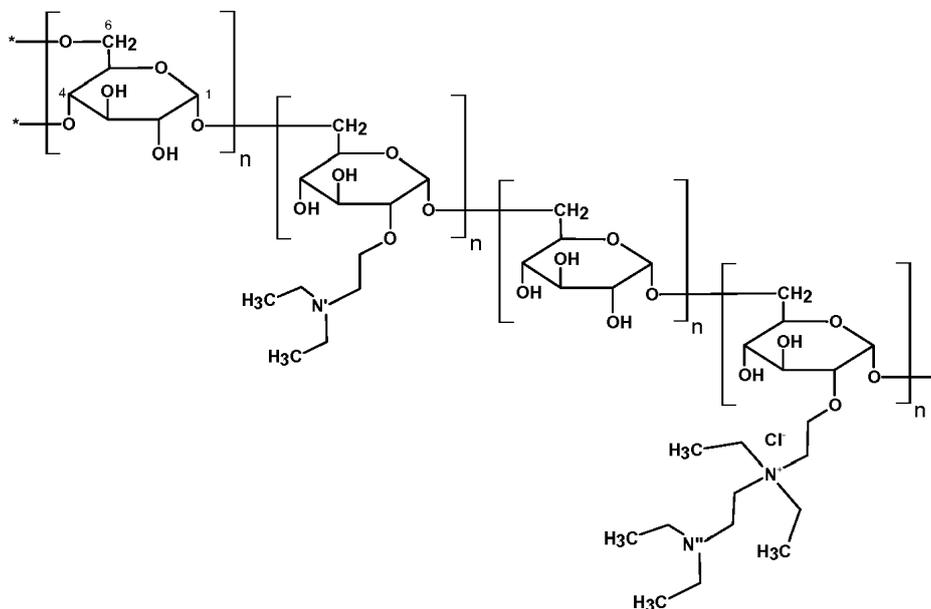
Los vectores génicos no víricos, por ejemplos liposomas catiónicas, liposomas y vectores sintéticos, han sido ampliamente utilizados como una alternativa a la utilización de vectores víricos.

60 El N,N-dietilaminoetil-dextrano (DEAE-dextrano) es uno de los primeros derivados químicos de un polímero natural que se ha utilizado para la liberación controlada de principios activos (por ejemplo para la liberación controlada en mucosas tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO 90/09780) y, posteriormente, como agente de transfección (tal como se describe en, por ejemplo, el documento EP 1 738 769).

65 El DEAE-dextrano es un polímero catiónico, obtenido mediante la reacción de cloruro de N,N-dietilaminoetilo y dextrano, que es un polímero lineal en el que las unidades de glucosa están unidas mediante enlaces α -1,6 con

pocas ramificaciones, en las que los monómeros de glucosa están unidos mediante enlaces α -1,4 (la numeración se muestra en la fórmula, a continuación).

- 5 El DEAE-dextrano, representado mediante la fórmula estructural siguiente, presenta dos sustituyentes que comprenden residuos nitrogenados, en los que los átomos de nitrógeno presentan características físicoquímicas diferentes en unos y otros.



- 10 El primer sustituyente comprende una función de amina terciaria (indicada como N') con un pK_a de aproximadamente 9,5, que, a pH fisiológico, se encuentra en forma ionizada. El segundo sustituyente, conocido como el "tándem", comprende un grupo de amonio cuaternario (N⁺), que presenta una carga positiva permanente e influye sobre la acidez de la función de la segunda amina terciaria (indicada como N''), que presenta una pK_a de aproximadamente 5,7 y que, a pH fisiológico, se encuentra en forma no ionizada. (F. Gubensek, Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry - 2 (5) 1968, 1045 -1054).
- 15

Sin embargo, es conocido que las cargas positivas del DEAE-dextrano *in vivo* interactúan con estructuras biológicas aniónicas, diferentes de los ácidos nucleicos, resultando en fenómenos de toxicidad.

- 20 En general, el mecanismo de formación de complejos entre polímeros catiónicos y ácidos nucleicos y el suministro posterior puede resumirse de la manera siguiente.

25 Los materiales genéticos forman complejo con polímeros catiónicos mediante interacciones débiles, por ejemplo interacciones electrostáticas. La formación de este complejo protege al ácido nucleico de la degradación por nucleasas y permite que el ácido nucleico sea suministrado al interior de la célula, ya que las cargas positivas presentes sobre la superficie del complejo interactúan con la membrana celular, estimulando la endocitosis del complejo, mediante la formación de endosomas.

30 El interior de los endosomas presenta un pH de aproximadamente 4,5 a 5, que es mucho más ácido que el pH del medio citoplasmático, que es de aproximadamente 7,3. Esta diferencia de pH se mantiene mediante una bomba de protones dependiente de ATP presente en la membrana endosómica, que impulsa iones H^+ del citosol hacia el interior del endosoma. El pH ácido estimula la actividad de las nucleasas lisosómicas, que son los enzimas responsables de la degradación de los ácidos nucleicos por hidrólisis de los enlaces fosfodiéster entre subunidades nucleótidas.

35 Los polímeros con capacidad tamponadora inhiben la actividad de las nucleasas lisosómicas y, simultáneamente, alteran la osmolaridad de los endosomas.

40 De hecho, aunque los polímeros secuestran iones H^+ , se requieren otros iones H^+ en el citosol, simultáneamente a iones Cl^- , para mantener la neutralidad eléctrica del endosoma. Sin embargo, la demanda de iones H^+ y Cl^- resulta en un incremento de la concentración de iones dentro del endosoma, con un incremento consecuente de la osmolaridad del endosoma respecto al citosol. El incremento de osmolaridad demanda agua del citosol. En consecuencia, el endosoma se hincha hasta que se rompe, liberando el complejo de polímero-ácido nucleico al citoplasma.

45

Este mecanismo, conocido como el "mecanismo de esponja de protones" ha sido descrito, entre otros, por J-P. Behr in "The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit" (Chimia, 1997, 51, 34-36) en relación a los polímeros de polietilenimina (PEI) y, más generalmente, por H. Elyahu et al., en: "Polymers for DNA delivery" (Molecules, 2005, 10, 34-64).

Las polietileniminas (PEI) son polímeros catiónicos lineales o ramificados que se caracterizan por la liberación altamente eficiente de oligonucleótidos y plásmidos en el interior de las células, *in vitro*, tal como han descrito, por ejemplo, O. Boussif et al., "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, vol. 92, 7297-7301) y en la solicitud de patente internacional WO 02/100435. Los PEI se describen como polímeros con una elevada densidad de carga que protegen los ácidos nucleicos frente a la degradación por nucleasas. Se cree que la elevada capacidad tamponadora de las PEI protege el ácido nucleico frente a la degradación en los endosomas durante la etapa de incorporación celular, mediante la inducción de hinchado osmótico (mecanismo de "esponja de protones") del endosoma, que permite la liberación del complejo de vector-ácido nucleico hacia dentro del citoplasma.

Otro polímero que ha sido ampliamente estudiado como agente de transfección es la poli(L-lisina) (PLL), que ha sido descrita en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 03/063827, que se caracteriza por grupos de amina primaria que están ionizados a pH fisiológico, que interactúan con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, que están cargados negativamente. Sin embargo, la toxicidad y la eficacia de transfección de la PLL son directamente proporcionales a su peso molecular: a medida que se incrementa el peso molecular del polímero, se observa una creciente eficacia de transfección, por una parte, y una citotoxicidad incrementada, por otra parte. Además, la cadena principal de la PLL apenas resulta degradada bajo condiciones fisiológicas, y su acumulación puede comportar consecuencias tóxicas a largo plazo.

Respecto a la mayoría de polímeros catiónicos, los complejos de PLL con ácidos nucleicos asimismo presentan desventajas fisicoquímicas. Por ejemplo, los procedimientos de preparación ofrecen poca capacidad de control del tamaño, y ello puede conducir a la presencia de partículas grandes, con limitada capacidad de difusión y/o la posibilidad de precipitación durante la etapa de formulación o administración. Además, aparentemente las características ácido-base de la PLL no permiten obtener una eficacia de transfección elevada, probablemente debido a la limitada capacidad de liberación del ácido nucleico hacia el interior del medio citoplasmático.

Se han descrito en la técnica anterior otros polímeros catiónicos, tanto naturales como sintéticos, como agentes de transfección para ácidos nucleicos.

Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 03/078576 describe quitosano como un agente de transfección para ácidos nucleicos.

El quitosano es un polímero lineal natural, compuesto de unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente en el polímero unidas mediante enlaces β -1,4 y que comprende un grupo amina con una pK_a de aproximadamente 6,5.

Como agentes de transfección para ácidos nucleicos, asimismo se han llevado a cabo exhaustivos estudios sobre dendrímeros que comprenden grupos positivamente ionizables, por ejemplo de estructura de poli(amidoamina) (PAMAM), macromoléculas de estructura lineal, polímeros metacrílicos (tales como metacrilato de N,N-dimetilaminoetil, DMAEMA), poli(etilenimina) (PEI) y derivados de estos polímeros, con grupos solubilizadores, funcionales o directores, por ejemplo estructuras poliméricas que contienen poli(etilenglicol) (PEG).

Las poli(amidoaminas) (PAMAM) lineales descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 97/25067 son polímeros solubles en agua que permiten la formación de complejos solubles y/o dispersables. Preferentemente, el valor de pK_a de los grupos catiónicos de estos polímeros debe mantenerse entre 7 y 8, ya que es conocido que valores más bajos de pK_a reducen la capacidad de carga con ácidos nucleicos. Además, la liberación de complejos formados a partir de dendrímeros basados en PMAM y ácidos nucleicos por endosomas implica el efecto de "esponja de protones". Específicamente, C.L. Waite et al., en: "Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA" (BMC Biotechnology, 2009, 9:38) describen que la acetilación parcial de los residuos de amina primaria reduce tanto la capacidad tamponadora de los dendrímeros basados en PAMAM como la liberación de ARNip.

Se han desarrollado polímeros catiónicos asimismo para aplicaciones otras que agentes de transfección para ácidos nucleicos.

Por ejemplo, en el párrafo 2.2 del artículo de Pal S. et al. (Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 289, 2006, páginas 193 a 199) se da a conocer cómo se cationiza el glucógeno mediante la incorporación de un monómero catiónico cloruro de N-(3-cloro-2-hidroxipropil)-trimetilo en el esqueleto del polisacárido glucógeno. Dicho polímero catiónico se ha encontrado que resulta eficaz como agente de floculación en suspensiones de mena de hierro.

Es conocido que un agente de transfección ideal debe garantizar una elevada capacidad de transfección, sin que resulte necesario manipular la diana fisiológica; no debe ser tóxico a la dosis eficaz y debe ser biodegradable, de manera que se eviten cualesquiera efectos secundarios a largo plazo.

- 5 Además, en el caso de que el agente de transfección sea un polímero, debe formar partículas de menos de un micrómetro (es decir, de menos de 10^{-6} m) y debe formar preferentemente nanopartículas, ya que es conocido que el tamaño puede limitar tanto la capacidad de difusión del complejo en el medio extracelular, como la eficiencia de endocitosis/fagocitosis en las células.
- 10 Finalmente, la estructura polimérica debe comprender grupos amina y/o átomos de nitrógeno caracterizados por diversos valores de pK_a . De hecho, los grupos amina con valores de pK_a superior al valor de pH fisiológico facilitan la formación de complejos de ácidos nucleicos a pH fisiológico; los grupos amina con valores de pK_a de aproximadamente el valor del pH endosómico activan el mecanismo de “esponja de protones” y garantizan la liberación del complejo de polímero-ácido nucleico hacia el interior del citoplasma; finalmente, los grupos de amonio
- 15 cuaternario garantizar la formación de complejo y la liberación del endosoma independientemente del valor del pH.

Sumario de la invención

20 En el contexto de la presente invención se ha resuelto el problema de desarrollar nuevos polímeros que pueden utilizarse para el suministro de principios activos de bajo peso molecular y como vectores no víricos para ácidos nucleicos, y que pueden superar las desventajas de los materiales conocidos de la técnica anterior.

Inesperadamente, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que el glucógeno puede modificarse de manera que se obtienen nuevos derivados catiónicos.

25 Ventajosamente, dichos nuevos derivados catiónicos del glucógeno se caracterizan por una baja citotoxicidad.

30 En el contexto de la presente invención se cree que lo anterior se debe principalmente a dos motivos. En primer lugar, el glucógeno es un polímero biocompatible, que es un producto del metabolismo y almacenamiento de los azúcares en todos los cuerpos animales, donde se produce y degrada continuamente. Además, en el contexto de la presente invención se cree que las numerosas ramas en el glucógeno proporcionan a la estructura una conformación esférica estable que es capaz de reducir selectivamente el acceso a las cargas catiónicas: las moléculas solubles pueden difundirse dentro de la estructura del polímero y formar complejo con los sitios catiónicos, mientras que, en contraste, las interacciones con estructuras más complejas ya no estarían permitidas por motivos estéricos. Dicha conformación esférica haría posible reducir la toxicidad de las cargas catiónicas, que típicamente dañan las membranas celulares.

40 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que los nuevos derivados catiónicos del glucógeno conservan las características de biocompatibilidad del polímero natural a partir del cual se derivan.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto además que estos nuevos derivados catiónicos del glucógeno son aptos para formar complejos con compuestos aniónicos que presentan tamaños y pesos moleculares dentro de un amplio intervalo.

45 Ventajosamente, dichos complejos son de tamaño nanométrico y no muestran ninguna agregación al encontrarse en solución, incluso a concentraciones elevadas.

50 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que los nuevos derivados catiónicos del glucógeno pueden suministrar compuestos aniónicos a dianas fisiológicas específicas (por ejemplo, órganos, tejidos y células).

En el contexto de la presente invención se ha descubierto además que los derivados catiónicos del glucógeno según la presente invención son capaces de penetrar en las células.

55 En consecuencia, dichos nuevos derivados catiónicos del glucógeno pueden utilizarse para suministrar compuestos aniónicos al interior de las células.

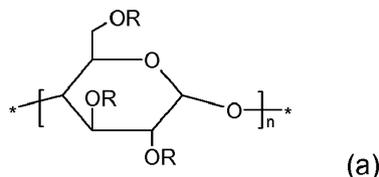
60 Finalmente, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que los derivados catiónicos del glucógeno según la presente invención pueden utilizarse como estabilizadores, en la conservación de proteínas y enzimas, y como coadyuvantes en la producción de vacunas.

65 Ventajosamente, los nuevos derivados catiónicos del glucógeno comprenden sustituyentes que portan grupos amina caracterizados por valores de pK_a que son diferentes entre sí, de manera que facilitan tanto la formación de complejos de compuestos aniónicos como la liberación de los complejos de polímero-compuesto aniónico del endosoma al citoplasma.

Ventajosamente, los nuevos derivados catiónicos del glucógeno según la presente invención presentan baja viscosidad y, en consecuencia, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para el uso inyectable.

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere, de esta manera, a nuevos polímeros catiónicos a base de glucógeno modificado, en particular la presente invención se refiere a polímeros catiónicos basados en el glucógeno que comprenden por lo menos una unidad repetitiva seleccionada del grupo que consiste en:

(a)



10

en la que:

15

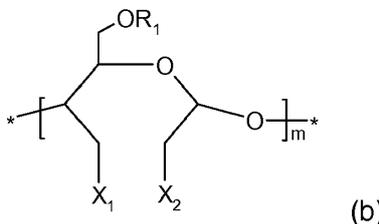
los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son de un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de: NH₂-alquilo C₁-C₆, [N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆]-dialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, [trialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, azocicilil-alquilo C₁-C₆, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₆, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, y

20

n es un número entero superior o igual a 1, y

25

(b)



30

en la que:

35

R₁ se selecciona de un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de: NH₂-alquilo C₁-C₆, [N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆]-dialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, [trialquil C₁-C₆-amónio]-alquilo C₁-C₆, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₆, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo,

40

X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -OH o un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en el que R₂ se selecciona de: átomo de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y H-[NH-alquilo C₁-C₆]_p, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos de alquilo C₁-C₆ pueden ser idénticos o diferentes, y

45

m es un número entero superior o igual a 1,

bajo la condición de que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno tal como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂, y

50

con la condición de que dicho polímero catiónico basado en el glucógeno sea diferente del producto obtenido de la reacción del glucógeno con cloruro de N-(3-cloro-2-hidroxipropil)-trimetil-amónio.

La expresión anteriormente indicada "bajo la condición de que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno tal como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂" se refiere a que, en el caso en que R es un grupo que contiene nitrógeno, este grupo es tal como se define en R; en el caso

en que R_1 es un grupo que contiene nitrógeno, este grupo es tal como se define en R_1 ; en el caso en que X_1 es un grupo que contiene nitrógeno, este grupo es tal como se define en X_1 , y en el caso en que X_2 es un grupo que contiene nitrógeno, este grupo es tal como se define en X_2 .

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un complejo entre un polímero catiónico basado en el glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico.

Según dicha forma de realización, dicho compuesto aniónico es un principio activo o un ácido nucleico.

10 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un complejo entre un polímero catiónico basado en el glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un complejo entre un polímero catiónico basado en el glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico, para el suministro o la transfección de dicho compuesto aniónico a una diana farmacológica específica, por ejemplo un órgano, un tejido o una célula.

20 Según dicha forma de realización, dicho compuesto aniónico es un principio activo o un ácido nucleico.

Breve descripción de las figuras

25 Las figuras 1 a 8 representan ocho geles de agarosa obtenidos tras la electroforesis en gel, tal como se indica en el ejemplo 5. En la totalidad de las figuras 1 a 8, se sembraron marcadores de ARNip(*) y de ADN(*) para obtener las bandas correspondientes, que se utilizaron con fines comparativos y para comprobar el funcionamiento del método de electroforesis.

30 La figura 1 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre el polímero 3 según la invención y el ARNip a diversas concentraciones (de 0.5% a 8% en peso). El polímero 3 libre de ácidos nucleicos (0%) se utilizó como comparativo para comprobar que el polímero catiónico según la invención no interfiere con la detección del punto respecto al ARNip.

La figura 2 representa un gel de agarosa en el que se sembraron:

- 35
- complejos obtenidos entre el polímero 3 según la invención y el ARNip a concentraciones de 10% a 20% en peso,
 - polímero 3 libre de ácidos nucleicos (0%) como comparativo para comprobar que el polímero catiónico según la invención no interfiere con la detección del punto respecto al ARNip, y
 - 40 - polímero 50 (glucógeno Polglumyt™ no modificado) como comparativo para comprobar que el glucógeno, no modificado según la presente invención, no es capaz de formar complejo con ácidos nucleicos.

45 La figura 3 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre el polímero 3 según la invención y el ARNip a diversas concentraciones (de 30% a 800% en peso).

50 La figura 4 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre los polímeros 1, 2 y 6 según la invención y ARNip a concentraciones de 5% y 20% en peso respecto al peso total de cada polímero.

La figura 5 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre los polímeros 10, 14 y 15 y ARNip a concentraciones de 5% y 20% en peso respecto al peso total de cada polímero.

55 La figura 6 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre los polímeros 8, 12 y 16 y ARNip a concentraciones de 5% y 20% en peso respecto al peso total de cada polímero.

60 La figura 7 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre los polímeros 21, 24 y 25 según la invención y ARNip a concentraciones de 5% y 20% en peso respecto al peso total de cada polímero.

