

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 827**

51 Int. Cl.:

C08G 73/00 (2006.01)
C08G 73/02 (2006.01)
C08L 79/00 (2006.01)
C08L 79/02 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2009** **PCT/EP2009/052530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009** **WO09112402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2009** **E 09720962 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2257587**

54 Título: **Polímero derivado de la polietilenimina lineal para la transferencia de genes**

30 Prioridad:

05.03.2008 FR 0851434

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR;
UNIVERSITE D'ORLEANS (33.3%) y
UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHERADAME, HERVÉ;
SASSATELLI, MATHIEU;
GUEGAN, PHILIPPE;
MIDOUX, PATRICK y
PICHON, CHANTAL**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 744 827 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

Polímero derivado de la polietilenimina lineal para la transferencia de genes.

- 5 La invención se refiere a las polietileniminas y a sus utilizaciones en la transferencia de genes para aplicaciones terapéuticas.

En estas aplicaciones, se busca corregir defectos genéticos en células diana. La transferencia de genes puede efectuarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En las operaciones efectuadas *in vitro* y *ex vivo*, se busca modificar el funcionamiento biológico de células dentro de un cultivo, mientras que la administración *in vivo* sobre un animal o un paciente propone actuar directamente sobre unos tejidos u órganos diana, con el fin de modificar las biosíntesis de proteína. El principal problema al que se enfrenta la técnica de transferencia de genes reside en la eficacia de la transferencia en los tejidos o células objetivo, con un alto nivel de expresión del gen deseado. La transferencia de genes se efectúa con la ayuda de complejos esencialmente constituidos por dos partes. Por un lado, el elemento activo es un ácido nucleico, un plásmido, un fragmento de ADN o de ARN. Por otro lado, puede también estar presente una protección, que puede también comprender funciones susceptibles de ayudar a la localización del complejo sobre las células o tejidos diana deseados. Se designa generalmente esta protección bajo el nombre de vector de transferencia de genes, para el cual se distinguen dos tipos principales, los vectores virales y los vectores sintéticos (o no virales). Es en esta última categoría en la que se sitúa la presente invención.

Los vectores no virales se subdividen a su vez en dos clases principales, lípidos catiónicos o vectores poliméricos. Sea cual sea el vector, se buscan unas formulaciones que sean cada vez más eficaces, con una toxicidad lo más reducida posible, con el fin de poder servir de base a un tratamiento terapéutico. Los polielectrolitos positivos constituyen un conjunto de vectores poliméricos particularmente adecuado para la transferencia de genes, en la medida en la que su carga positiva les confiere unas propiedades de complejación del ADN y de los plásmidos, y de interacción con las superficies celulares objetivo. El complejo resultante tiene características de tamaño y de carga de superficie tales que su internalización en algunas células se ve muy favorecida. Entre los polielectrolitos positivos ya utilizados para la transferencia de genes, se puede citar la poli-L-lisina y sus derivados, el quitosano y sus derivados así como unos sacáridos funcionalizados por unas funciones amina, el poli(metacrilato de dimetilaminoetilo), y la polietilenimina (PEI) y sus derivados. La invención se refiere a esta última clase de polielectrolitos positivos a base de PEI.