65 La figura 8 representa un gel de agarosa en el que se sembraron complejos obtenidos entre los polímeros 20, 23 y 28 según la invención y ARNip a concentraciones de 5% y 20% en peso respecto al peso total de cada polímero.

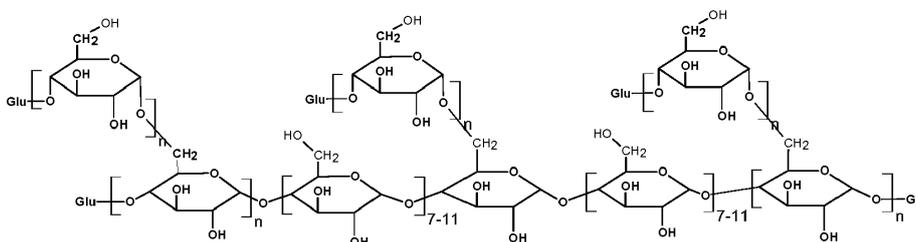
La figura 9 muestra la curva de titulación para los polímeros 2, 3 y 4 según la invención, obtenida tal como se indica en el ejemplo 8.

La figura 10 muestra la curva de titulación para los polímeros 4 (según la invención) y 18 (comparativo) obtenida tal como se indica en el ejemplo 8.

Descripción detallada de la invención

En la presente descripción y en las reivindicaciones siguientes, la expresión “polímero catiónico” indica un polímero con una carga positiva global, a pH fisiológico.

En la presente descripción y en las reivindicaciones siguientes, el término “glucógeno” indica, en general, un homopolímero de glucosa caracterizado por un grado elevado de ramificación, en el que los monómeros de glucosa se unen mediante enlaces α -(1,4) en las cadenas lineales, mientras que las ramas se injertan mediante enlaces α -(1,6), generalmente, aunque sin limitación, cada 7 a 11 monómeros de glucosa, tal como se muestra en la fórmula a continuación:



En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, la expresión “a base de glucógeno” se utiliza para indicar que el polímero comprende la estructura de glucógeno indicada anteriormente, que se modifica parcialmente para obtener el polímero catiónico según la presente invención.

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, la expresión “unidad repetitiva” identifica un monómero que se encuentra presente por lo menos una vez en el polímero catiónico según la presente invención.

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, la expresión “alquilo C₁-C₆” indica un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene entre 1 y 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, sec-pentilo, 3-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo o neohexilo.

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, el término “azociclilo” indica un anillo heterocíclico aromático o alifático de 3 a 7 elementos, que contiene por lo menos un átomo de N, tal como, por ejemplo, aziridina, pirrol, pirrolina, pirrolidina, piridina o piperidina. Opcionalmente, el anillo heterocíclico anteriormente mencionado puede comprender por lo menos un segundo heteroátomo seleccionado de N, O y S, tal como, por ejemplo, tiazol, oxazina o tiazina.

En el contexto de la presente invención y de las reivindicaciones siguientes, el término “complejo” indica un producto obtenido mediante la interacción del polímero catiónico a base de glucógeno según la presente invención con por lo menos un compuesto aniónico, mediante interacciones no covalentes (por ejemplo, electrostáticas, interacciones iónicas o de van der Waals, enlaces de hidrógeno y similares).

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, la expresión “principio activo” comprende moléculas naturales, semisintéticas o sintéticas, que, después de la administración, son capaces de interactuar con una función biológica de una célula o de un organismo vivo y posiblemente de modificar dicha función biológica. Los principios activos que resultan útiles según la presente invención son, de esta manera, moléculas con una carga negativa global, es decir, moléculas aniónicas, las cuales pueden utilizarse para la terapia, profilaxis o diagnóstico de un estado patológico. Dichas moléculas aniónicas pueden ser orgánicas o inorgánicas. Por ejemplo, pueden ser moléculas aniónicas orgánicas y pueden presentar un peso molecular bajo (por ejemplo, aminoácidos, sulfamidas o vitaminas) o un peso molecular elevado (por ejemplo, vacunas o glucosaminoglucanos, tales como la heparina).

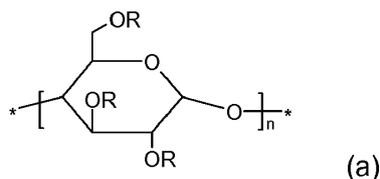
En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, la expresión “ácido nucleico” indica macromoléculas de nucleótidos, de origen natural o sintético, que son de doble cadena o de cadena sencilla, y que presentan una carga negativa global. En particular, dicha expresión incluye oligonucleótidos, ARN (ARNip, ARNdc, ARNcs, ARNhc, ARNmi, ARNr, ARNnh, ARNm, ARNt, ARNnp, pre-ARNm, ARN catalítico, ARN antisentido), ADN (ADNc, ADNmt, ADNcs, ADNdc, ADN antisentido y ADN plasmídico).

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, las expresiones “suministro de un principio activo” y “suministro de principio activo” indican el transporte del principio activo formado complejo con el polímero catiónico según la presente invención con una diana fisiológica específica, por ejemplo un tejido o un órgano.

En el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones siguientes, los términos “transfección” y “transfectar” indican la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, en particular en el citoplasma y/o en el núcleo.

En particular, la presente invención se refiere a un polímero catiónico a base de glucógeno que comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada del grupo que consiste en:

(a)

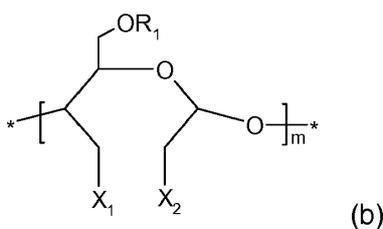


en la que:

los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno; un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de NH₂-alquilo C₁-C₆, [N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, [trialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, azocicilil-alquilo C₁-C₆, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₆, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, y

n es un número entero superior o igual a 1, y

(b)



en la que:

los grupos R₁ se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de NH₂-alquilo C₁-C₆, [N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-dialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquil C₁-C₆-amino]-alquil C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, [trialquil C₁-C₆-amonio]-alquilo C₁-C₆, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₆, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo,

X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -OH o un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en el que R₂ se selecciona de: átomo de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y H-[NH-alquilo C₁-C₆]_p⁻, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos de alquilo C₁-C₆ pueden ser idénticos o diferentes, y

m es un número entero superior o igual a 1,

bajo la condición de que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno tal como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂, y

con la condición de que dicho polímero catiónico a base de glucógeno sea diferente del producto obtenido mediante la reacción de glucógeno con cloruro de N-(3-cloro-2-hidroxipropil)-trimetil-amonio, tal como se da a conocer, en particular en el párrafo 2 del artículo de Pal S et al. (Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 289, 2006, páginas 193 a 199).

5 Preferentemente, los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son de un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de: [N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquilo C₁-C₃, {[N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquil C₁-C₃-dialquil C₁-C₃-amónio}-alquilo C₁-C₃, {[N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquil C₁-C₃-amino}-alquilo C₁-C₃, o [trialquil C₁-C₃-amónio]-alquilo C₁-C₃, azocicilil-alquilo C₁-C₃, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₃, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con un grupo hidroxilo.

15 Preferentemente, el anillo heterocíclico que contiene por lo menos un átomo de N representado por el término "azocicilo" es un anillo heterocíclico aromático o alifático de 5 o 6 elementos, tal como, por ejemplo, pirrol, pirrolina, pirrolidina, piridina o piperidina. Ventajosamente, dicho anillo heterocíclico de 5 o 6 elementos comprende por lo menos un segundo heteroátomo seleccionado de N, O y S y está representado, por ejemplo, por diazol, oxazina y tiazina. Preferentemente, dicho anillo heterocíclico es alifático. Todavía más preferentemente, dicho anillo heterocíclico es morfolina o piperidina.

20 Más preferentemente, los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son de un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de: N,N-dimetilaminoetilo, N,N-dimetilaminopropilo, N,N-dietilaminoetilo, [(N,N-dimetilaminoetil)dimetilamonio]etilo, [(N,N-dimetilaminopropil)dimetilamonio]propilo, [(N,N-dietilamino-etil)dietilamonio]-etilo, [trimetilamonio]-2-hidroxipropilo, piperidil-N-etilo o morfolinil-N-etilo.

25 Preferentemente, R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de: [N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquilo C₁-C₃, {[N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquil C₁-C₃-dialquil C₁-C₃-amónio}-alquilo C₁-C₃, {[N,N-dialquil C₁-C₃-amino]-alquil C₁-C₃-amino}-alquilo C₁-C₃, o [trialquil C₁-C₃-amónio]-alquilo C₁-C₃, en el que las cadenas de alquilo C₁-C₃, que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con un grupo hidroxilo.

Más preferentemente, R₁ es un átomo de hidrógeno o un grupo carboximetilo.

35 Preferentemente, X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -NHR₂, en el que R₂ es un átomo de hidrógeno o H-[NH-alquilo C₁-C₄]_p-, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos de alquilo C₁-C₄ pueden ser idénticos o diferentes.

40 Preferentemente, dicho grupo H-[NH-alquilo C₁-C₄]_p- es una polietilenimina, con un peso molecular de 50 a 3.000 daltons y más preferentemente con un peso molecular de 1.000 a 2.300 daltons, espermina (H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂), o espermidina (H₂N(CH₂)₄NH(CH₂)₄NH₂).

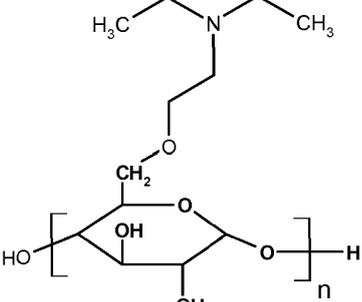
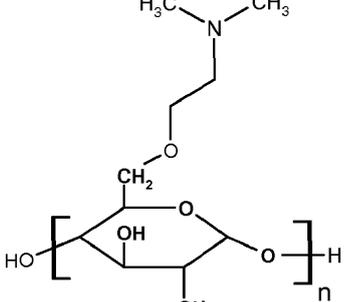
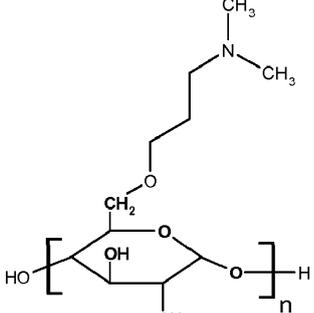
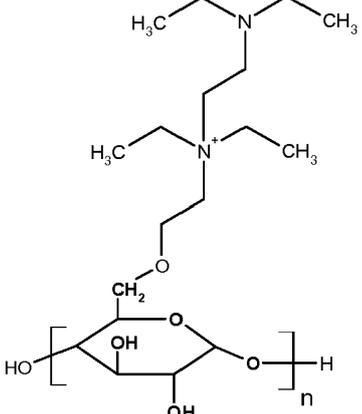
45 Son ejemplos de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables, trometamina, lisina, arginina, glicina, alanina, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, propilamina, dipropilamina, tripropilamina, etilendiamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, guanidina, morfolina, piperidina, pirrolidina, piperazina, 1-butilpiperidina, 1-etil-2-metilpiperidina, N-metilpiperazina, 1,4-di-metilpiperazina, N-bencilfenetilamina, N-metilglucosamina y tris(hidroximetil)aminometano.

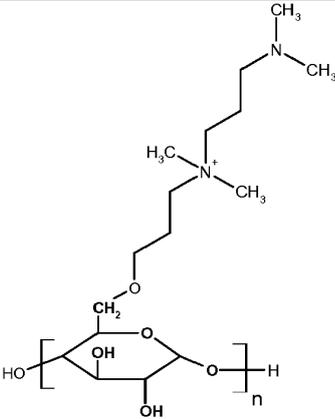
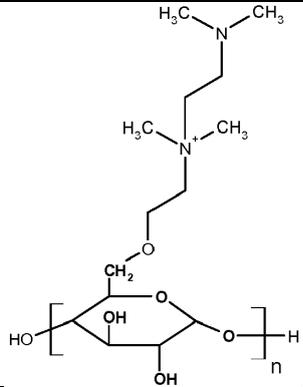
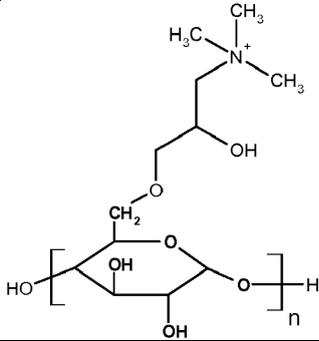
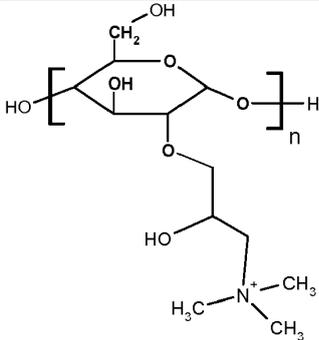
50 Son ejemplos de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables, hidróxidos o carbonatos de metal alcalino o metal alcalino-térreo, tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido cálcico, carbonato sódico, carbonato potásico y carbonato cálcico.

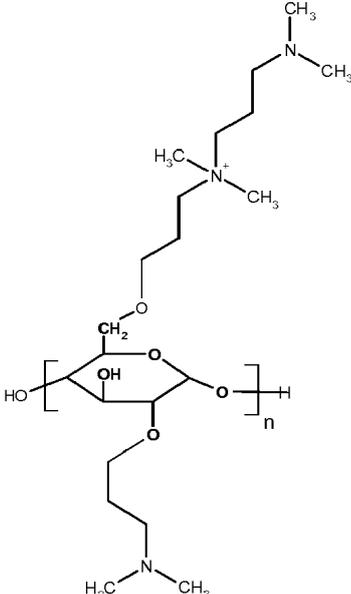
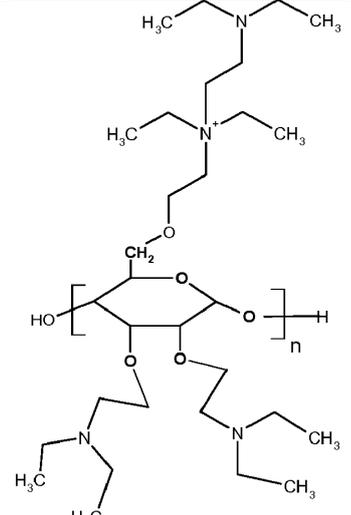
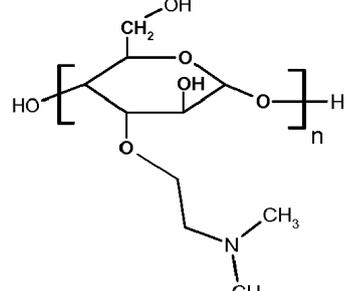
Ventajosamente, dichas unidades repetitivas (a) y (b) se disponen aleatoriamente en las cadenas de glucógeno.

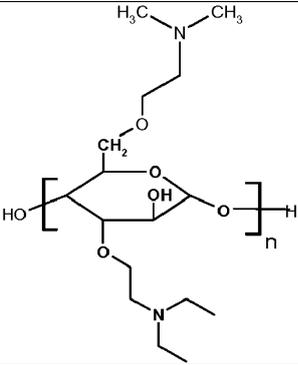
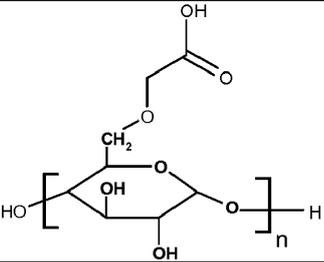
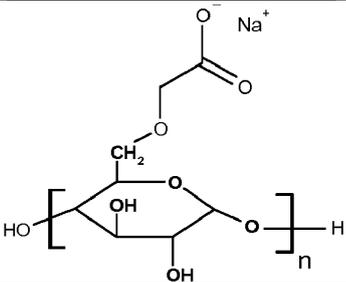
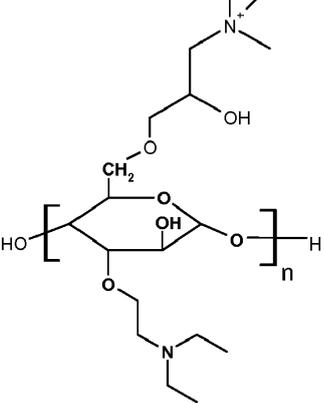
55 Los ejemplos de unidades repetitivas (a) y (b) se representan, respectivamente, en las tablas A y B, a continuación.

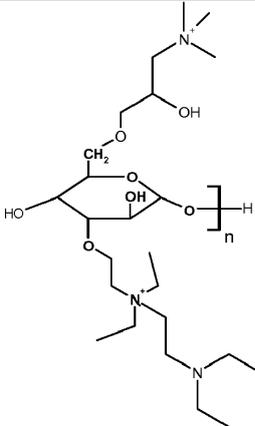
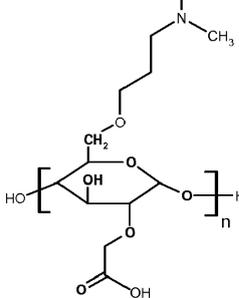
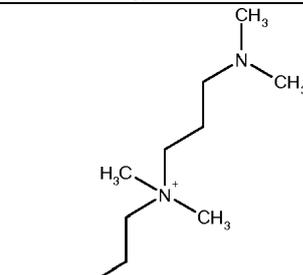
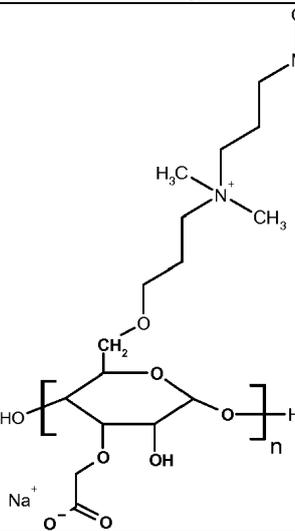
Tabla A. Ejemplos de unidades repetitivas (a)

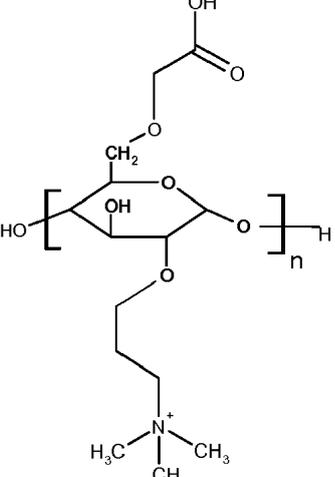
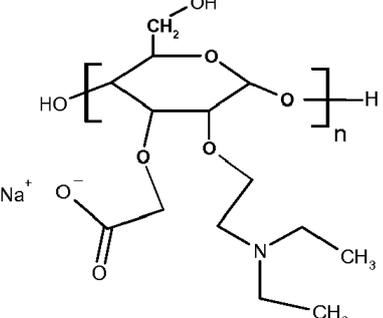
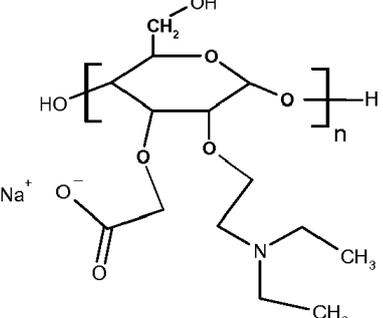
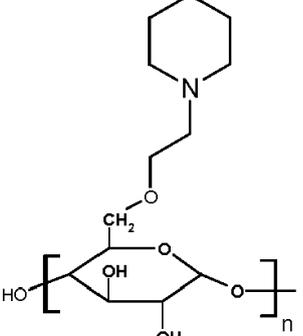
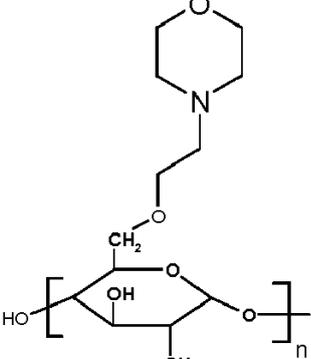
Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
6	N,N-dietilaminoetilo	
6	N,N-dimetilaminoetilo	
6	N,N-dimetilaminopropilo	
6	[(N,N-dietilaminoetil)-dietilamonio]etilo	

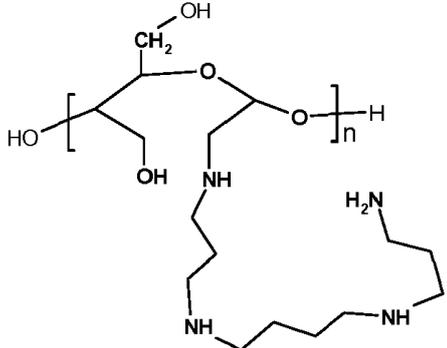
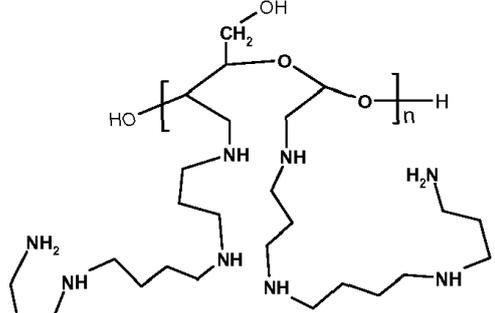
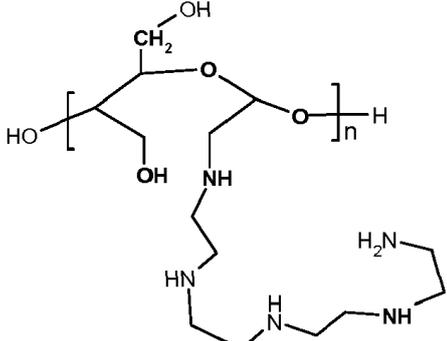
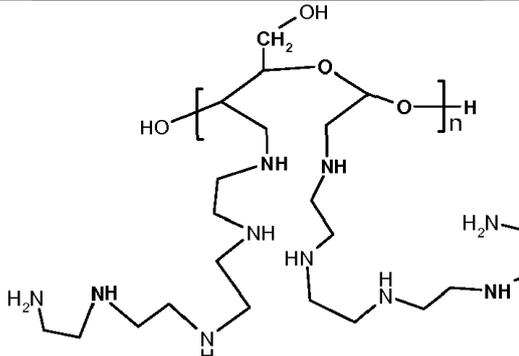
Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
6	[(N,N-dimetilaminopropil)-o]propil dimetilamonio	
6	[(N,N-dimetilaminoetil)-dimetilamonio]etilo	
6 (no según la invención)	[trimetilamonio]-2-hidroxipropilo	
2 (no según la invención)	[trimetilamonio]-2-hidroxipropilo	
6	[(N,N-dimetilaminopropil)-dimetilamonio]propilo	

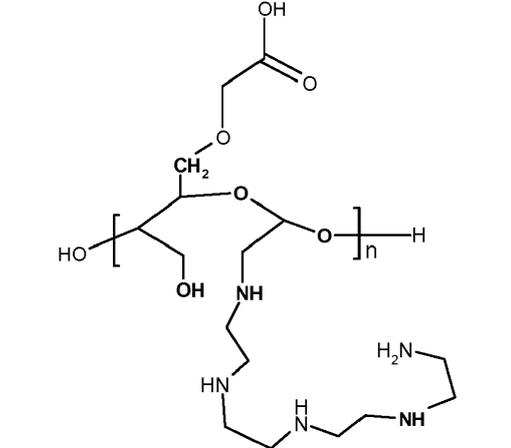
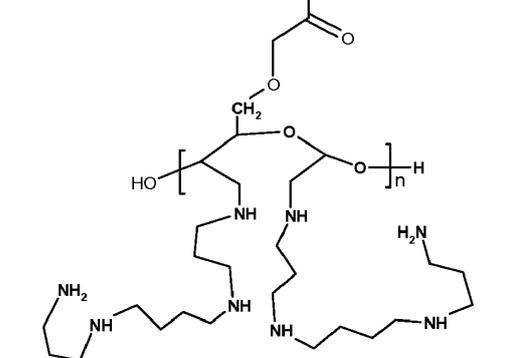
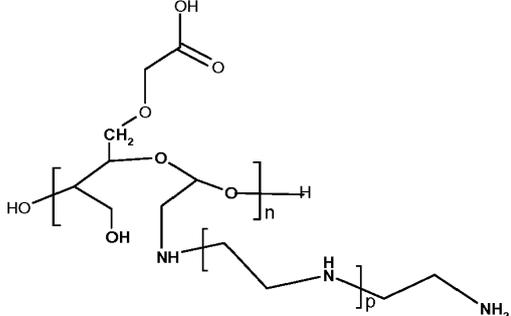
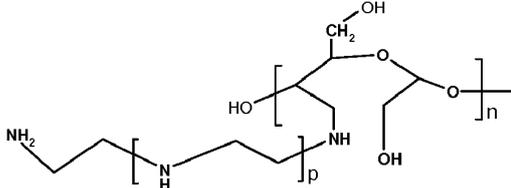
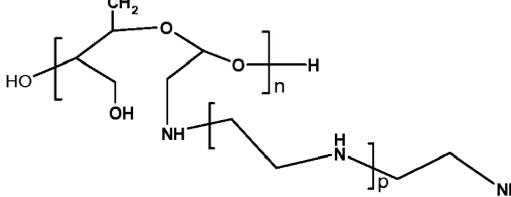
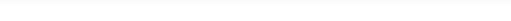
Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
2	N,N-dimetilaminopropilo	
6	[(N,N-dietilaminoetil)-dietilammonio]etilo	
3	N,N-dimetilaminoetilo	
6	N,N-dimetilaminoetilo	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
3	N,N-dietilaminoetilo	
6	carboximetilo	
6	sal sódica de carboximetilo	
6	trimetilamonio -2-hidroxiopropilo	
3	N,N-dietilaminoetilo	
6	[trimetilamonio]-2-hidroxiopropilo	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
3	[(N,N-dietilaminoetil)-dietilamonio]etilo	
6	N,N-dimetilaminopropilo	
2	carboximetilo	
6	[(N,N-dimetilaminopropil)-dimetilamonio]propilo	
3	sal sódica de carboximetilo	
6	carboximetilo	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
2	[trimetilammonio]propilo	
3	N,N-dietilaminoetilo	
6	sal sódica de carboximetilo	
6	N-etilpiperidilo	
6	N-etilmorfolinilo	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
2	Espermina	
2.3	Espermina	
2	Tetraetilenpentamina	
2.3	Tetraetilenpentamina	
6	Carboximetilo	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
2	Tetraetilenpentamina	
6	Carboximetilo	
2.3	Espermina	
2	Polietilenimina (PM=1300 Da)	
3	Polietilenimina (PM=2000 Da)	
2	Polietilenimina	
6	Carboximetilo	
2	Polietilenimina	

Posición de sustituyente	Sustituyente	Unidad repetitiva de fórmula (a)
6	N,N-dietilaminoetilo	

Según una forma de realización preferida, dichas unidades repetitivas (a) y (b) comprenden por lo menos un grupo que contiene nitrógeno, que es ionizable a pH fisiológico y que facilita la formación de complejo de dicho compuesto aniónico, y por lo menos un grupo que contiene nitrógeno, que es ionizable a un pH inferior al pH fisiológico y que facilita la liberación del complejo respecto de los endosomas.

Preferentemente, dichos grupos que contienen nitrógeno que son ionizables a pH fisiológico se encuentran presentes en porcentajes numéricos de 1% a 30% respecto al número total de grupos hidroxilo en el glucógeno utilizados para preparar los polímeros catiónicos según la presente invención.

Preferentemente, dichos grupos que contienen nitrógeno que son ionizables a un pH inferior al pH fisiológico se encuentran presentes en porcentajes numéricos de 0,1% a 10% respecto al número total de grupos hidroxilo en el glucógeno utilizados para preparar los polímeros catiónicos según la presente invención.

En el contexto de la presente invención, dichos grupos que contienen nitrógeno, que son ionizables a pH fisiológico, son NH₂-alquilo C₁-C₆, [N,N-dialquilo C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, NH₂-[alquilo C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆, {[N,N-dialquilo C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₆-amino}-alquilo C₁-C₆ y azocicliil-alquilo C₁-C₆.

Ventajosamente, dichos grupos que contienen nitrógeno, que son ionizables a un pH inferior al pH fisiológico, son NH₂-{[alquilo C₁-C₃]-dialquilo C₁-C₆-amino}-alquilo C₁-C₆ y {[N,N-dialquilo C₁-C₆-amino]-alquilo C₁-C₃-dialquilo C₁-C₆-amino}-alquilo C₁-C₆.

Ventajosamente, los nuevos derivados catiónicos del glucógeno según la presente invención presentan baja viscosidad y, en consecuencia, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para el uso inyectable. En particular, los nuevos derivados catiónicos de glucógeno según la presente invención presentan una viscosidad inferior a 10 mPa·s y preferentemente inferior a 5 mPa·s a una concentración de 1% en PBS con un reómetro rotatorio.

El glucógeno utilizado para preparar los polímeros catiónicos según la presente invención puede obtenerse según uno de los métodos conocidos de la técnica.

Preferentemente, el glucógeno se prepara tal como se indica en la solicitud de patente internacional WO 94/03502.

Preferentemente, dicho glucógeno se obtiene de las especies *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*.

Pueden utilizarse otras fuentes de glucógeno en el contexto de la presente invención, incluyendo moluscos tales como ostras y *Crepidula fornicata*, y los órganos ricos en glucógeno de animales vertebrados, tales como el hígado y los músculos.

Preferentemente, dicho glucógeno se encuentra sustancialmente libre de compuestos que contienen nitrógeno y azúcares reductores. Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones siguientes, la expresión "sustancialmente libre de compuestos que contienen nitrógeno y azúcares reductores" indica que el contenido de nitrógeno es inferior a 60 ppm, medido mediante el método de Kieldahl, y el contenido de azúcares reductores es inferior a 0.25%, medido mediante el método de F.D. Snell and Snell ("Colorimetric Methods of Analysis", New York, 1954, vol. III, p. 204).

Preferentemente, el glucógeno utilizado según la presente invención asimismo se caracteriza por un contenido de carbono de entre aproximadamente 44% y aproximadamente 45%, un peso molecular de aproximadamente $(2.5 \pm 0.1) \times 10^6$ daltons y una rotación óptica $(\alpha)_D^{20}$ de 197 ± 2.0 ($c = 1$, en agua).

Más preferentemente, el glucógeno utilizado según la presente invención es el glucógeno Polglumyt™, producido

por Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco A.C.R.A.F. S.p.A.

5 El experto en la materia entenderá fácilmente que la presente invención no se refiere a nuevas clases de compuestos con eficacia terapéutica *per se*. Por el contrario, la presente invención se refiere a la utilización de un polímero catiónico a base de glucógeno tal como se ha descrito anteriormente, para la formación de un complejo con por lo menos un compuesto aniónico.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un complejo entre un polímero catiónico basado en el glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico, en el que dicho polímero catiónico basado en el glucógeno comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (a) y (b), indicados anteriormente.

15 Preferentemente, dicho compuesto aniónico es orgánico o inorgánico, con un peso molecular bajo o un peso molecular elevado.

20 Más preferentemente, dicho compuesto aniónico es un principio activo perteneciente, por ejemplo, a una de las clases siguientes: agentes antiinfecciosos, por ejemplo antibióticos y antivíricos; analgésicos, anorécticos, antihelmínticos, antiasmáticos, anticonvulsivos, antidepresivos, antidiabéticos, antiadiarreicos, antihistamínico, antiinflamatorios, agentes antihemibránicos, agentes antináusea, antineoplásicos, antiparkinsonianos, agentes antipruriginosos, antipsicóticos, antipiréticos, antiespasmódicos, agentes anticolinérgicos, simpatomiméticos, derivados de xantina; fármacos para el sistema cardiovascular, por ejemplo potasio, bloqueantes de los canales del calcio, beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes y antiarrítmicos, antihipertensivos, diuréticos y antiuréticos, vasodilatadores centrales y periféricos, estimulantes del sistema nervioso central, vasoconstrictores, agentes antitusivos, descongestionantes, hormonas, hipnóticos, inmunosupresores, relajantes musculares, parasimpatolíticos, psicoestimulantes, sedantes y tranquilizantes.

25 Según una forma de realización preferida, dicho compuesto aniónico es un ácido nucleico.

30 Preferentemente, dicho ácido nucleico se selecciona de: oligonucleótidos, ARN (ARNip, ARNdc, ARNcs, ARNhc, ARNmi, ARNr, ARNnh, ARNm, ARNt, ARNnp, pre-ARNm, ARN catalítico y ARN antisentido) y ADN (ADNc, ADNmt, ADNcs, ADNdc, ADN antisentido y ADN plasmídico).

35 El Solicitante ha observado que dicho complejo es capaz de formar partículas nanométricas con un diámetro medio (Z) de entre 1 y 200 nm, preferentemente de entre 20 y 100 nm, y más preferentemente de entre 30 y 50 nm.

Según una forma de realización preferida, dicho complejo comprende una cantidad de dicho compuesto aniónico de entre 5% y 60% en peso respecto al peso de dicho polímero catiónico a base de glucógeno.

40 Preferentemente, dicho complejo comprende una cantidad de dicho compuesto aniónico de entre 10% y 50% en peso respecto al peso de dicho polímero catiónico a base de glucógeno.

Más preferentemente, dicho complejo comprende una cantidad de dicho compuesto aniónico de entre 10% y 30% en peso respecto al peso de dicho polímero catiónico a base de glucógeno.

45 El complejo entre un polímero catiónico a base de glucógeno y un compuesto aniónico puede prepararse ventajosamente como una composición farmacéutica.

50 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un complejo entre un polímero catiónico basado en el glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que dicho polímero catiónico basado en el glucógeno comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (a) y (b), indicados anteriormente.

55 En una forma de realización preferida, dicho compuesto aniónico es un ácido nucleico.

El término "excipiente" se refiere a cualquier agente conocido de la técnica que resulta adecuado para preparar una forma farmacéutica.

60 Son ejemplos de excipientes que resultan adecuados según la presente invención: conservantes, estabilizadores, tensioactivos, sales reguladoras de la presión osmótica, emulsionantes, edulcorantes, saborizantes, pigmentos y similares.

65 Dicha composición farmacéutica puede prepararse en forma de administración unitaria según métodos conocidos en la técnica.

Preferentemente, dicha composición farmacéutica es para la utilización inyectable, tal como, por ejemplo, una

solución acuosa, suspensión o emulsión, o puede encontrarse en forma de unos polvos aptos para reconstituirse para la preparación de una solución acuosa, suspensión o emulsión para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o intraperitoneal.

5 Alternativamente, dicha composición farmacéutica puede, por ejemplo, encontrarse en forma de una tableta, una cápsula, comprimidos recubiertos, gránulos, soluciones y jarabes para la administración oral; apósitos medicados, soluciones, pastas, cremas o pomadas para la administración transdérmica; supositorios para la administración rectal; una solución estéril para la administración mediante aerosol, para la administración inmediata y sostenida.

10 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un complejo entre un polímero catiónico a base de glucógeno y un compuesto aniónico seleccionado de un principio activo y un ácido nucleico, por administrar o transferir dicho compuesto aniónico a una diana farmacológica específica, por ejemplo un órgano, un tejido o una célula, en la que dicho polímero catiónico a base de glucógeno comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (a) y (b), descritos anteriormente.

15 Según dicha forma de realización, dicho compuesto aniónico es un principio activo o un ácido nucleico. Ventajosamente, dicha diana farmacológica es una célula.

20 En una forma de realización preferida, el polímero catiónico a base de glucógeno según la presente invención puede conjugarse, directamente o mediante un espaciador, con un grupo director que es capaz de unirse de una manera altamente específica sobre la superficie celular y que es capaz de facilitar la absorción del complejo en una célula específica (por ejemplo, células tumorales, células hepáticas, células hematopoyéticas y similares).

25 El grupo director puede utilizarse además para dirigir el polímero catiónico a un compartimento celular (por ejemplo, el núcleo, las mitocondrias y similares).

Los grupos directores pueden seleccionarse, por ejemplo, de ácido fólico, monosacáridos, oligosacáridos, péptidos, proteínas y oligómeros de ácido hialurónico.

30 Los ejemplos a continuación pretenden ser ilustrativos de la presente invención sin ser, sin embargo, limitativos en modo alguno.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Preparación de polímeros catiónicos a base de glucógeno que comprenden la unidad (a)

(i) Síntesis de polímeros catiónicos a base de glucógeno que comprenden grupos que contienen nitrógeno

40 Se disolvieron 10 g de glucógeno Polglumyt™ (61.73 mmoles de glucosa) en 124 ml de NaOH 1 N (para la síntesis de los productos 1-7, 9-11 y 13-15) o NaOH 2 N (para la síntesis de los productos 8, 12 y 16) en un matraz de fondo redondo de dos cuellos provisto de un agitador magnético y un condensador de reflujo. Una vez se había completado la disolución, la mezcla se calentó a 70°C y se agitó durante 2 horas.

45 Dependiendo del producto deseado, se añadió uno de los reactivos (I) a (VI) siguientes, en las cantidades (expresadas como mmoles de reactivo) de las que se informa en la tabla 1:

- 50 (I) hidrocloreto de 2-cloro-N,N-dietiltilamina,
- (II) hidrocloreto de 3-cloro-N,N-dimetilpropilamina,
- (III) hidrocloreto de 2-cloro-N,N-dimetiltilamina,
- (IV) solución de cloruro de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamonio al 60% en peso en H₂O,
- (V) 1-(2-cloroetil)piperidina, y
- 55 (VI) 4-(2-cloroetil)morfolina.

La mezcla se agitó a 70°C durante la noche.

60 Al día siguiente, se detuvo el calentamiento y se dejó que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente. A continuación, el producto de reacción en bruto se vertió lentamente en 400 ml de acetona. Tras completar la adición, la suspensión obtenida se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Tras detener la agitación, se dejó que la mezcla sedimentase hasta la separación del sobrenadante y se obtuvo el precipitado.

65 Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó dos veces con acetona (200 ml). El sólido obtenido de esta manera se separó mediante filtración, se disolvió en 200 ml de agua destilada, se llevó a pH neutro con solución de HCl 1 N y finalmente se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada hasta que la conductividad era constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μS). La solución obtenida se

filtró a través de un filtro de 0.45 μm , se concentró bajo vacío y finalmente se liofilizó.

Los rendimientos sintéticos se reúnen en la tabla 1, a continuación.