Las poli(etilenimina)s (PEI) han sido los primeros materiales de tipo polielectrolito positivo en haberse introducido en el campo de los vectores poliméricos catiónicos sintéticos por Boussif *et al.* en 1995 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 7297-7301). Se distinguen dos tipos de PEI, según la estructura macromolecular: por un lado, la PEI con macroestructura lineal (LPEI, obtenida por hidrólisis de poli(2-alkil-2-oxazolina)), y por otro lado la PEI con estructura ramificada (BPEI), obtenida por polimerización de la etilenimina). Estos polímeros, de una eficacia bastante buena, se han vuelto una referencia en materia de transferencia de genes con la ayuda de vectores no virales, a pesar de que esta eficacia sea todavía insuficiente para permitir la implantación de tratamiento terapéutico en enfermedades hereditarias (Eliyah *et al.*, Molecules 2005, 10, 34-64). Estos polímeros presentan además una cierta toxicidad, generalmente atribuida a su fuerte densidad de carga positiva sobre el esqueleto macromolecular. Estos vectores son objeto de numerosas proposiciones de modificación con el objetivo de mejorar la eficacia de transfección, o bien disminuir la toxicidad. Así, la patente US 6,586,524 propone fijar sobre la PEI unas ramificaciones laterales de poli(etilenflicol), a su vez funcionalizadas por un grupo terminal direccionable. Asimismo, unos poli(éster amina) preparados a partir de poliéter α - ω -diacrilato y de PEI ramificada (BPEI) han mostrado una eficacia de transferencia mejorada con una toxicidad disminuida (Kim *et al.*, Macromolecular Bioscience 2007, 7, 611-619). Esta técnica de mejora se ha examinado ampliamente con numerosas variantes a partir de la BPEI o con la LPEI de baja masa molar (800 Da), especialmente haciendo variar la naturaleza del diacrilato, por ejemplo con un segmento corto como el 1,3-butanodiol diacrilato (Forrest *et al.*, Bioconjugate Chemistry 2003, 14, 934-940). En este último caso, con el fin de obtener la reticulación o un producto altamente ramificado, se disuelve la PEI en cloruro de metileno, disolvente en el que el diacrilato utilizado es también soluble. En una publicación reciente (Arote *et al.*, Biomaterials 2007, 28, 735-744) los autores utilizan la poli(etilenimina) lineal de baja masa molar para reaccionar con un diacrilato de policaprolactona. En este documento, se busca evitar la reacción de las funciones aminas secundarias de la PEI con las funciones acrilato, sacando provecho del hecho de que la PEI lineal posee una función amina primaria en cada uno de sus extremos. Con este objetivo, los autores de este artículo realizan la reacción en el metanol. Este es también el caso en el trabajo presentado en otra publicación en la que se hace reaccionar PEI de baja masa molar (423 Da) con poli(óxido de etileno) diacrilato de masa que va de 250 a 700 Da (Park *et al.*, Journal of Controlled Release 2005, 105, 367-380).

La utilización de funciones imidazolilo para preparar unos vectores de transferencia poliméricos se ha descrito en el documento US 7,163,695 para un polímero del tipo polipéptido de por lo menos 10 residuos aminoácidos. En efecto, por lo menos el 10% de estos aminoácidos son unos residuos histidina, pero distribuidos de manera no aleatoria. Sin embargo, en la clase de las polietileniminas, sólo las BPEI se han modificado también por unos grupos imidazolilo, como los que se encuentran en la histidina. La referencia siguiente da detalles sobre las diversas tentativas efectuadas en la actualidad y describe como la PEI ramificada (BPEI) puede modificarse por unas funciones imidazolilo (Swami *et al.*, International Journal of Pharmaceutics 2007, 335, 180-192). Cabe señalar

5

10

15

20



en las que

R₁ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁-C₆.

30

n es un número comprendido entre el 1 y el 99% de los monómeros totales, y

35

Ventajosamente, este polímero tiene una estructura globalmente lineal.

40

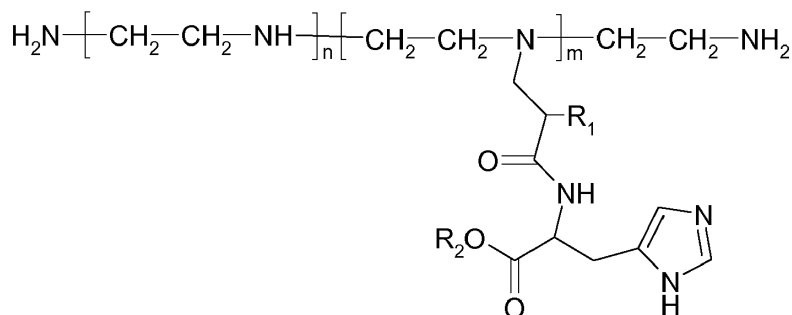
45

50

Ventajosamente R_1 y R_2 idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C_1 - C_6 , de

manera ventajosa, un átomo de hidrógeno o un grupo metilo.