5 Tabla 1

Clase	Polímero n°	Reactivo	mmoles de reactivo	Rendimiento (% p/p)
Dietilaminoetil (DEAE) glucógeno	1	(I)	2.65	82
	2	(I)	15.43	80
	3	(I)	30.87	80
	4	(I)	61.73	82
Dimetilaminopropil (DMAP) glucógeno	5	(II)	15.43	82
	6	(II)	30.87	83
	7	(II)	61.73	80
	8	(II)	123.46	82
Dimetilaminoetil (DMAE) glucógeno	9	(III)	15.43	81
	10	(III)	30.87	80
	11	(III)	61.73	83
	12	(III)	123.46	80
2-Hidroxipropiltrimetilamonio (2-OH-PTMA) glucógeno (no según la invención)	13	(IV)	15.43	83
	14	(IV)	30.87	84
	15	(IV)	61.73	82
	16	(IV)	123.46	84
Derivado heterocíclico del glucógeno	40	(V)	30.87	83
	41	(VI)	30.87	80

Mediante el método descrito, se prepararon los polímeros catiónicos 1-16 y 40-41 con las estructuras ilustradas en la tabla 2, a continuación.

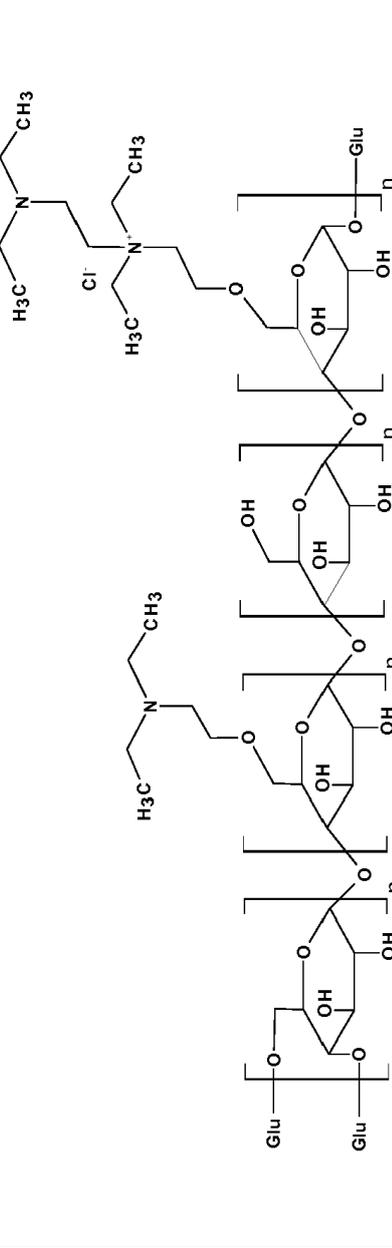
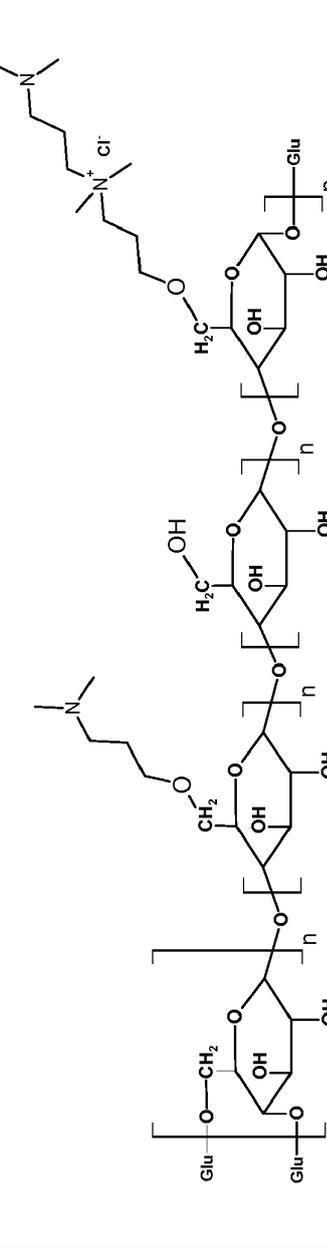
10

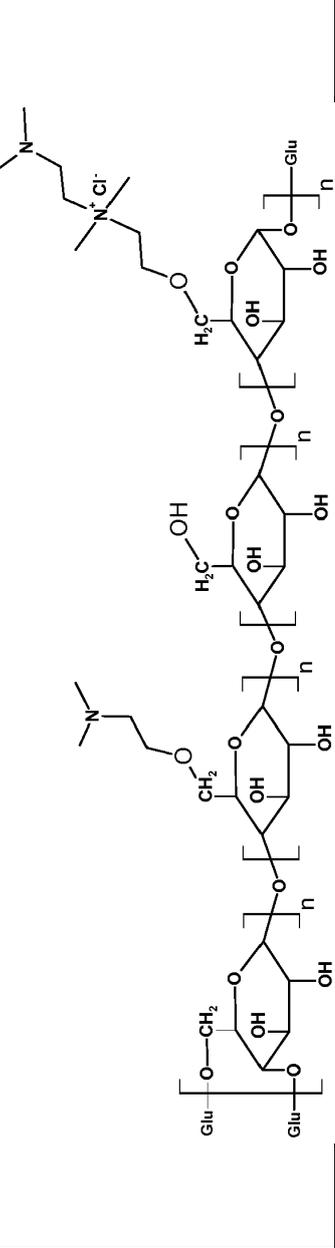
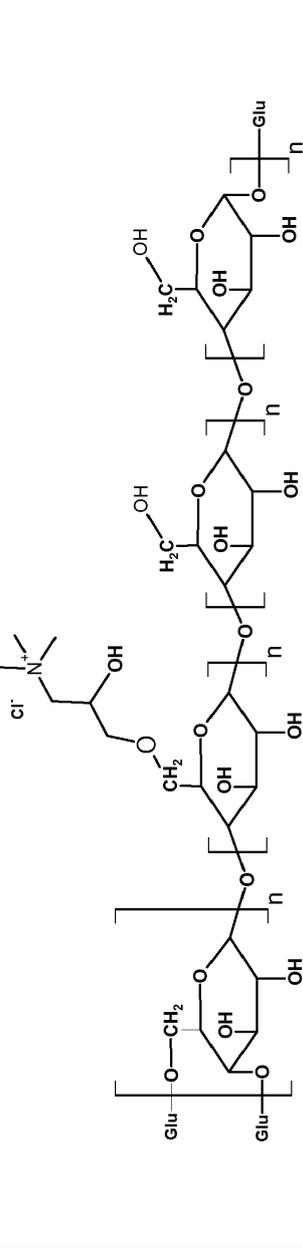
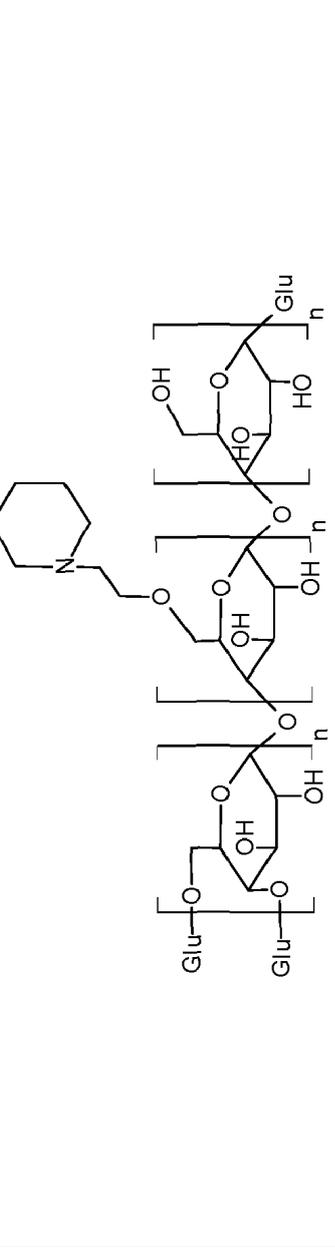
En las estructuras representadas, la abreviatura "Glu" indica que la cadena de polímero puede continuar con unidades repetitivas de glucosa no modificada o con unidades repetitivas según la presente invención. Además, para facilitar la visualización, las ramas no se representan y los sustituyentes se representan únicamente en posición 6 y en unidades repetitivas diferentes.

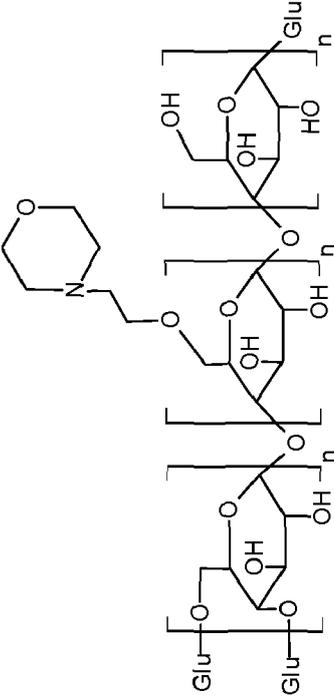
15

El experto en la materia apreciará fácilmente que la misma unidad repetitiva puede comprender uno a tres sustituyentes, que pueden ser idénticos o diferentes, y que estos sustituyentes pueden encontrarse independientemente presentes en las posiciones 2, 3 y/o 6.

Tabla 2

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	RMN ¹ H
(DEAE) Glucógeno		1	δ ppm: 1.45-1.75 (CH ₃ multiplete), 3.2-4.6 (multiplete), 5.2-6.1 (multiplete)
		2	
		3	
		4	δ ppm: 1.25-1.75 (CH ₃ multiplete), 2.8-4.6 (multiplete), 5.2-6.1 (multiplete)
(DMAP) Glucógeno		5	δ ppm: 2.2-4.5 (multiplete), 5.2-6.1 (multiplete H anómérico)
		7	
		6	
		8	δ ppm: 2.2-4.4 (multiplete), 5.2-6.1 (multiplete H anómérico)
(DMAE) Glucógeno		9	δ ppm: 2.5-4.6 (multiplete), 5.2-6.2 (multiplete H
		10	
		11	

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	RMN ¹ H anómérico
		12	
(2-OH-PTMA) Glucógeno (no según la invención)		13 14 15	δ ppm: 3.45-4.5 (multiplete), 5.25-6.1 (multiplete H anómérico)
Derivado heterocíclico del glucógeno		16 40	δ ppm 1.65-2.35 (multiplete), 2.6-3.15 (multiplete), 3.55-4.45 (multiplete), 5.2-6.15 (multiplete H anómérico)

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	RMN ¹ H
		41	<p> δ ppm 2.8-3.1 (multiplete), 3.6-4.45 (multiplete), 5.2-6.1 (multiplete H anomérico) </p>

(ii) Síntesis de polímeros catiónicos a base de glucógeno que comprenden grupos que contienen nitrógeno y grupos carboximetilo

5 Se sintetizó glucógeno Polglumyt™ que contenía por lo menos un grupo carboximetilo (glucógeno-CM) tal como se indica a continuación.

10 Se introdujeron 9.57 g (59.07 mmoles de glucosa) de glucógeno Polglumyt™ anhidro, seco previamente en un horno a 60°C bajo vacío hasta peso constante, en un matraz de fondo redondo de dos cuellos con un agitador magnético y bajo una corriente de nitrógeno, y se disolvieron en 200 ml de dimetilsulfóxido anhidro. Tras completar la disolución, se añadió hidruro sódico en las cantidades informadas en la tabla 3 y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió cloroacetato sódico en las cantidades informadas en la tabla 3 y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

15 Al día siguiente, la mezcla se vertió lentamente en acetona (800 ml) y la suspensión obtenida se agitó durante aproximadamente 30 minutos. El sólido obtenido se separó mediante filtración, se lavó dos veces con acetona (400 ml), se separó nuevamente mediante filtración y se disolvió en agua destilada (200 ml). La solución obtenida se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada, hasta conductividad constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μ S). La solución obtenida se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m, se concentró bajo vacío y finalmente se liofilizó.

20 El grado de derivatización (GD), entendido como el número de moléculas de glucosa derivadas con un grupo carboximetilo por cada 100 monómeros de glucosa, se determinó mediante espectroscopía de IR, mediante la generación de una curva de calibración con mezclas que contenían un título conocido de glucógeno Polglumyt™ y acetato sódico.

25

Tabla 3

Glucógeno-CM	mmoles de NaH	mmoles de ClCH ₂ COONa	Rendimiento (% p/p)	GD
100	5.91	6.50	83	1
101	11.82	13.00	80	14
102	17.72	19.49	78	22
103	23.63	25.99	75	32
104	29.54	32.49	74	39

30 El glucógeno-CM obtenido de esta manera se utilizó en las síntesis siguientes, con el fin de obtener polímeros catiónicos que comprenden grupos de nitrógeno.

Se sintetizaron en particular glucógeno-CM que comprendían grupos dietilaminoetil (DEAE-glucógeno-CM) y 2-hidroxipropiltrimetilaminio (2-OH-PTMA-glucógeno-CM).

35 DEAE-glucógeno-CM

Se disolvió 1 g de producto 103 en 10.8 ml de NaOH 1 N en un matraz de fondo redondo de dos cuellos dotado de un agitador magnético y un condensador de reflujo y se calentó a 70°C durante 2 horas.

40 Se añadieron 0.929 g de hidrocloreuro de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (5.4 mmoles) y la mezcla se agitó durante la noche a 70°C.

45 Al día siguiente, se detuvo el calentamiento y se dejó que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente. A continuación, el producto de reacción en bruto se vertió lentamente en 100 ml de acetona. Al final de la edición, la suspensión obtenida se agitó durante 30 minutos.

50 El sólido obtenido se separó mediante filtración, se lavó dos veces con acetona (100 ml), se disolvió en 500 ml de agua destilada, se llevó a un pH de 6.5-7 con ácido clorhídrico 1 N y finalmente se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada hasta conductividad constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μ S). La solución obtenida se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m, se concentró bajo vacío y finalmente se liofilizó.

2-OH-PTMA-glucógeno-CM

55 Se disolvieron 2,5 g de producto 103 en 27 ml de NaOH 1 N en un matraz de fondo redondo de dos cuellos dotado de un agitador magnético y un condensador de reflujo y se calentó a 70°C durante 2 horas.

A continuación, se añadió una solución de cloruro de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamonio (al 60% en peso en H₂O, 8,1 mmoles) y la mezcla se agitó a 70°C durante la noche.

Al día siguiente, se detuvo el calentamiento y se dejó que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente. A continuación, el producto de reacción en bruto se vertió lentamente en 80 ml de acetona.

5 El sólido obtenido se separó mediante filtración, se lavó dos veces con acetona (80 ml), se disolvió en 50 ml de agua destilada y se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada hasta conductividad constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μ S). La solución obtenida se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m, se concentró bajo vacío y finalmente se liofilizó.

10 Los polímeros catiónicos 17 y 19 obtenidos mediante los métodos indicados se muestran en la tabla 4, a continuación.

15 Con el fin de facilitar la visualización, no se muestran las ramas y los sustituyentes se muestran únicamente en la posición 6 y en diferentes unidades repetitivas. En las estructuras mostradas, la abreviatura "Glu" indica que la cadena de polímero puede continuar con unidades repetitivas de glucosa no modificada o con unidades repetitivas según la presente invención.

20 El experto en la materia apreciará fácilmente que la misma unidad repetitiva puede comprender entre uno y tres sustituyentes, que pueden ser idénticos o diferentes, y que estos sustituyentes pueden encontrarse presentes independientemente en las posiciones 2, 3 y/o 6 de la misma unidad repetitiva.

Tabla 4

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	RMN ¹ H
DEAE-glucógeno-CM		17	<p>δ ppm: 1.25-1.75 (multiplete), 3-4.65 (multiplete), 5.5-6.15 (multiplete H anomérico)</p>
2-OH-PTMA-glucógeno-CM		19	<p>δ ppm: 3.4-4.65 (multiplete), 5.25-6.20 (multiplete H anomérico)</p>

Ejemplo 2Preparación de polímeros catiónicos a base de glucógeno que comprenden la unidad (b)

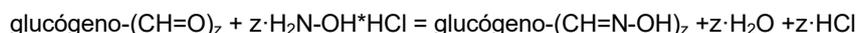
5 Se oxidó glucógeno Polglumyt™ con peryodato potásico según el método siguiente.

Se disolvieron 20 g de glucógeno Polglumyt™ (123.46 mmoles de glucosa) en 400 ml de agua destilada en una botella de vidrio oscuro. Se añadió peryodato potásico en las cantidades proporcionadas en la tabla 5 (expresadas en mmoles de reactivo) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

10 La reacción se detuvo mediante la adición de un exceso de etilenglicol (26 ml) con agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente.

15 La mezcla se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada, hasta conductividad constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μ S). A continuación, la mezcla se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m y se liofilizó.

20 A continuación, se determinó el grado de oxidación (% de monómeros de glucosa oxidados) mediante titulación con NaOH 1 N del ácido clorhídrico liberado por la reacción entre hidrocloreto de hidroxilamina y los grupos aldehído libres presentes en los diversos carbohidratos. La reacción se proporciona a continuación:



25 Se determinó el porcentaje de monómeros oxidados mediante la fórmula a continuación:

$$\text{DD} = \frac{V \times N \times 0.5}{W / 162} \times 100$$

en la que:

30 V = ml de NaOH;
N = normalidad de NaOH;
W = mg de muestra anhidra;
162 = peso molecular de la unidad repetitiva de glucosa

35 Tabla 5

Glucógeno oxidado	mmoles de KIO ₄	rendimiento (% p/p)	GD
200	6.17	88	5
201	12.35	87	10
202	24.69	88	18

40 El glucógeno Polglumyt™ oxidado obtenido de esta manera se hizo reaccionar con uno de los reactivos (VII) a (X), posteriormente, en las cantidades (expresadas en mmoles de reactivo) proporcionadas en la tabla 6:

(VII) espermina (Fluka, n° de referencia 85590);
(VIII) tetraetilenpentamina (Fluka, n° de referencia 15652843);
(IX) solución de polietilenimina PM 1300 al 50% en peso en agua (Aldrich, n° de referencia 482595);
45 (X) solución de polietilenimina PM 2000 al 50% en peso en agua (Aldrich, 408700).

Los derivados se sintetizaron según el método general siguiente.

50 Se disolvieron 2 g de glucógeno Polglumyt™ oxidado en 200 ml de tampón borato a pH 8.5 en un matraz de fondo redondo de tres cuellos dotado de un agitador mecánico (modelo IKA Labor Technik). La amina se disolvió en 40 ml de tampón borato, se añadió lentamente al matraz de reacción y la mezcla se agitó mecánicamente a temperatura ambiente.

55 Tras 4 horas, se añadió borohidruro de sodio (473 mg, 12.5 mmoles) y la mezcla se agitó mecánicamente durante la noche a temperatura ambiente.

60 Al día siguiente, el producto de reacción en bruto se vertió lentamente en 400 ml de acetona y la suspensión obtenida se agitó durante 30 minutos. El sólido obtenido se separó mediante filtración, se lavó dos veces con acetona (400 ml), se separó nuevamente mediante filtración y se disolvió en agua destilada (100 ml). La solución se neutralizó con HCl 1 N y se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada, hasta conductividad constante (igual a aproximadamente 2 a 3 μ S). La solución obtenida se filtró a través

de un filtro de 0.45 μm y finalmente se liofilizó.

Tabla 6

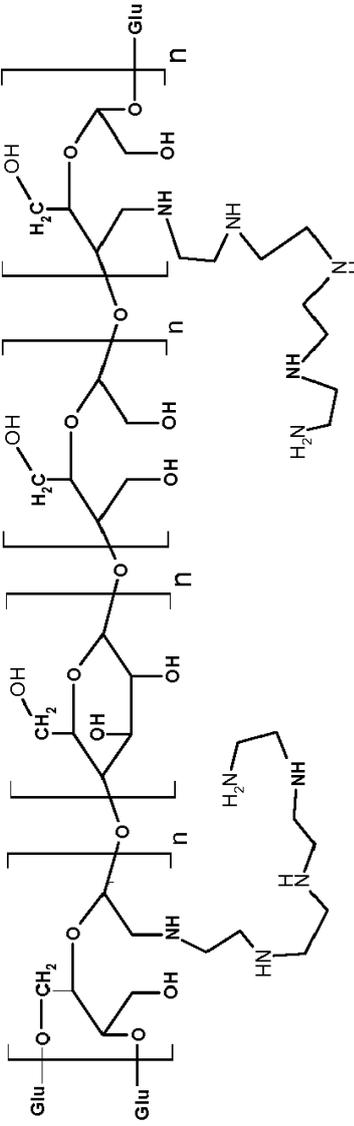
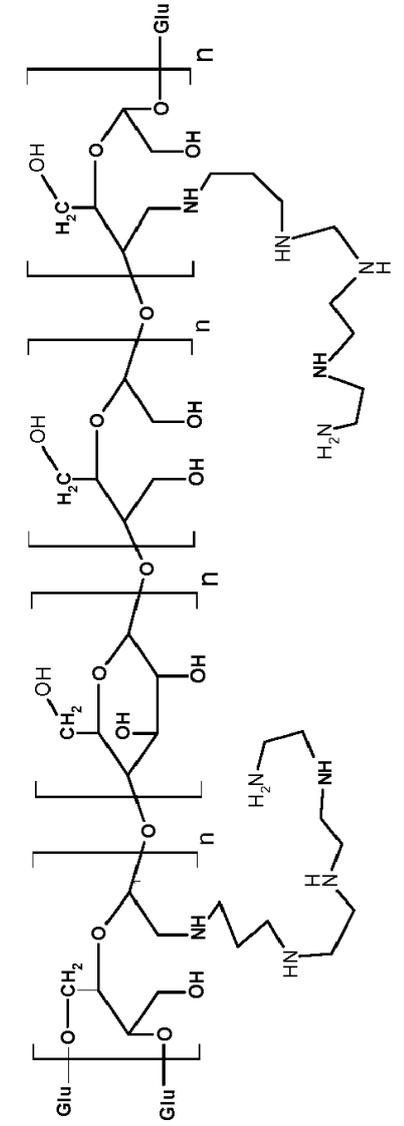
nº	Glucógeno oxidado inicial	Reactivo	mmoles de reactivo	rendimiento (% p/p)
20	200	VII	0.60	69
21	200	IX	0.48	84
22	200	X	0.31	70
23	201	VII	0.60	65
24	201	VIII	0.41	70
25	201	VIII	0.83	44
26	201	IX	0.48	83
27	201	X	0.31	87
28	202	VII	1.20	24
29	202	IX	0.48	95
30	202	IX	0.96	98

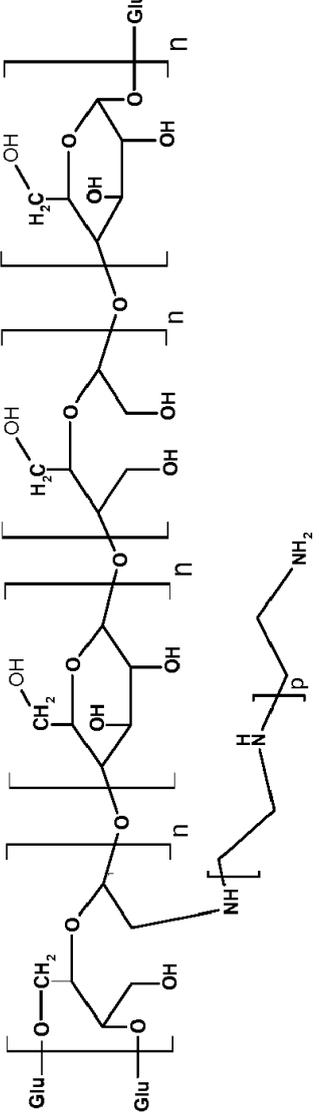
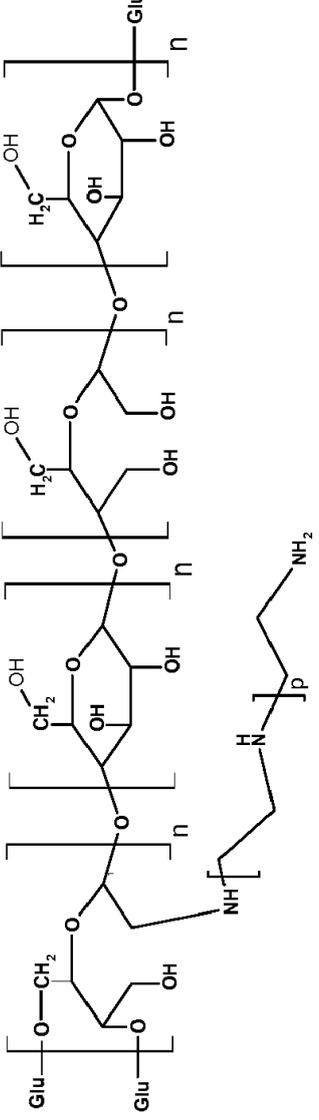
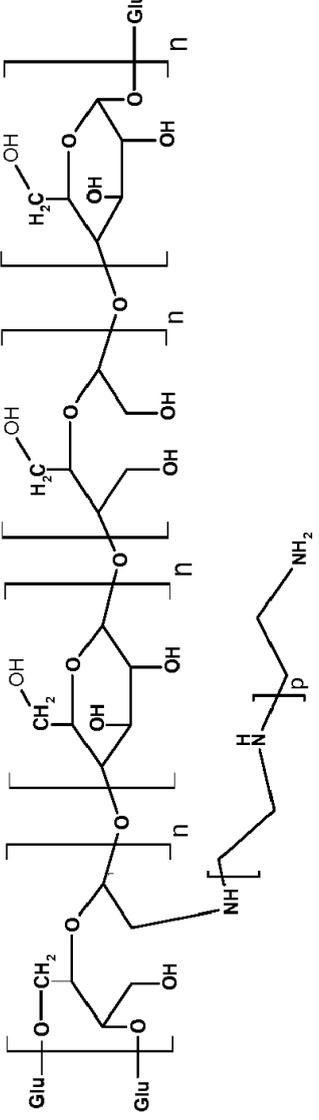
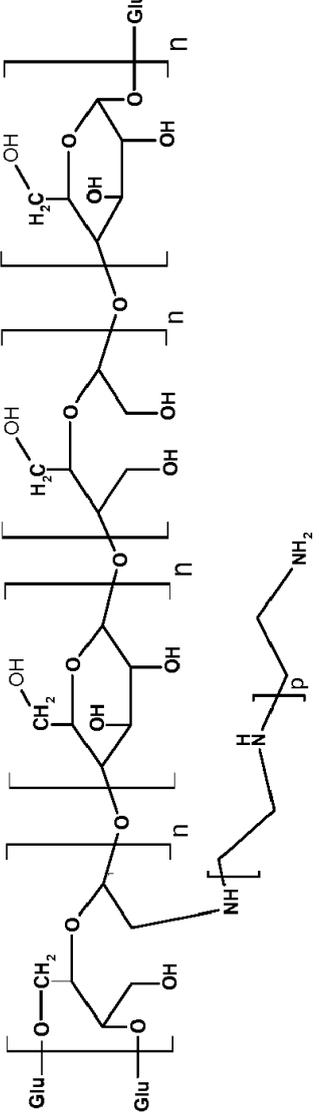
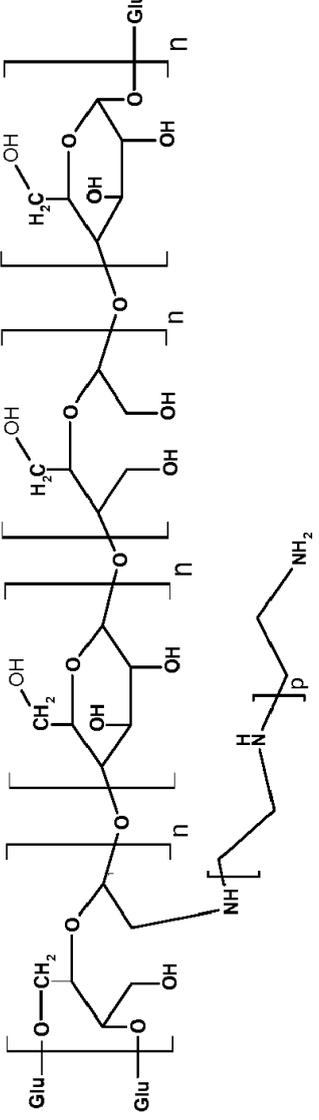
5

Los polímeros catiónicos 20 y 30 obtenidos mediante los métodos indicados se muestran en la tabla 7, a continuación. En las estructuras mostradas, la abreviatura "Glu" indica que la cadena de polímero puede continuar con unidades repetitivas de glucosa no modificada o con unidades repetitivas según la presente invención. Con el fin de facilitar la visualización, no se muestran las ramas y los sustituyentes se muestran en diferentes unidades repetitivas.

10

Tabla 7

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	IR
Glucógeno oxidado		24	3293 (M), 2926 (W), 1638 (W), 1409 (W), 1359 (W), 1240 (W), 1148 (M), 1078 (M), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
Glucógeno oxidado		25	3308 (M), 2924 (W), 1639 (W), 1411 (W), 1358 (W), 1243 (W), 1149 (M), 1078 (S), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
Glucógeno oxidado		20	3306 (M), 2925 (W), 1639 (W), 1411 (W), 1361 (W), 1241 (W), 1148 (M), 1078 (S), 995 (VS), 927 (M), 847 (M), 757 (M)
Glucógeno oxidado		23	3293 (M), 2926 (W), 1638 (W), 1412 (W), 1359 (W), 1241 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 929 (M), 848 (M), 759 (M)
Glucógeno oxidado		28	3292 (M), 2928 (W), 1639 (W), 1415 (W), 1355 (W), 1243 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 929 (M), 848 (M), 758 (M)
Glucógeno oxidado		21	3228 (M), 2924 (W), 1640 (M), 1412 (W), 1361 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1015 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)

Clase	Fórmula estructural	Polímero nº	IR
		26	3298 (M), 2925 (W), 1638 (W), 1411 (W), 1359 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		22	3292 (M), 2921 (W), 1643 (W), 1411 (W), 1360 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 998 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		27	3299 (M), 2924 (W), 1635 (W), 1412 (W), 1358 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 847 (M), 759 (M)
		29	3289 (W), 2924 (W), 2840 (W), 1635 (W), 1411 (W), 1336 (W), 1147 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 848 (M), 758 (M)
		30	3276 (M), 2924 (W), 2843 (W), 1634 (W), 1453 (W), 1333 (M), 1146 (M), 1079 (S), 1019 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 848 (M), 758 (M)

Ejemplo 3

Determinación del grado de derivatización (GD) de polímeros catiónicos que contienen unidades repetitivas de tipo (a)

El grado de derivatización, respecto al número de grupos que contienen nitrógeno presente en los polímeros que contienen unidades repetitivas (a), se calculó mediante transformación de los grupos amina en el hidrocloreto correspondiente y mediante la determinación de la cantidad de iones halógeno presentes en los grupos amina o en los grupos de amonio cuaternario.

Se aplicó el mismo procedimiento a hidrocloreto de DEAE-dextrano (producto comercial hidrocloreto de DEAE-dextrano, Sigma, nº de referencia D9885), utilizado como producto comparativo.

Se determinó la cantidad de iones halógeno en el peso seco del polímero, obtenida mediante sustracción del contenido de agua determinado mediante el método de Karl Fischer.

Se disolvió 1 g de derivado amina en 10 ml de agua destilada. Tras completar la disolución se añadieron 10 ml de ácido clorhídrico 1 N y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Tras completar la agitación, la mezcla se vertió en acetona (100 ml). Se separó el sólido obtenido mediante filtración, se lavó dos veces con acetona (100 ml) y se secó en un horno a 60°C bajo vacío.

La cantidad de iones halógeno se expresa como un porcentaje en peso, es decir, como el peso de iones halógeno por cada 100 g de polímero catiónico.

Para la determinación, se consideró que cada átomo de nitrógeno se encontraba sustituido independientemente.

Se calculó el grado de derivatización según la ecuación proporcionada a continuación.

$$GD = \left[\frac{I.H. (\text{peso hidratado}) * 100 * PM (\text{monómero hidrocloreto})}{100 - \%H_2O} / 35.45 \right] / 3$$

GD = grado de derivatización

I.H. = gramos de iones de halógeno por cada 100 g de muestra hidratada

PM = peso molecular del monómero sustituido con un único grupo de hidrocloreto de alquilamina

35.45 = peso molecular del cloro

Los resultados obtenidos se proporcionan en la tabla 8, a continuación, en la que los compuestos 13 a 16 no son según la invención.

Tabla 8

Polímero nº	GD
1	1
2	6
3	12
4	22
5	5
6	6
7	12
8	19
9	4
10	7
11	12
12	14
13	3
14	5
15	13
16	15
18(*)	20
(*) comparativo: DEAE-dextrano	

Se estudió la influencia del grado de derivatización y del grupo funcional como una función de dos parámetros operativos: (i) la tendencia a la agregación, que debe minimizarse, e (ii) la capacidad de carga, que debe maximizarse.

Ejemplo 4Mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS)

5 Los estudios de dispersión de luz dinámica se utilizaron para estudiar la tendencia a la agregación de los polímeros catiónicos.

10 Se llevaron a cabo estudios de dispersión de luz dinámica tal como se menciona a continuación en polímeros catiónicos a base de glucógeno Polglumyt™, preparados tal como se indica en el ejemplo 1, y en los complejos respectivos con un ARNip (Invitrogen, referencia de proveedor nº 1299001), preparados en diversas proporciones en porcentaje en peso de ARNip/polímero.

15 Para los estudios de dispersión de luz, se prepararon las soluciones siguientes:

- Solución 1: solución madre de ARNip 0.1 mg/ml en PBS libre de ARNasa;
- Solución 2: solución madre de diversos polímeros catiónicos a una concentración de 0.2 mg/ml, en PBS libre de ARNasa filtrada a través de filtros estériles de 0.22 µm;
- Solución 3: solución de PBS libre de ARNasa filtrada a través de filtros de 0.22 µm.

25 La abreviatura PBS (solución salina tamponada con fosfato) representa una solución salina tamponada con fosfato estándar a pH 7.4 que comprende una solución salina acuosa de cloruro sódico (8 g/l), fosfato sódico (1.78 g/l), cloruro potásico (0.2 g/l) y fosfato potásico (0.27 g/l).

30 Las muestras que se analizaron se obtuvieron mediante la mezcla de las soluciones 1, 2 y 3 de acuerdo con las proporciones proporcionadas en la tabla 9. A continuación, las muestras se trataron durante 30 segundos mediante agitación y se dejaron en reposo durante 30 minutos, dos veces. Tras un tratamiento posterior mediante agitación durante 30 segundos y reposo durante 1 hora, las muestras se analizaron con un DLS Zetasizer Nano Malvern, procurando tratar las soluciones mediante agitación durante 5 minutos antes del análisis.

35 Las mediciones se realizaron utilizando un láser de helio-neón ($\lambda = 632.8$ nm) a 25°C y a un ángulo de dispersión de 173°. Los resultados se procesaron utilizando el software Zetasizer.

Tabla 9

ARNip (mg/ml)	Polímero (mg/ml)	Composición		
		ml de solución 1	ml de solución 2	ml de solución 3
-	0.1	-	0.5	0.5
0.050	0.1	0.5	0.5	-
0.03	0.1	0.3	0.5	0.2
0.02	0.1	0.2	0.5	0.3
0.015	0.1	0.15	0.5	0.35
0.010	0.1	0.10	0.5	0.4
0.005	0.1	0.05	0.5	0.45

40 El estudio permitió determinar los parámetros siguientes:

1. el diámetro medio (Z) de los derivados catiónicos de glucógeno Polglumyt™ libre de ARNip (los resultados se reúnen en la tabla 10);
2. la relación de dimensiones de las nanopartículas (los resultados se reúnen en la tabla 10), y
3. la proporción en porcentaje de altura máxima de ARNip respecto al peso de polímero para el que no se observa ningún fenómeno de agregación (los resultados se reúnen en la tabla 10, en la que los compuestos 13 a 16 no son según la invención).

Tabla 10

Polímero nº	(1) Diámetro medio (Z) (nm)	(2) Relación de dimensiones	(3) Proporción (%) de ARNip/polímero (p/p) sin formación de agregados
1	37	1.2	10
2	37	0.8	50
3	38	0.9	15

Polímero nº	(1) Diámetro medio (Z) (nm)	(2) Relación de dimensiones	(3) Proporción (%) de ARNip/polímero (p/p) sin formación de agregados
4	41	0.8	20
5	35	0.9	50
6	36	0.8	10
7	38	0.9	10
8	38	0.9	15
9	35	1.1	50
10	36	0.8	50
11	37	0.8	50
12	40	0.9	15
13	36	0.8	50
14	37	0.9	50
15	41	0.8	10
16	41	0.9	15
17	35	1.0	50
18(*)	76	4.5	20
(*) comparativo: DEAE-dextrano (1) Diámetro medio (Z)			

Tal como puede observarse a partir de la tabla 10, todos los derivados presentan un diámetro medio (Z) inferior a 100 nm.

- 5 Ventajosamente, y en contraste con DEAE-dextrano, los derivados catiónicos según la invención forman nanopartículas con un diámetro medio (Z) inferior a 70 nm.

(2) Relación de dimensiones

- 10 La relación de dimensiones es la anchura a la mitad de la altura del pico de distribución de tamaños de partícula normalizado respecto al diámetro medio y, de esta manera, describe la forma del pico de distribución de tamaños.

15 Tal como puede apreciarse, todos los polímeros catiónicos según la invención presentaban distribuciones de tamaños con una relación de dimensiones de entre 0.8 y 1.1, en contraste con DEAE-dextrano, que mostraba una distribución de tamaños con una relación de dimensiones igual a 4.5.

20 Lo anterior indica que, mediante la utilización del mismo método sintético, los polímeros catiónicos a base de glucógeno según la presente invención permiten obtener nanopartículas de tamaños controlados dentro de un intervalo de tamaños próximo al valor medio.

(3) Proporción en porcentaje en peso máxima de ARNip/polímero para la que no se observa agregación.

25 Los resultados muestran que los polímeros catiónicos que comprenden todos los sustituyentes según la presente invención formaron complejos libres de agregados de hasta 50% en peso de ARNip, como función del grado de derivatización.

El polímero 18 (DEAE-dextrano) formó complejos libres de agregados únicamente hasta 20% en peso de ARNip.

Ejemplo 5

30 Determinación de la capacidad de carga

35 Se determinó la capacidad de carga para una serie de derivados que contenían las unidades repetitivas (a) y (b) mediante electroforesis en gel.

Se prepararon los complejos siguiendo el método siguiente.

40 Los complejos entre ARNip y los diversos derivados poliméricos se prepararon utilizando diversas proporciones de ARNip/polímero (% en peso).