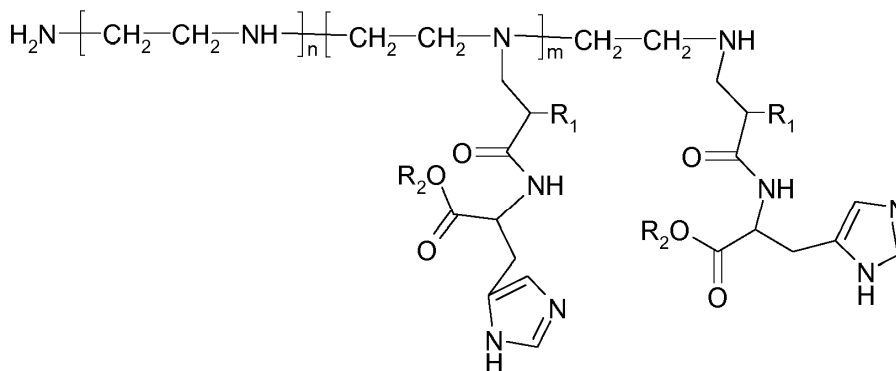
Así, el copolímero estadístico según la invención, puede tener la fórmula VII siguiente:



VII

en la que m, n, R₁ y R₂ son tales como se han definido anteriormente,

o la fórmula VIII siguiente:



VIII

en la que m, n, R₁ y R₂ son tales como se han definido anteriormente.

La ventaja del copolímero según la invención se basa en el hecho de que el aminoácido histidina está fijado según una distribución aleatoria sobre una polietilenimina lineal, por medio de su función amina primaria con la ayuda de un brazo espaciador corto (-CH₂-CH₂-CO-) que transforma esta función amina primaria de la histidina en función amida (-CO-NH-) biocompatible, idéntica a la que corresponde a la fijación de la histidina en los poli(α-aminoácido)s en las proteínas. Así, el copolímero obtenido es un copolímero estadístico y no es un copolímero bloque. En efecto, los copolímeros bloque parecen particularmente desventajosos en el ámbito de la presente invención, ya que al tener cada bloque unas propiedades diferentes, habría riesgos de segregación de fase y de interacción con una molécula aniónica y en particular el ácido nucleico, diferente para cada una de las fases.

Además, el copolímero según la invención conserva globalmente la estructura lineal de la LPEI y por lo tanto no está ni ramificado, ni reticulado.

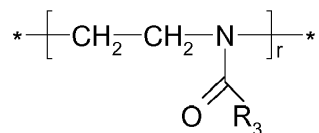
Además, el copolímero según la invención conserva el potencial de carga positiva de la PEI ya que la unidad monomérica de fórmula II posee una función amina terciaria todavía susceptible de cargarse positivamente.

En un modo de realización ventajoso, m es inferior al 70% de los monómeros totales. Ventajosamente, m está comprendido entre el 1 y el 70% de los monómeros totales, más ventajosamente entre el 2 y el 50% de los monómeros totales, aún más ventajosamente entre el 4 y el 40% de los monómeros totales, de manera ventajosa, entre el 5 y el 35% de los monómeros totales, de manera aún más ventajosa, entre el 10 y el 30% de los monómeros totales.

En otro modo de realización ventajoso, n es superior al 30% de los monómeros totales, ventajosamente n está comprendido entre el 30 y el 99% de los monómeros totales, más ventajosamente entre el 50 y el 98% de los monómeros totales, aún más ventajosamente entre el 60 y el 96% de los monómeros totales, de manera ventajosa entre el 65 y el 95% de los monómeros totales, de manera aún más ventajosa entre el 70 y el 90% de los monómeros totales.

Ventajosamente $m + n = 100\%$.

De manera ventajosa, el copolímero según la invención puede comprender una unidad monomérica suplementaria de fórmula III siguiente:



en la que

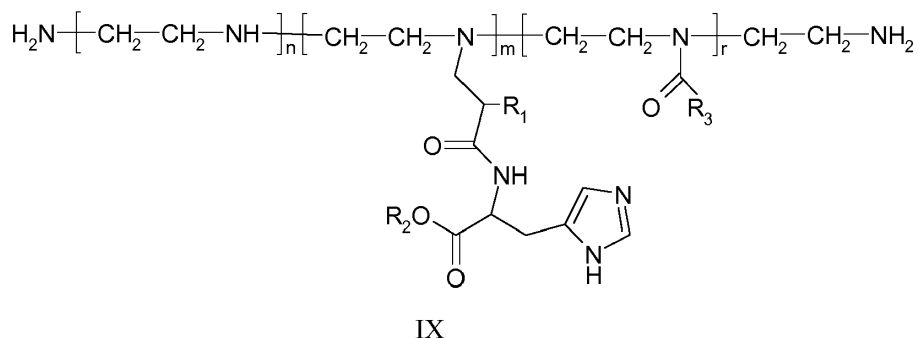
R_3 representa un grupo alquilo de C_1 - C_6 , ventajosamente un grupo metilo o etilo;

r es un número comprendido entre el 0 y el 95% de los monómeros totales, ventajosamente entre el 0 y el 10% de los monómeros totales, de manera ventajosa entre el 1 y el 95% de los monómeros totales, de maneaa aún más ventajosa entre el 1 y el 10% de los monómeros totales.