45 Se mezclaron soluciones de polímero a diversas concentraciones, indicadas en las tablas 11 y 12, en PBS libre de ARNasa filtrada a través de un filtro de 0.2 μm , con una solución de ARNip (Invitrogen, nº de referencia 1299001) a 0.340 mg/ml en agua libre de ARNasa. A continuación, las mezclas se trataron mediante agitación durante aproximadamente 30 segundos, se dejaron en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente, se trataron nuevamente mediante agitación durante 30 segundos y, después de dejar en reposo durante aproximadamente 30 minutos, se sometieron a electroforesis en gel.

Los geles se revelaron mediante la carga de 10 µl de solución de cada complejo en un gel de agarosa al 4% que contenía una proporción 1:200,000 de tinción de ácidos nucleicos Green gel Plus™ 20000X preparada en tampón de MOPS-EDTA-acetato sódico.

5 Los geles de agarosa se revelaron durante una hora a un voltaje constante de 80V. Las imágenes se obtuvieron mediante el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

10 Los geles obtenidos se muestran en las figuras 1 a 8.

Los complejos entre polímero 3 (DEAE-glucógeno) y ARNip se prepararon utilizando las soluciones de polímero y ARNip, con las cantidades proporcionadas en la tabla 11, posteriormente. Se cargó polímero 3 con 0.5% a 800% en peso de ARNip.

15 Los geles en los que se sembraron los complejos entre polímero 3 y ARNip y que posteriormente se revelaron mediante electroforesis se muestran en las figuras indicadas en la tabla 11.

Tabla 11

mg/ml de polímero	mg/ml de ARNip	% de ARNip (p/p)	Figura
20	0.1	0.5	1
10	0.1	1	1
5	0.1	2	1
2.5	0.1	4	1
1.25	0.1	8	1
1	0.1	10	2
0.66	0.1	15	2
0.5	0.1	20	2
0.333	0.1	30	3
0.2	0.1	50	3
0.1	0.1	100	3
0.05	0.1	200	3
0.025	0.1	400	3
0.0125	0.1	800	3

20 Como comparativo se utilizó glucógeno Polglymyt™ no modificado (50*):

Polímero	mg/ml de polímero	mg/ml de ARNip	% de ARNip (p/p)	Figura
50 (*)	1	0.1	10	2
	0.0125	0.1	800	2

25 En la figura 1 puede observarse que, en las columnas de polímero 3 que forman complejo con ARNip a un porcentaje de 0.5% a 8% en peso, la banda blanca correspondiente a ARNip solo no se encuentra presente. La ausencia de la banda indica que el polímero 3 era capaz de formar complejo completamente con ARNip de 0.5% a 8% en peso respecto al peso de polímero.

30 En la figura 2, la ausencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de polímero 3 que forman complejo con ARNip indican que el polímero 3 era capaz de formar complejo completamente con ARNip en un porcentaje de 10% a 20% en peso respecto al peso del polímero. La presencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de polímero 50 (glucógeno Polglumyt™ no modificado) indican que el glucógeno Polglumyt™ no modificado era incapaz de formar complejo con ARNip incluso a un porcentaje igual a 10% en peso respecto al peso del polímero.

35 En la figura 3, la ausencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de polímero 3 en complejo con 30% de ARNip indican que el polímero 3 era capaz de formar complejo completamente con 30% en peso de ARNip respecto al peso total del polímero. En contraste, la presencia de una banda correspondiente a ARNip a porcentajes de 50% a 800% indicaba que el polímero 3 era incapaz de formar complejo con 50% en peso de ARNip, respecto al peso total del polímero.

40 De esta manera, estos estudios demuestran que la capacidad de carga máxima de polímero 3 era de 30% en peso de ARNip. En contraste, el glucógeno Polglumyt™ no modificado (polímero 50) era incapaz de formar complejo con ARNip.

45 Además, se prepararon complejos de polímero-ARNip utilizando los polímeros siguientes:

- nº 1, 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, que comprendían la unidad repetitiva (a);
- nº 20, 21, 23, 24, 25, 28, que comprendían la unidad repetitiva (b);

5 Se utilizaron dos porcentajes de carga de ARNip: 5% y 20% respecto al peso del polímero. Las soluciones utilizadas se reúnen en la tabla 12, a continuación, en la que los compuestos 14 y 16 no son según la invención.

Tabla 12

Polímero	mg/ml de polímero	mg/ml de ARNip	Figura
1	2	0.1	4
	0.5	0.1	4
2	2	0.1	4
	0.5	0.1	4
6	2	0.1	4
	0.5	0.1	4
8	2	0.1	6
	0.5	0.1	6
10	2	0.1	5
	0.5	0.1	5
12	2	0.1	6
	0.5	0.1	6
14	2	0.1	5
	0.5	0.1	5
16	2	0.1	6
	0.5	0.1	6
20	2	0.1	8
	0.5	0.1	8
21	2	0.1	7
	0.5	0.1	7
23	2	0.1	8
	0.5	0.1	8
24	2	0.1	7
	0.5	0.1	7
25	2	0.1	7
	0.5	0.1	7
28	2	0.1	8
	0.5	0.1	8

10 En la figura 4, la presencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de polímero 1 en complejo, respectivamente, con 5% y 20% en peso de ARNip indicaba que el polímero 1 (DEAE-Polglumyt con un grado bajo de polimerización) era incapaz de formar complejo con ARNip. El polímero 2 era capaz de formar complejo con ARNip en un porcentaje de 5% en peso respecto al peso total del polímero, y el polímero 6 asimismo era capaz de formar complejo con 20% en peso de ARNip respecto al peso total del polímero.

15 En la figura 5, la presencia de la banda correspondiente al ARNip en las columnas de los polímeros 10 y 14 que forman complejo con 20% en peso de ARNip indica que estos polímeros son capaces de formar complejo con 5% en peso de ARNip. En contraste, el polímero 15 era capaz de formar complejo con 20% en peso de ARNip.

20 En la figura 6, la ausencia de la banda correspondiente a ARNip indica que los polímeros 8, 12 y 16 son capaces de formar complejo con 20% en peso de ARNip.

25 En la figura 7, la presencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de los polímeros 24 y 25 indica que estos polímeros son incapaces de formar complejo con 5% de ARNip. En contraste, el polímero 21 asimismo forma complejo con 20% de ARNip.

30 En la figura 8, la presencia de la banda correspondiente a ARNip en las columnas de polímeros 23 y 20 que forman complejo con 20% de ARNip indica que estos polímeros formaron complejo con 5% de ARNip. En contraste, el polímero 28 formó complejo con 20% de ARNip.

En general, de esta manera, los estudios permitieron demostrar que sólo los polímeros 1 (DEAE-glucógeno con el grado más bajo de derivatización), 24 y 25 eran capaces de formar complejo con menos de 5% en peso de ARNip.

35 Todas las demás alternativas eran capaces de formar complejo con 20% de ARNip, como el polímero comparativo 18 (DEAE-dextrano). En contraste, el polímero 50 (glucógeno Polglumyt™ no modificado) era incapaz de formar

complejos con ARNip.

Ejemplo 6

5 Estudios de citotoxicidad con derivados catiónicos de glucógeno Polglumyt™

Los estudios de citotoxicidad se llevaron a cabo con (DEAE)-glucógeno (polímeros 1 a 4), (DMAP)-glucógeno (polímeros 5 a 8), (DMAE)-glucógeno (polímeros 9 a 12), (2-OH-PTMA)-glucógeno (polímeros 13 a 16 no de la invención), con glucógeno Polglumyt™ no modificado (polímero 50), con hidrocloreto de DEAE-dextrano (polímero 18) y con otro polímero de referencia que ha sido ampliamente estudiado para el suministro de ácidos nucleicos, la polietiliminina (PEI) ramificada (Aldrich, nº de referencia 40872-7) (polímero 60).

(a) Estudios con polímeros catiónicos según la invención

15 • Preparación de los polímeros catiónicos

Los polímeros catiónicos se disolvieron en agua y se diluyeron apropiadamente en el medio de cultivo celular para obtener concentraciones finales de 10 a 10^{-5} (mg/ml, utilizados para evaluar tras 24, 48 y 72 horas la citotoxicidad de dos estirpes celulares: MonoMac-6 y HT29.

20 • Estirpe celular MonoMac-6

La estirpe celular de monocitos/macrófagos humanos MonoMac-6 fue donada por el Prof. Mantovani (Humanitas, Italia).

25 Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂, en medio RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino (FCS) al 10%, L-glutamina al 2%, 1% de una solución de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato sódico 100 mM y 1% de ácido oxalacético.

30 Las células, que crecen en suspensión, se mantuvieron en cultivo mediante pases realizados a una tasa semana, mediante diluciones 1:4 del cultivo celular en un medio completo fresco nuevo.

• Estirpe celular HT-29

35 Se mantuvieron células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, EE.UU.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM rico en glucosa, pH 7.4) complementado con suero de feto bovino (FCS) al 10%, 2% de L-glutamina, 1% de una solución de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato sódico 100 mM y 2% de una solución de HEPES 1 M.

40 Las células, que crecen por adherencia, se mantuvieron en cultivo mediante la realización de pases a una tasa semana, sembrando 300,000 células por matraz, antes del tratamiento con tripsina/EDTA para desprender las células de la monocapa.

45 • Ensayo de citotoxicidad

Las células Mono Mac-6 y HT-29 sembradas en placas de 96 pocillos (10,000 células/pocillo) 24 horas antes del experimento se incubaron con los derivados catiónicos a diversas concentraciones durante 24, 48 y 72 horas.

50 Al final del tratamiento con los compuestos de ensayo, se determinó la viabilidad celular como una función de la producción de adenosín trifosfato (ATP) utilizando el kit ATPlite (Perkin-Elmer).

El ensayo ATPlite se basa en la producción de la luminiscencia producida tras la reacción de ATP, presente en las células, con luciferasa y d-luciferina añadida a los pocillos antes de la lectura. La intensidad de la luminiscencia producida es directamente proporcional a la concentración de ATP presente en la muestra y se mide utilizando un luminómetro (VICTOR-3 Wallac).

60 Antes de llevar a cabo la medición con luminómetro, se añadieron a cada pocillo 50 µl de solución de lisis (Triton X-100, al 0.5% en NaOH 0.2 N) en 100 µl de medio de cultivo. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente y bajo agitación a 700 rpm, se añadieron 50 µl del kit ATPlite a cada pocillo y, tras agitar durante 5 minutos, la placa se incubó durante 10 minutos adicionales en la oscuridad, antes de llevar a cabo la medición de luminiscencia.

65 Para cada derivado, se llevaron a cabo los experimentos por duplicado.

El porcentaje de viabilidad celular se determinó considerando la media de los valores de luminiscencia para las

células tratadas y la de las células de control no tratadas.

El porcentaje de viabilidad celular (VC, %) para cada derivado se expresa como el porcentaje medio respecto al control, según la ecuación a continuación:

5

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Intensidad media de luminiscencia células tratadas}}{\text{Intensidad media de luminiscencia células no tratadas}} \times 100$$

Un compuesto se considera citotóxico en el caso de que el porcentaje de viabilidad es inferior a 50%.

10 Tabla 13. Concentración de polímeros catiónicos: 0.01 mg/ml

Polímero nº	estirpe celular MonoMac-6 (en suspensión)			estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)			VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	111	97	114	115	78	143
2	112	61	136	136	107	136
3	115	208	65	96	131	160
4	108	217	60	86	118	140
5	100	176	56	113	107	165
6	109	132	124	111	138	158
7	104	80	105	317	92	95
8	-	-	-	103	61	92
9	111	143	129	101	120	156
10	110	144	80	103	143	162
11	125	110	129	323	101	97
12	-	-	-	127	72	86
13	135	121	136	301	95	90
14	108	71	81	305	92	91
15	126	115	161	227	92	68
16	-	-	-	131	83	79
17	107	137	134	106	123	131
18(*)	97	74	109	97	73	105
50(*)	105	105	120	97	128	158
60(*)	-	-	-	93	114	52

(*) polímeros utilizados para la comparación:
 18 = DEAE-dextrano;
 50 = glucógeno Polglumyt™ no modificado;
 60 = polietilenimina (PEI).

Los resultados en la tabla 13 permiten demostrar que los polímeros catiónicos según la presente invención no son citotóxicos a una concentración de 0.01 mg/ml.

15

Tabla 14. Concentración de polímeros catiónicos: 0.1 mg/ml

Polímero nº	estirpe celular MonoMac-6 (en suspensión)			estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)			VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	108	86	61	101	96	132
2	105	152	167	116	110	169
3	107	182	100	102	127	140
4	105	165	66	104	122	131
5	107	182	87	85	147	152
6	102	151	107	102	110	147
7	99	54	95	342	81	102
8	-	-	-	114	149	92
9	109	182	128	106	118	168
10	111	152	82	95	156	150
11	107	82	142	367	105	110
12	-	-	-	131	91	92
13	121	123	121	346	92	104
14	106	81	123	381	114	114
15	125	109	149	326	113	98

Polímero nº	estirpe celular MonoMac-6 (en suspensión)			estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)			VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
16	-	-	-	131	159	150
17	110	124	138	109	120	152
18(*)	<u>10</u>	<u>24</u>	<u>16</u>	60	<u>41</u>	<u>45</u>
50(*)	105	167	108	97	125	158
60(*)	-	-	-	7	6	3

(*) polímeros utilizados para la comparación:
 18 = DEAE-dextrano;
 50 = glucógeno Polglumyt™ no modificado;
 60 = PEI.

Los resultados en la tabla 14 permiten demostrar que los polímeros catiónicos según la presente invención no son citotóxicos a una concentración de 0.01 mg/ml, al contrario que DEAE-dextrano y PEI.

5 Tabla 15. Concentración de polímeros catiónicos: 1.0 mg/ml

Polímero nº	estirpe celular MonoMac-6 (en suspensión)			estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)			VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	91	70	76	89	133	109
2	117	118	153	95	121	145
3	88	115	32	112	126	133
4	55	81	50	84	115	108
5	88	175	45	79	127	159
6	102	132	89	103	130	149
7	<u>41</u>	<u>16</u>	<u>12</u>	280	82	84
8	-	-	-	74	113	86
9	115	132	103	99	127	163
10	99	136	55	131	143	155
11	113	78	136	371	110	111
12	-	-	-	108	169	135
13	97	169	63	329	111	99
14	107	75	131	373	104	112
15	140	101	105	333	110	100
16	-	-	-	107	165	125
17	98	138	138	95	134	128
18(*)	13	14	12	49	29	18
50(*)	98	158	69	98	115	157
60(*)	-	-	-	3	6	2

(*) polímeros utilizados para la comparación:
 18 = DEAE-dextrano;
 50 = glucógeno Polglumyt™ no modificado;
 60 = PEI.

Los resultados en la tabla 15 permiten demostrar que los polímeros catiónicos según la presente invención, con la excepción del polímero 7, no son citotóxicos a una concentración de 1 mg/ml, al contrario que DEAE-dextrano y PEI. El derivado 7 demostró ser citotóxico únicamente en el cultivo celular en suspensión.

10

Tabla 16. Concentración de polímeros catiónicos: 10.0 mg/ml

Polímero nº	estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
1	112	156	164
2	97	130	177
3	78	104	128
4	63	82	71
5	106	130	174
6	101	132	170
7	277	76	83
8	43	77	56

Polímero nº	estirpe celular HT29 (adherente)		
	VC (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
9	104	135	165
10	52	120	172
11	362	116	108
12	93	166	115
13	379	116	113
14	361	123	108
15	308	110	92
16	79	146	95
17	97	129	176
18(*)	49	27	28
50(*)	89	135	151
60(*)	2	2	1

(*) polímeros utilizados para la comparación:
 18 = DEAE-dextrano;
 50 = glucógeno Polglumyt™ no modificado;
 60 = PEI.

Los resultados en la tabla 16 permiten demostrar que los polímeros catiónicos según la presente invención no son citotóxicos a una concentración de 10 mg/ml, al contrario que DEAE-dextrano y PEI.

5 (b) Estudios sobre derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos según la presente invención.

Los estudios de citotoxicidad asimismo se llevaron a cabo utilizando derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos según la presente invención, para los fines de determinar la concentración no citotóxica más alta a la que se llevan a cabo los estudios de incorporación celular.

10 Los derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos según la presente invención se sintetizaron de la manera siguiente.

15 Se disolvieron 500 mg de los polímeros catiónicos según la presente invención, en ausencia de luz, en 10 ml de agua destilada en un matraz de fondo redondo de dos cuellos dotado de un agitador magnético. Se añadieron 2 ml de NaOH 1 N y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. A continuación, se añadieron 36 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC) disueltos en aproximadamente 0,3 ml de DMSO. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

20 Al día siguiente, se vertieron 20 ml de acetona en el matraz de reacción y, tras agitar durante aproximadamente 30 minutos, se dejó que el polímero se depositase. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con aproximadamente 20 ml de acetona.

25 A continuación, se disolvió el precipitado en aproximadamente 10 ml de agua destilada y la solución se sometió a diálisis en tubos de celulosa regenerada (corte 15,000) frente a agua destilada, en ausencia de luz. Tras completar la diálisis, la solución se filtró a través de un filtro de 0.45 µm y se liofilizó.

Estos estudios se llevaron a cabo con células adherentes HT29, preparadas tal como se ha indicado anteriormente.

30 Los resultados se reúnen en la tabla 17, a continuación, en la que los derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos según la presente invención se indican mediante la misma numeración que en la tabla 2, con la adición de una "f".

35 Tabla 17

nº	Conc. 0.01 mg/ml			Conc. 0.1 mg/ml			Conc. 1 mg/ml			Conc. 10 mg/ml		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1f	119	142	115	111	116	125	106	108	131	97	116	125
2f	102	159	133	101	112	83	100	115	119	77	100	89
3f	92	123	102	71	84	107	75	90	105	53	74	61
4f	69	86	94	79	59	78	56	31	71	36	32	34
5f	114	100	133	98	94	134	107	106	116	105	78	106
6f	105	90	118	101	154	91	98	92	116	98	72	75
7f	94	128	114	102	120	112	73	72	88	59	52	40
8f	103	61	92	114	149	92	74	113	86	43	77	56

nº	Conc. 0.01 mg/ml			Conc. 0.1 mg/ml			Conc. 1 mg/ml			Conc. 10 mg/ml		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
9f	92	67	69	89	83	37	72	71	36	77	57	33
10f	95	151	114	93	119	82	94	120	75	56	79	35
11f	111	105	147	100	90	144	75	75	123	81	50	94
12f	127	72	86	131	91	92	108	169	135	93	166	115
13f	93	100	96	97	122	75	110	90	104	63	70	47
14f	102	94	103	102	119	137	103	78	156	74	65	101
15f	93	81	137	81	105	150	77	87	122	69	59	88
16f	131	83	79	131	159	150	107	165	125	79	146	95
18f(*)	15	10	11	20	7	13	17	12	6	20	8	10

(*) comparativo:
18f = derivado fluorescente de DEAE-dextrano

5 A partir de los resultados obtenidos, se observó que la concentración más alta a la que todos los derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos según la presente invención eran no citotóxicos, durante un periodo de 24 horas, era de 1 mg/ml. En contraste, el derivado fluorescente de DEAE-dextrano era altamente citotóxico a todas las concentraciones analizadas.

Ejemplo 7

Estudios de incorporación celular

10 Los estudios de incorporación celular se llevaron a cabo a las 2, 6 y 24 horas, utilizando los derivados fluorescentes de los polímeros catiónicos de la presente invención (1f-12f), de los polímeros 13 a 16 no de la invención (13f-16f) e hidrocloreuro de DEAE-dextrano, a una concentración de 1 mg/ml, es decir, la concentración más alta analizada en los estudios de citotoxicidad a la que los derivados fluorescentes 1f a 16f demostraron no ser citotóxicos durante un periodo de 24 horas.

Los estudios se llevaron a cabo utilizando células adherentes HT29, tratadas siguiendo el procedimiento siguiente.

20 Se incubaron células HT-29, sembradas en placa el día antes del experimento a una densidad de 20,000 células/pocillo, con los derivados fluorescentes respectivos a una concentración de 1 mg/ml durante 2, 6 y 24 horas. Al final de cada periodo de incubación, se extrajo el medio de los pocillos y las células se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7.4 estándar tres veces.

25 A continuación, las células se trataron con 200 µl de solución de lisis (Triton X-100 al 0.5% en NaOH 0.2 N) y se midió la fluorescencia mediante fluorimetría (λ exc.: 485 nm; λ em.: 535 nm).

Para cada compuesto y para cada vez, se calculó la fluorescencia media de dos réplicas, los valores de la cual se proporcionan en la tabla 18.

30 Tabla 18

Polímero nº	Intensidad de fluorescencia		
	2 horas	6 horas	24 horas
1f	1696	1372	744
2f	5567	6327	7217
3f	17531	24101	30573
4f	70210	63668	120662
5f	4845	4365	3274
6f	6842	8306	7651
7f	26268	36314	52612
8f	19638	34463	58024
9f	2386	2991	2487
10f	3122	4318	3177
11f	10866	12491	8906
12f	14020	21569	37090
13f	937	1736	1008
14f	4599	7724	4190
15f	13319	22623	30889
16f	23560	48650	56919
18f(*)	15227	13689	12626
control	833	1152	349

Se calculó la cantidad eficaz de incorporación celular para los derivados fluorescentes mediante la construcción de una curva de calibración para cada derivado fluorescente en el solvente de lisis celular (Triton X-100 al 0.5% en NaOH 0.2 N).

5 A partir de las curvas de calibración y de las intensidades de fluorescencia observadas, se calculó la cantidad en mg/ml de incorporación celular, tal como se indica en la tabla 19.

10 Tabla 19

Polímero nº	Concentración (mg/ml)		
	2 h	6 h	24 h
2f	0.006	0.006	0.007
3f	0.008	0.014	0.021
4f	0.019	0.017	0.036
5f	0.002	0.001	0.000
6f	0.002	0.003	0.002
7f	0.026	0.036	0.053
8f	0.005	0.012	0.024
11f	0.002	0.003	0.001
12f	0.004	0.008	0.016
14f	0.006	0.009	0.005
15f	0.004	0.014	0.022
16f	0.008	0.020	0.025
18f(*)	0.002	0.002	0.001
(*) DEAE-dextrano fluorescente			

Los resultados obtenidos mostraron el grado de incorporación celular de los polímeros catiónicos según la invención respecto a DEAE-dextrano.

15 Además, se observó que el grado de derivatización presentaba una influencia directamente proporcional sobre la incorporación celular.

Ejemplo 8

20 Evaluación de la capacidad tamponadora

Se evaluó la capacidad tamponadora para comprobar que los polímeros catiónicos según la presente invención presentarían características que les permitiesen inducir asimismo el efecto de “esponja de protones”, que se considera necesario para permitir la liberación del complejo de polímero-ácido nucleico respecto de los endosomas, tras la absorción celular.

Los polímeros catiónicos según la invención (DEAE-glucógeno) y DEAE-dextrano se titularon tras la transformación en el hidrocioruro (tal como se indica en el Ejemplo 2) con NaOH, monitorizando la titulación a partir de la variación del pH.

30 Se disolvieron 100 mg de hidrocioruro de polímero en 100 ml de agua destilada, agitando la solución durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se tituló la solución con NaOH 0.01 N, realizando la adición del titulante con un dosímetro y monitorizando la titulación con un pHímetro.

35 Los estudios de titulación, realizados con los derivados catiónicos según la presente invención, permitieron identificar una distribución de pK_a inferior y en aproximadamente el pH fisiológico en un intervalo de entre aproximadamente 4.5 y 8, que proporciona a los polímeros catiónicos de la invención una elevada capacidad tamponadora.

40 Los valores de pK_a a aproximadamente el pH fisiológico resultaron útiles para proporcionar a los polímeros catiónicos de la invención la carga positiva necesaria para la formación de complejos de los ácidos nucleicos.

Los valores de pK_a inferiores al pH fisiológico resultaron útiles para garantizar la liberación de complejos a partir de los endosomas al citoplasma (mediante el efecto de “esponja de protones”).

45 La figura 9 muestra las curvas de titulación para los polímeros catiónicos 2, 3 y 4 (DEAE-glucógeno, según la presente invención) con fines comparativos. Puede observarse que, dentro de la misma clase de derivados, la capacidad tamponadora se incrementa con el grado de derivatización.

Además, se observó que el polímero 4 (DEAE-glucógeno) y el producto 18 (DEAE-dextrano) presentaban un grado similar de derivatización y una capacidad tamponadora comparable, tal como se muestra en la figura 10.

Ejemplo 9

5

Mediciones reológicas

Se llevaron a cabo estudios reológicos con los derivados catiónicos 1 a 12 según la presente invención (DEAE-, DMAP-, DMAE-glucógeno), 13 a 16 no de la invención (2-OH-PTMA-glucógeno) y con hidrocloreto de DEAE-dextrano, a una concentración de 1% en PBS.

10

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un reómetro rotatorio Bohlin Gemini 150 pilotado por el software Bohlin R6 40.5.32, dotado de geometría de placa cónica 2°/55 mm, mantenido termostáticamente con un instrumento Peltier Bohlin a 25°C y operado en modo de "estrés controlado" en un intervalo de tensión de corte de 1 a 5 Pa.

15

Todas las muestras analizadas mostraban un valor de viscosidad muy bajo, del orden de mPa*s. Esta característica permitió utilizar los derivados catiónicos según la presente invención asimismo mediante inyección.

A título de ejemplo, la tabla 20 informa de los valores de viscosidad de los diversos derivados a un valor único de estrés (2.5 Pa).

20

Tabla 20

Polímero nº	Viscosidad a 2.5 Pa (Pa·s)
1	1.97×10^{-3}
2	1.91×10^{-3}
3	1.91×10^{-3}
4	1.95×10^{-3}
5	1.97×10^{-3}
6	1.95×10^{-3}
7	1.91×10^{-3}
8	1.96×10^{-3}
9	1.87×10^{-3}
10	1.96×10^{-3}
11	1.92×10^{-3}
12	1.91×10^{-3}
13	1.93×10^{-3}
14	1.94×10^{-3}
15	1.93×10^{-3}
16	1.98×10^{-3}
18(*)	2.36×10^{-3}
(*) comparativo: DEAE-dextrano	

25

Ejemplo 10

Estudios de citotoxicidad con derivados catiónicos de glucónico en complejo con moléculas aniónicas

Se sembraron en placa células HT-29 el día antes del experimento a una densidad de 10,000 células/pocillo en un volumen de 100 µl de medio DMEM que contenía 10% de suero.

30

El día del experimento, se extrajo el medio de los pocillos y se añadieron 150 µl de medio DMEM que contenía 2.5% de suero. A continuación, se añadieron 50 µl de complejos formados a partir de un polímero catiónico según la presente invención y ARNip fluorescente. Los complejos formados a partir de un polímero catiónico según la presente invención y ARNip fluorescente se prepararon según el procedimiento siguiente.

35

Se prepararon cuatro soluciones, cada una de las cuales contenía 6.283 mg de polímero catiónico 3, 7, 11 y 15 en 40 ml de PBS libre de ARNasa. A 142.86 µl de cada una de las soluciones se añadieron 6.6 µl de una solución de ARNip en PBS libre de ARNasa (concentración: 20 µM) y, tras unos cuantos minutos, se diluyó cada uno con 350.54 µl de PBS libre de ARNasa. La concentración final de ARNip en las soluciones era de 264 nM, equivalente a 10% en peso de ARNip respecto al peso del polímero.

40

Las soluciones obtenidas de esta manera se agitaron durante aproximadamente 30 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agitaron nuevamente durante 30 segundos y se dejaron en reposo durante 5 minutos. Antes de realizar el experimento, las soluciones se agitaron nuevamente durante 30 segundos.

45

Las soluciones (50 µl) de los polímeros catiónicos 3, 7, 11 y 15 en 40 ml de PBS libre de ARNasa, a la que no se añadió ARNip, se utilizaron como una primera comparación.

5 Como una segunda comparación se utilizó un complejo entre ARNip y el reactivo de transfección Lipofectamine® 2000, preparado siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante Life-technologies™ para la transfección de ARNip y que contenía la misma cantidad de ARNip utilizada en los complejos con los polímeros.

10 El reactivo de transfección Lipofectamine® 2000, al que no se añadió ARNip se utilizó como una tercera comparación.

Los complejos y todos los materiales comparativos preparados tal como se ha indicado anteriormente se pusieron en contacto con las células.

15 Las células se incubaron durante 4 y 24 horas a 37°C, después de las cuales se extrajo el sobrenadante y se añadieron 100 µl de medio que contenía 2.5% de suero.

20 Al final del tratamiento con los compuestos de ensayo, se determinó la viabilidad celular como una función de la producción de adenosín trifosfato (ATP), utilizando el kit ATPlite (Perkin-Elmer), tal como se indica para el ejemplo 6, anteriormente en la presente memoria.

Los resultados, determinados tal como se indica en el ejemplo 6, se expresan como un porcentaje de las células vivas, en la tabla 21, a continuación.

25 Tabla 21

Polímero nº	Viabilidad celular, VC (%)	
	4 h	24 h
3 + ARNip	58	100
7 + ARNip	89	85
11 + ARNip	91	70
15 (no según la invención) + ARNip	101	59
Primera comparación		
3	92	105
7	90	99
11	85	85
15 (no según la invención)	86	72
Segunda comparación		
Lipofectamine® 2000 + ARNip	130	110
Tercera comparación		
Lipofectamine® 2000	110	108

30 Los resultados obtenidos demostraron que los complejos obtenidos entre los polímeros catiónicos según la presente invención y el ARNip no son citotóxicos.

En consecuencia, se utilizaron los polímeros catiónicos 3, 7, 11 y 15 en el estudio de incorporación celular siguiente.

Ejemplo 11

35 Estudios de incorporación celular con derivados catiónicos de glucógeno en complejo con moléculas aniónicas fluorescentes

40 Los estudios se llevaron a cabo de una manera similar a la indicada en el ejemplo 7, anteriormente en la presente memoria, utilizando células adherentes HT29.

Se sembraron en placa células HT-29 el día antes del experimento a una densidad de 20,000 células/pocillo en un volumen de 100 µl de medio DMEM que contenía 10% de suero.

45 El día del experimento, se extrajo el medio de los pocillos y se añadieron 150 µl de medio DMEM que contenía 2.5% de suero. A continuación, se añadieron 50 µl de complejos formados a partir de un polímero catiónico según la presente invención y ARNip fluorescente.

50 Los complejos formados a partir de un polímero catiónico según la presente invención y ARNip fluorescente se prepararon según el procedimiento siguiente.

5 Se prepararon cuatro soluciones, cada una de las cuales contenía 6.2832 mg de polímero catiónico 3, 7, 11 y 15 en 40 ml de PBS libre de ARNasa. A 142.86 µl de cada una de las soluciones se añadieron 6.6 µl de una solución de ARNip en PBS libre de ARNasa (concentración: 20 µM) y, tras unos cuantos minutos, se diluyó cada uno con 350.54 µl de PBS libre de ARNasa. El ARNip se marcó con el compuesto fluorescente Alexa-488. La concentración final de ARNip era de 264 nM, equivalente a 10% en peso de ARNip respecto al peso del polímero.

10 Las soluciones obtenidas de esta manera se agitaron durante aproximadamente 30 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agitaron durante 30 segundos adicionales y se dejaron en reposo durante 5 minutos. Antes de llevar a cabo el experimento, las soluciones se agitaron nuevamente durante 30 segundos adicionales.

15 Como una primera comparación se utilizó un complejo entre ARNip y el reactivo de transfección Lipofectamine® 2000, preparado siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante Life-technologies™ para la transfección de ARNip y que contenía la misma cantidad de ARNip utilizada en los complejos con los polímeros.

La fluorescencia de ARNip solo se midió como una comparación posterior.

20 Los complejos y todos los materiales comparativos preparados tal como se ha indicado anteriormente se pusieron en contacto con las células.

Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C y, tras descartar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con 200 µl de PBS.

25 A continuación, las células se trataron con 200 µl de solución de lisis (Triton X-100 al 0.5% en NaOH 0.2 N) durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación.

30 La fluorescencia emitida por el ARNip marcado con Alexa-488 que se había incorporado, se midió mediante fluorímetro (λ exc.: 485 nm; λ em.: 535 nm), tras dejar en contacto con las células durante 4 horas los complejos entre los polímeros y el ARNip.

35 Para cada polímero, se llevó a cabo el experimento por triplicado y después se calculó la intensidad media de fluorescencia. A partir de dicho valor, se restó el valor medio de la intensidad de fluorescencia calculada para el medio de cultivo solo, que era igual a 1366, proporcionando la intensidad de fluorescencia final.

Se siguió el mismo procedimiento para la primera comparación (Lipofectamine® 2000 + ARNip) para la que el valor medio de intensidad de fluorescencia para el medio de cultivo solo era igual a 1328.

40 Se reúnen los resultados en la tabla 22.

Tabla 22

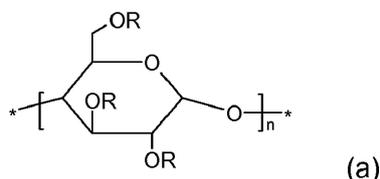
Polímero nº	Intensidad de fluorescencia				
	Registrado			Media	Final
3	2533	2504	2642	2560	1194
7	2721	2973	3066	2920	1554
11	1906	1801	1856	1854	489
15 (no según la invención)	2493	2927	2851	2757	1391
Lipofectamine® 2000 + ARNip	1811	1820	1845	1825	498
ARNip	1334	1351	1267	1317	-

45 Los resultados obtenidos demuestran que los polímeros catiónicos según la invención resultan aptos para inducir la incorporación de ARNip en la membrana celular. Además, los polímeros catiónicos según la invención permitieron incorporar una mayor cantidad de ARNip que el complejo utilizado como comparación que comprendía Lipofectamine® 2000.

REIVINDICACIONES

1. Polímero catiónico a base de glucógeno que comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a)

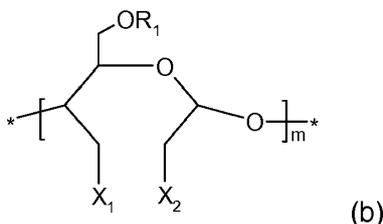


en el que

los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno; un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio}-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino}-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), azocilil-alquilo (C₁-C₆), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, y

n es un número entero superior o igual a 1; y

(b)



en el que

R₁ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil (C₁-C₆)]-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio}-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino}-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo;

X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -OH o un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en el que R₂ se selecciona de entre: átomo de hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), H-[NH-alquilo (C₁-C₆)]_p⁻, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos alquilo (C₁-C₄) pueden ser idénticos o diferentes; y

m es un número entero superior o igual a 1;

siempre que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂ y

con la condición de que dicho polímero catiónico a base de glucógeno sea diferente del producto obtenido mediante la reacción del glucógeno con cloruro de N-(3-cloro-2-hidroxipropil)-trimetil amonio.

2. Polímero catiónico a base de glucógeno según la reivindicación 1, en el que dichos grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: [N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquilo (C₁-C₃), {[N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquilo (C₁-C₃)-dialquil(C₁-C₃)amonio}-alquilo (C₁-C₃), {[N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquil(C₁-C₃)amino}-alquilo (C₁-C₃), [trialquil(C₁-C₃)amonio]-alquilo (C₁-C₃),

C₃), azociclil-alquilo (C₁-C₃), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₃), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con un grupo hidroxilo.

3. Polímero catiónico a base de glucógeno según la reivindicación 2, en el que dichos grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: N,N-dimetilamino-etilo, N,N-dimetilamino-propilo, N,N-dietilamino-etilo, [(N,N-dimetilaminoetil)dimetilamonio]etilo, [(N,N-dimetilamino-propil)-dimetilamonio]propilo, [(N,N-dietilaminoetil)diel-amonio]-etilo, [trimetilamonio]-2-hidroxi-propilo, piperidil-N-etilo o morfolinil-N-etilo.

4. Polímero catiónico a base de glucógeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: [N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquilo (C₁-C₃), {[N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquil(C₁-C₃)dialquil(C₁-C₃)amonio}-alquilo (C₁-C₃), {[N,N-dialquil(C₁-C₃)-amino]-alquil(C₁-C₃)amino}-alquilo (C₁-C₃) o [trialquil(C₁-C₃)amonio]-alquilo (C₁-C₃), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₃), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con un grupo hidroxilo.

5. Polímero catiónico a base de glucógeno según la reivindicación 4, en el que R₁ es un átomo de hidrógeno o un grupo carboximetilo.

6. Polímero catiónico a base de glucógeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en el que R₂ es un átomo de hidrógeno o H-[NH-alquilo (C₁-C₄)]_p⁻, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos alquilo (C₁-C₄) pueden ser idénticos o diferentes.

7. Polímero catiónico a base de glucógeno según la reivindicación 6, en el que dicho grupo H-[NH-alquilo (C₁-C₄)]_p⁻ es una polietilenimina, con un peso molecular desde 50 a 3.000 daltons, espermina (H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂), o espermidina (H₂N(CH₂)₄NH(CH₂)₄NH₂).

8. Polímero catiónico a base de glucógeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas unidades repetitivas (a) y (b) comprenden:

- por lo menos un grupo que contiene nitrógeno que es ionizable a pH fisiológico, seleccionado de entre el grupo que consiste en: NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino}-alquilo (C₁-C₆) y azociclil-alquilo (C₁-C₆); y
- por lo menos un grupo que contiene nitrógeno que es ionizable a un pH inferior al pH fisiológico, seleccionado de entre el grupo que consiste en: NH₂-{[alquil (C₁-C₃)]-dialquil(C₁-C₆)amonio}-alquilo (C₁-C₆) y {[N,N-dialquil(C₁-C₃)amino]-alquil (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio}-alquilo (C₁-C₆).

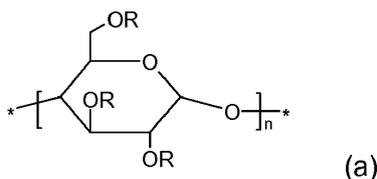
9. Complejo entre un polímero catiónico a base de glucógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un compuesto aniónico, en el que dicho compuesto aniónico se selecciona de entre el grupo que consiste en un principio activo y un ácido nucleico.

10. Complejo según la reivindicación 9, en el que dicho complejo comprende una cantidad de dicho compuesto aniónico entre 5% y 60% en peso respecto al peso de dicho polímero catiónico a base de glucógeno.