Esta unidad monomérica está también distribuida de manera aleatoria en el copolímero según la invención.

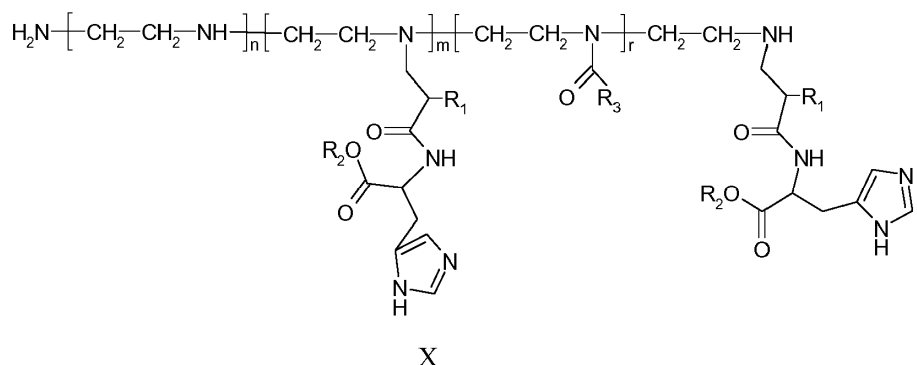
Ventajosamente $m + n + r = 100\%$.

Así, el copolímero estadístico según la invención puede tener la fórmula IX siguiente:



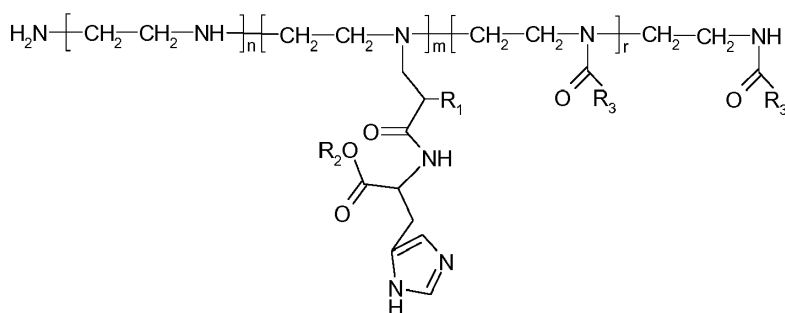
en la que m , n , r , R_1 , R_2 y R_3 son tales como se han definido anteriormente,

o la fórmula X siguiente:



en la que m , n , r , R_1 , R_2 y R_3 son tales como se han definido anteriormente,

o la fórmula XI siguiente:



XI

en la que m, n, r, R₁, R₂ y R₃ son tales como se han definido anteriormente.

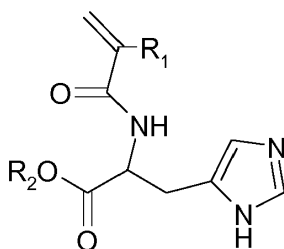
El copolímero según la invención puede también comprender unas unidades monoméricas que comprenden unos residuos sacarídicos o unos residuos de poli(óxido de etileno) o unas unidades peptídicas, ventajosamente polilisina.

Los residuos sacarídicos se seleccionan ventajosamente de entre los residuos de lactosa, de tetraglucosa, y de manosa.

Los residuos sacarídicos y/o los residuos de poli(óxido de etileno) se injertan sobre el átomo de nitrógeno de la unidad PEI de fórmula I, ventajosamente por medio de un grupo C=O.

De manera ventajosa, la proporción de estos residuos es tal que la polietilenimina es siempre globalmente de estructura lineal. Ventajosamente, cada uno de estos residuos está presente en el copolímero en una proporción inferior al 70% de los monómeros totales, de manera ventajosa, en una proporción inferior al 50% de los monómeros totales y de manera aún más ventajosa en una proporción inferior al 30% de los monómeros totales, aún más ventajosamente en una proporción inferior al 10% de los monómeros totales. De manera ventajosa, cada una de estas unidades está dispuesta aleatoriamente en el copolímero.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de preparación de un copolímero según la invención, caracterizado por que comprende la etapa de poner en contacto una polietilenimina lineal solubilizada en agua a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5, con el compuesto de fórmula IV siguiente



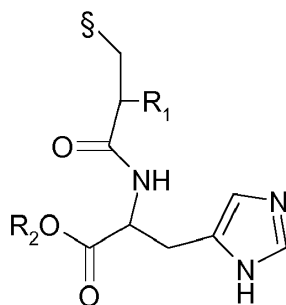
IV

en la que R₁ y R₂ son tales como se han definido anteriormente, ventajosamente a la temperatura de reflujo del agua.

El procedimiento según la invención puede por lo tanto aplicarse en fase acuosa, lo que constituye una gran simplificación, por un lado, y una ventaja, ya que una pol(etilenimina) lineal de masa molar elevada (por ejemplo la PEI 22 kDa) puede así modificarse.

Este procedimiento consiste por lo tanto en la modificación aleatoria de una polietilenimina lineal por reacción con un compuesto de fórmula IV.

Esta reacción permite por lo tanto modificar la función amina secundaria de la PEI en función amina terciaria. Esta reacción de adición conduce a una transformación parcial y aleatoria de las unidades de etilenimina -CH₂-CH₂-NH- en unidades monoméricas sustituidas sobre los nitrógenos por unos grupos:



en la que § significa el sitio en el que se injerta la molécula sobre el nitrógeno y R_1 y R_2 son tales como se han definido anteriormente.

Además, al ser el compuesto de fórmula IV un monoacrilato, su utilización permite conservar el esqueleto macromolecular de la PEI, modificando así su estructura globalmente lineal y evitar la formación de polímero ramificado o reticulado.

Las modificaciones de la poli(etilenimina) por el procedimiento según la invención permiten mantener el potencial de carga positiva de la PEI ya que esta modificación transforma una función amina secundaria en función amina terciaria, siempre susceptible de cargarse positivamente.

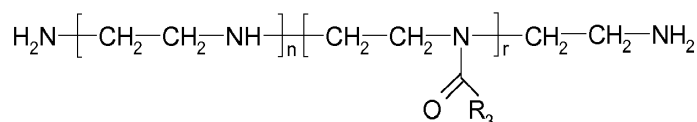
El porcentaje de modificación de la PEI y por lo tanto el valor de m en el copolímero según la invención depende de la duración de la etapa de poner en contacto el compuesto de fórmula IV con la LPEI.

Ventajosamente, la duración de esta etapa es como máximo de 5 días, de manera ventajosa, como máximo de 4 días, de manera más ventajosa como máximo de 3 días, más ventajosamente como mínimo de 12 horas, aún más ventajosamente como mínimo de 24 horas.

En un modo de realización ventajoso, la polietilenimina lineal antes de la modificación tiene una masa molar media en número comprendida entre 400 Da y 1000000 de Da, ventajosamente entre 4000 y 40000 Da, aún más ventajosamente entre 10000 y 30000 Da.

De manera ventajosa, la LPEI que reaccionará con el compuesto de fórmula IV es un copolímero estadístico que comprende las dos unidades monoméricas de fórmulas I y III tales como se han definido anteriormente.

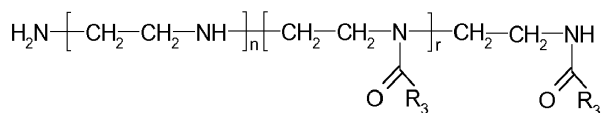
Así, este copolímero estadístico puede tener la fórmula XII siguiente:



XII

en la que n , r y R_3 son tales como se han definido anteriormente

o la fórmula XIII siguiente:



XIII

en la que n , r y R_3 son tales como se han definido anteriormente.

Este polímero tiene una estructura globalmente lineal.

La LPEI que reaccionará con el compuesto de fórmula IV puede también comprender unas unidades monoméricas que comprenden unos residuos sacarídicos o unos residuos de poli(óxido de etileno) o unas unidades peptídicas, ventajosamente polilisina.