11. Complejo según la reivindicación 10, en el que dicho complejo comprende una cantidad de dicho compuesto aniónico entre 10% y 50% en peso respecto al peso de dicho polímero catiónico a base de glucógeno.

12. Composición farmacéutica que comprende (A) un complejo entre (1) un polímero catiónico a base de glucógeno que comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a)



en la que

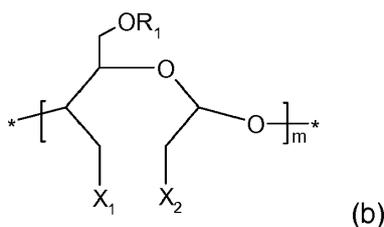
los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆)-dialquil (C₁-C₆)-amonio}-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil (C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil (C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino}-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), azociclil-alquilo (C₁-C₆), en la que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, y

5

10

n es un número entero superior o igual a 1; y

(b)



15

en la que

R₁ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio}-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino}-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), en la que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo;

20

25

X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -OH o un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en la que R₂ se selecciona de entre: átomo de hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), H-[NH-alquilo (C₁-C₆)]_p⁻, en la que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos alquilo (C₁-C₄) pueden ser idénticos o diferentes; y

30

m es un número entero superior o igual a 1;

siempre que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno tal como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂,

35

y (2) un compuesto aniónico, en la que dicho compuesto aniónico se selecciona de entre el grupo que consiste en un principio activo y un ácido nucleico;

y (B) por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40

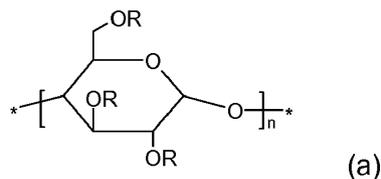
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que dicho compuesto aniónico es un ácido nucleico.

14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 12 y 13, para una utilización inyectable.

45

15. Complejo entre (1) un polímero catiónico a base de glucógeno que comprende por lo menos una unidad repetitiva seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a)



50

en el que

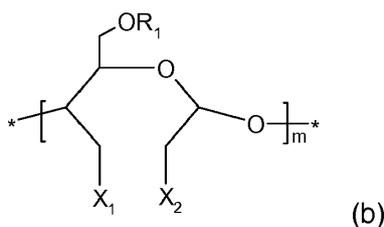
los grupos R, que pueden ser idénticos o diferentes, son un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)-amonio]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), azocicliil-alquilo (C₁-C₆), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, y

5

10

n es un número entero superior o igual a 1; y

(b)



15

en el que

R₁ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un grupo carboximetilo, opcionalmente en forma de sal con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable, o un grupo que contiene nitrógeno seleccionado de entre: NH₂-alquilo (C₁-C₆), [N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆)-dialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), NH₂-[alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), {[N,N-dialquil(C₁-C₆)amino]-alquil(C₁-C₆)amino]-alquilo (C₁-C₆), [trialquil(C₁-C₆)amonio]-alquilo (C₁-C₆), en el que las cadenas alquilo (C₁-C₆), que pueden ser idénticas o diferentes, se sustituyen opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo;

20

25

X₁ y X₂, que pueden ser idénticos o diferentes, son un grupo -OH o un grupo que contiene nitrógeno -NHR₂, en el que R₂ se selecciona de entre: átomo de hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), H-[NH-alquilo (C₁-C₆)]_p⁻, en el que p es un número entero superior o igual a 1 y los grupos alquilo (C₁-C₄) pueden ser idénticos o diferentes; y

30

m es un número entero superior o igual a 1;

siempre que por lo menos uno de entre R, R₁, X₁ y X₂ sea un grupo que contiene nitrógeno como se define, respectivamente, para cada uno de R, R₁, X₁ y X₂,

35

y (2) un compuesto aniónico, en el que dicho compuesto aniónico se selecciona de entre el grupo que consiste en un principio activo y un ácido nucleico,

para la utilización como un agente de suministro o transfección de dicho compuesto aniónico.

Fig. 1

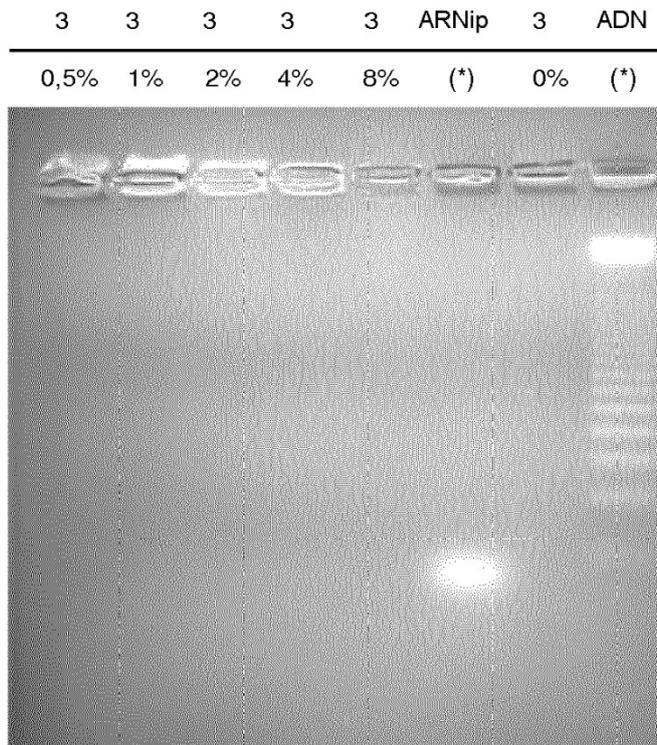


Fig. 2

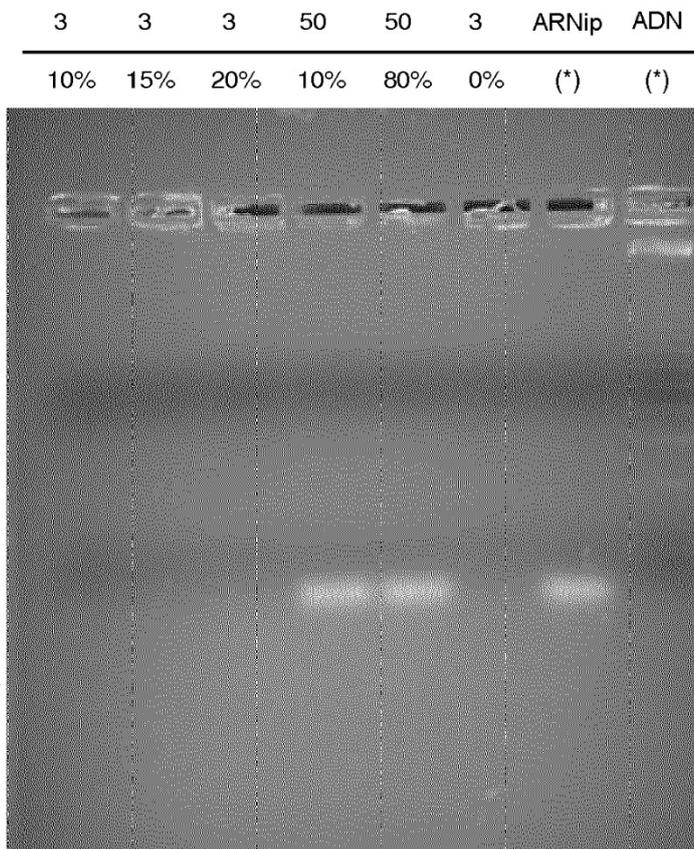


Fig. 3

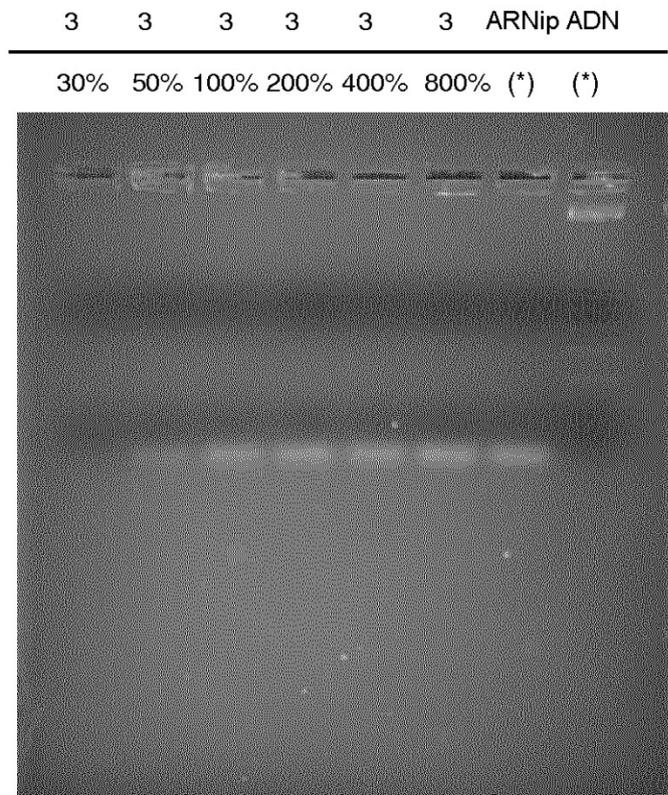


Fig. 4

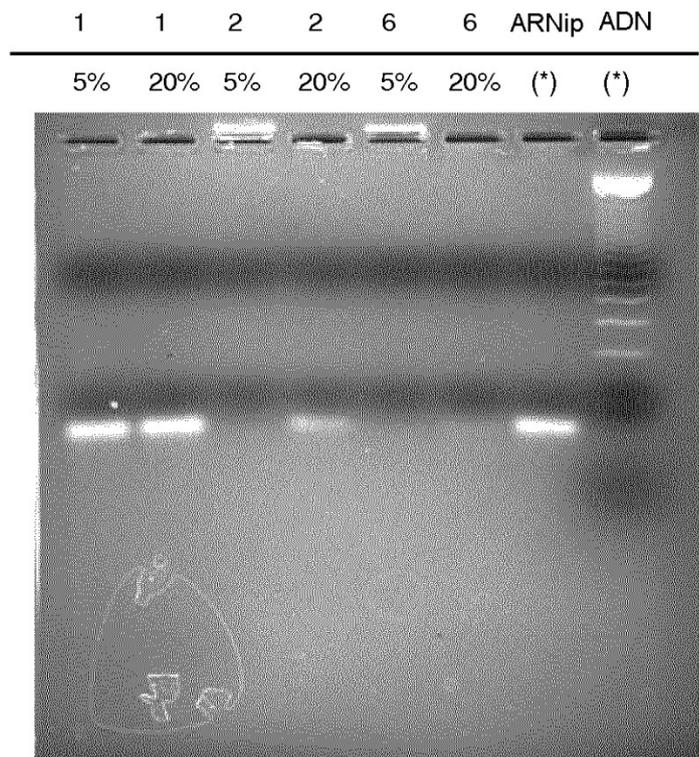


Fig. 5

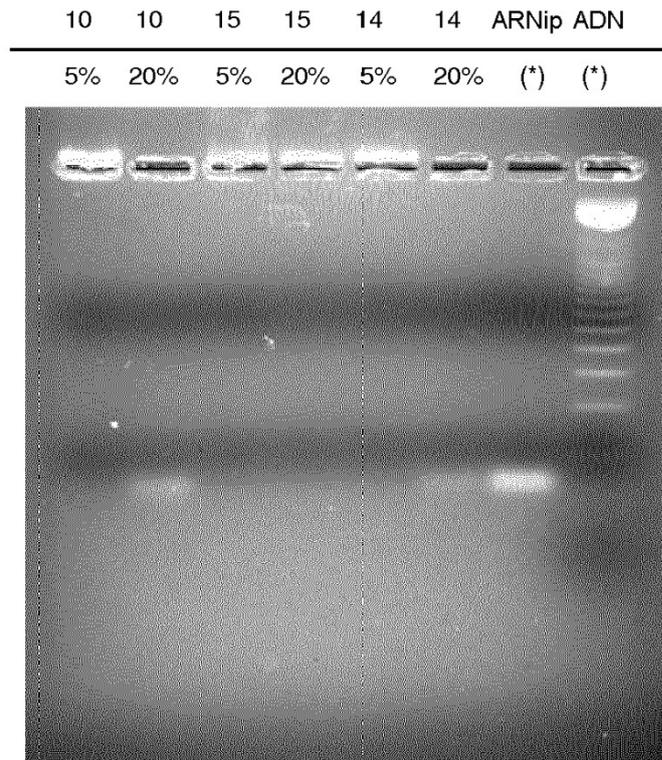


Fig. 6

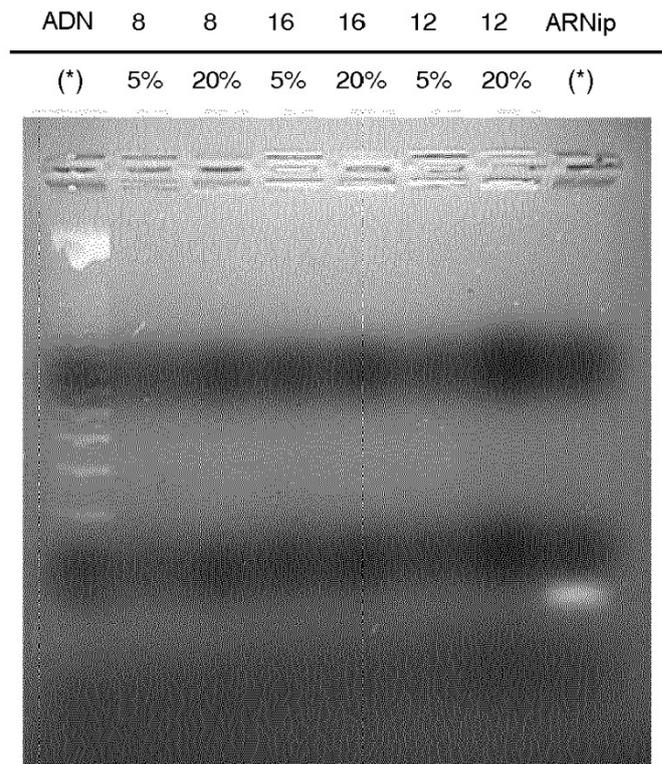


Fig. 7

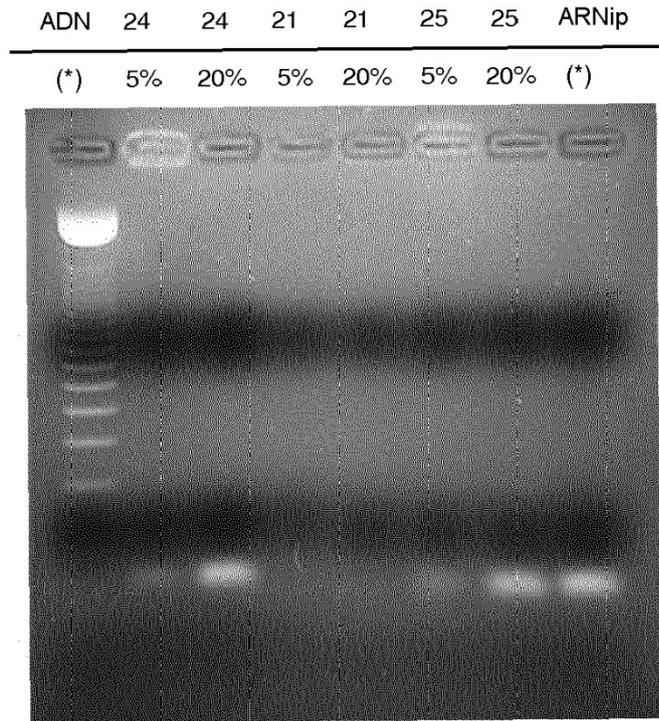


Fig. 8

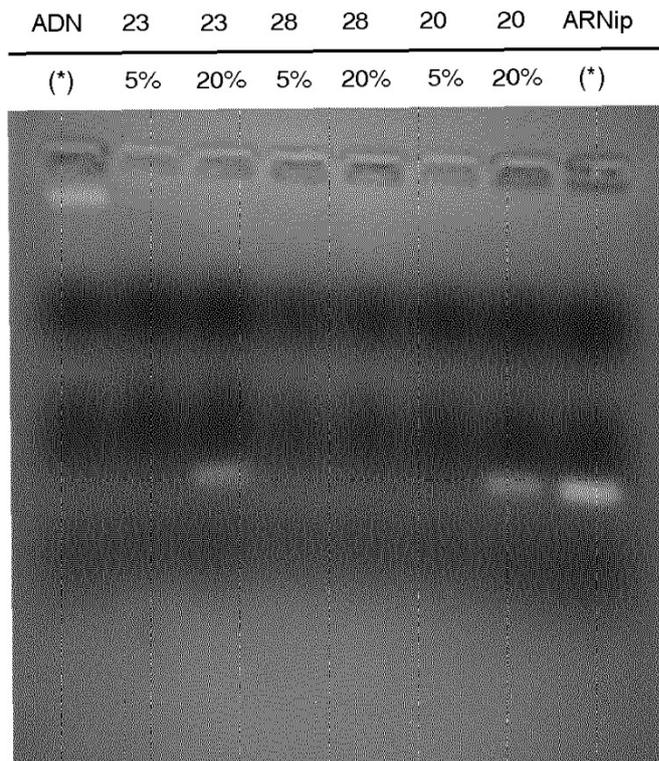


Fig. 9

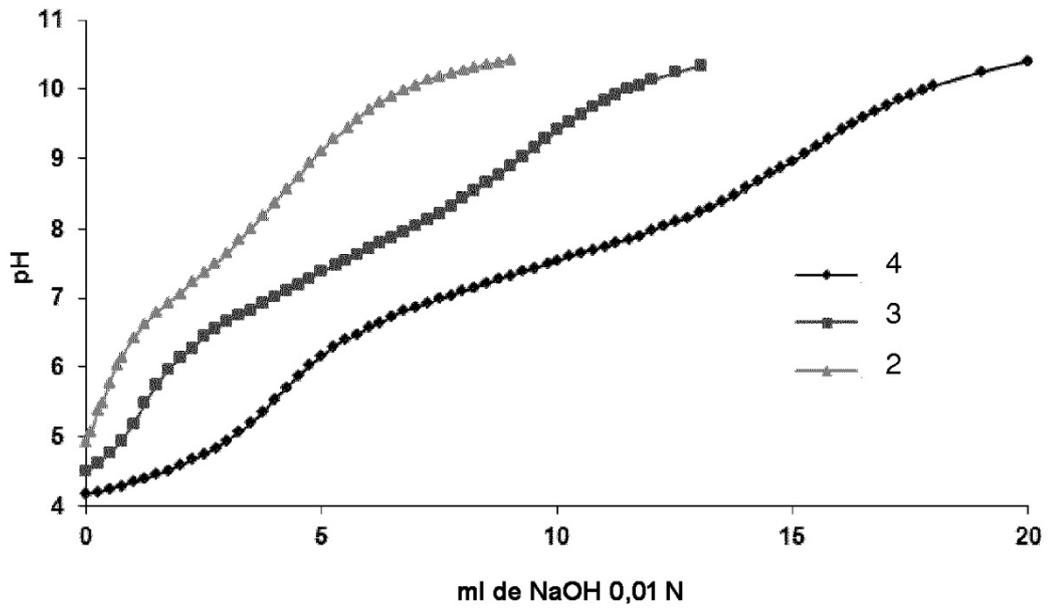


Fig. 10