Los residuos sacarídicos se seleccionan ventajosamente de entre los residuos de lactosa, de tetraglucosa y de

manosa.

Los residuos sacarídicos y/o los residuos de poli(óxido de etileno) se injertan sobre el átomo de nitrógeno de la unidad PEI de fórmula I, ventajosamente por medio de un grupo C=O.

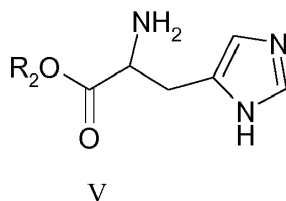
De manera ventajosa, la proporción de estos residuos es tal que la polietilenimina es siempre globalmente de estructura lineal. Ventajosamente, cada uno de estos residuos está presente en el copolímero en una proporción inferior al 70%, de manera ventajosa en una proporción inferior al 50% y de manera aún más ventajosa en una proporción inferior al 30%, aún más ventajosamente en una proporción inferior al 10%.

De manera ventajosa, cada uno de estos residuos se distribuye aleatoriamente en la LPEI.

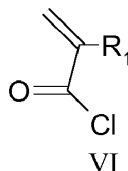
La reacción entre la LPEI y el compuesto de fórmula general IV no modifica las otras eventuales unidades monoméricas presentes en la LPEI.

Ventajosamente, la LPEI que reaccionará con el compuesto de fórmula IV se obtiene por hidrólisis ácida de poli(2-R₃-2-oxazolina) con R₃ tal como se ha definido anteriormente. Los procedimientos de preparación de la LPEI son bien conocidos por el experto en la materia, ya contenga la LPEI o no las unidades monoméricas de fórmula III y/o las unidades monoméricas que comprenden unos residuos sacarídicos o unos residuos de poli(óxido de etileno) y/o unas unidades peptídicas, ventajosamente polilisina. En particular la unidad monomérica de fórmula III tal como se ha definido anteriormente puede provenir por ejemplo de una hidrólisis incompleta de la poli(2-R₃-2-oxazolina) de partida.

El compuesto de fórmula general IV se puede obtener por reacción del compuesto de fórmula general V siguiente



en la que R₂ es tal como se ha definido anteriormente con un compuesto de fórmula general VI siguiente



en la que R₁ es tal como se ha definido anteriormente, ventajosamente en medio básico, de manera ventajosa, en presencia de sosa, en particular en fase acuosa. Este procedimiento se ha descrito en particular en el artículo de Bentolila *et al.* (J. Med. Chem. 2000, 43, 2591-2600).

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un copolímero según la presente invención como vector farmacéuticamente aceptable, una sustancia activa y eventualmente otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

En efecto, el copolímero según la invención se puede utilizar para dirigir una sustancia activa hacia el sitio exacto en el que debe entrar en acción en un órgano, un tejido o una célula.

Mediante la expresión "sustancia activa" se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier principio activo farmacéutico (antálgicos, antipiréticos, aspirina y derivados, antibióticos, anti-inflamatorios, antiulcerosos, antihipertensores, neurolépticos, antidepresivos, oligonucleótidos, péptidos, proteínas por ejemplo); cosmético (anti UV, autobronceador por ejemplo), nutracéutico (vitaminas por ejemplo); alimenticio; agroquímico o veterinario.

Ventajosamente, esta sustancia activa está cargada negativamente. Se trata por lo tanto en este caso de una molécula aniónica.

Estas composiciones pueden formularse para administración a los mamíferos, incluyendo el hombre. La posología varía según el tratamiento y según la afección en cuestión. Estas composiciones se realizan con el fin de poder administrarse por vía oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal. Las formas unitarias de administraciones apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como los comprimidos,

las cápsulas, los polvos, los gránulos y las soluciones o suspensiones orales, las formas de administración sublingual y bucal, las formas de administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular y las formas de administración rectal.

Así, la composición farmacéutica según la presente invención puede comprender otro excipiente farmacéuticamente aceptable tal como la gelatina, el almidón, la lactosa, el estearato de magnesio, el talco, la goma arábiga o análogos, un edulcorante, un antiséptico, así como un agente que da sabor, un colorante apropiado, unos agentes de dispersión o unos agentes humectantes, unos agentes de puesta en suspensión o un diluyente. Se pueden recubrir los comprimidos de la composición según la invención con sacarosa u otras materias apropiadas o también se pueden tratar de tal manera que tengan una actividad prolongada o retrasada y que liberen de manera continua una cantidad predeterminada del principio activo y del copolímero según la invención.

Para una administración rectal, se recurre a supositorios que se preparan con unos aglutinantes que se funden a temperatura rectal, por ejemplo manteca de cacao o polietilenglicoles.

Para una administración parenteral, intranasal o intraocular, se utilizan unas suspensiones acuosas, unas soluciones salinas isotónicas o unas soluciones estériles e inyectables que contienen unos agentes de dispersión y/o unos agentes humectantes farmacológicamente compatibles.

La presente invención se refiere además a la utilización del copolímero según la presente invención como vector farmacéuticamente aceptable de una sustancia activa en una composición farmacéutica.

La presente invención se refiere además a un complejo que comprende

- a) el copolímero según la presente invención,
- b) por lo menos una molécula aniónica.

En tal complejo, el enlace entre el compuesto a) y el compuesto b) es de naturaleza electrostática. En efecto, en el ámbito de los complejos según la invención, el copolímero según la invención se encuentra en una forma catiónica. Ventajosamente, la molécula aniónica es un ácido nucleico.

En el complejo según la presente invención, el ácido nucleico puede ser tanto un ácido desoxirribonucleico (ADN) como un ácido ribonucleico (ARN) o unas secuencias híbridas ADN/ARN. Puede tratarse de secuencias de origen natural o artificial, y especialmente de ADN genómico, de ADN complementario (ADNc), de ARN mensajero (ARNm), de ARN de transferencia (ARNt), de ARN ribosómico (ARNr), o de secuencias sintéticas o semi-sintéticas. Además, el ácido nucleico puede tener un tamaño muy variable que va del oligonucleótido al cromosoma. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, viral, etc. Pueden obtenerse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, y especialmente por cribado de bancos, por síntesis química, o también por unos métodos mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas por cribado de bancos. Pueden también obtenerse por una modificación química a nivel de sus partes azúcar, de sus partes nucleobases o de su esqueleto internucleotídico. Entre las modificaciones ventajosas en las partes azúcar, se pueden citar especialmente las modificaciones que intervienen en la posición 2' de la ribosa, tales como las modificaciones 2'-desoxi, 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-tio o 2'-O-alquilo, en particular 2'-O-metilo, en lugar del grupo 2'-OH normal en los ribonucleótidos, o también la presencia de un puente metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa (LNA). En lo que se refiere a las nucleobases, es posible utilizar unas bases modificadas, tales como especialmente la 5-bromo-uridina, la 5-yodo-uridina, la N³-metil-uridina, una 2,6-diaminopurina (DAP), la 5-metil-2'-desoxicitidina, la 5-(1-propinil)-2'-desoxi-uridina (pdU), la 5-(1-propinil)-2'-desoxicitidina (pdC) o unas bases conjugadas con colesterol. Finalmente, unas modificaciones ventajosas del esqueleto internucleotídico comprenden la sustitución de grupos fosfodiésteres de este esqueleto por unos grupos fosforotioato, metilfosfonato, fosforodiamidato, o la utilización de un esqueleto compuesto de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por unos enlaces peptídicos (PNA, Peptide Nucleic Acid). Las diferentes modificaciones (base, azúcar, esqueleto) pueden, por supuesto, combinarse para dar unos ácidos nucleicos modificados de tipo morfolino (bases fijadas sobre un ciclo morfolino y unidas por unos grupos fosforodiamidato) o PNA (bases fijadas sobre unidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por unos enlaces peptídicos).

Por otro lado, se pueden incorporar en unos vectores, tales como unos vectores plasmídicos.

Ventajosamente, el ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por ARN, ADN complementario (ADNc), ADN genómico, ADN plasmídico, ADN antisentido, ARN mensajero, ARN antisentido, ARN interferente, ribosomas, ARN de transferencia, ARN ribosómico, o ADN que codifica estos tipos de ARN.

En lo referente más particularmente a los ácidos desoxirribonucleicos, éstos pueden ser mono o bicatenarios. Estos ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia de genes seleccionada de entre a) unos genes marcadores, b) unos genes con fines terapéuticos y c) unos genes con fines de vacunación, y los elementos que permiten su expresión.

En el sentido de la invención, se entiende por “gen con fines terapéuticos”, especialmente, cualquier gen que codifica un producto proteico que tiene un efecto terapéutico. El producto proteico así codificado puede ser una proteína, un péptido, etc. Este producto proteico puede ser homólogo con respecto a la célula diana (es decir un producto que normalmente se expresa en la célula diana cuando ésta no presenta ninguna patología). En este caso, la expresión de una proteína permite por ejemplo paliar una expresión insuficiente en la célula o a la expresión de una proteína inactiva o débilmente activa debido a una modificación, o también sobreexpresar dicha proteína. El gen terapéutico puede también codificar para un mutante de una proteína celular, que tiene una estabilidad incrementada, una actividad modificada, etc. El producto proteico puede también ser heterólogo con respecto a la célula diana. En este caso, una proteína expresada puede por ejemplo completar o aportar una actividad deficiente en la célula, lo que permite luchar contra una patología, o estimular una respuesta inmunitaria. El gen terapéutico puede también codificar para una proteína segregada en el organismo.

El gen terapéutico puede también ser un gen o una secuencia antisentido, cuya expresión en la célula diana permite controlar la expresión de genes o la transcripción de ARN celulares. Tales secuencias pueden, por ejemplo, transcribirse en la célula diana en ARN complementario de ARNm celulares y bloquear así su traducción en proteína. Puede tratarse también de oligonucleótidos sintéticos, eventualmente modificados. Los antisentido comprenden también las secuencias que codifican para unas ribozimas, que son capaces de destruir selectivamente unos ARN diana. El gen terapéutico puede también ser un gen que codifica un siRNA o un shRNA.

Ventajosamente, los genes con fines terapéuticos se seleccionan de entre los genes que codifican:

- la distrofina y minidistrofina (miopatías);
- la proteína CFTR “cystic fibrosis transmembrana conductance regulador” (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) asociada a la mucoviscidosis;
- la alfa-antitripsina;
- la eritropoyetina (EPO);
- las citoquinas tales como las interleucinas y el TNF factor de necrosis de los tumores;
- los factores de crecimiento tales como el TGFbeta y el PDGF;
- las enzimas lisosómicas tales como la beta-glucosidasa;
- la adenosina desaminasa (ADA);
- unos ARN sentido y antisentido;
- unos ARN interferentes;
- unas ribozimas;
- los receptores de lipoproteínas de baja densidad, deficiente en el caso de hipercolesterolemia;
- los factores de coagulación tales como los factores VII, VIII y IX;
- las fenilalanina-hidroxilasa;
- la tirosina hidroxilasa;
- la timidina quinasa del virus Herpes simplex;
- las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad, ventajosamente los HLA-B7;
- la citosina desaminasa.

Como se ha indicado anteriormente, el ácido nucleico puede también comprender uno o varios genes con fines vacunación capaz de generar en el hombre o en el animal una respuesta inmunitaria. En este modo particular de realización, la invención permite por lo tanto la realización o bien de vacunas o bien de tratamientos inmunoterapéuticos aplicados al hombre o al animal, especialmente frente a microorganismos, parásitos, bacterias, virus o cánceres. Puede tratarse especialmente de péptidos antigénicos específicos del virus de Epstein Barr, del virus VIH, del virus de la hepatitis B, del virus de la pseudo-rabia, o también específicos de tumores.

Así, ventajosamente, los genes con fines de vacunación se seleccionan de entre los genes que codifican para:

- unos antígenos virales, ventajosamente la nucleoproteína del virus de la gripe o la proteína NEF o GAG del virus VIH;

5 - unos antígenos asociados a los tumores, ventajosamente el antígeno MART1 de los cánceres con melanoma, las mucinas o el antígeno PSA de los cánceres de próstata;

- unos antígenos bacterianos;

10 - unos antígenos parasitarios.

En otro modo de realización ventajoso, el gen marcador se selecciona de entre los genes de:

- la luciferasa de luciérnaga;

15 - la proteína verde de medusa *Aequora victoria*;

- la beta-galactosidasa de *E. coli*;

20 - el cloranfenicol acetiltransferasa;

- resistencia a un antibiótico, ventajosamente de resistencia a la neomicina o a la higromicina.

25 Para obtener un efecto óptimo de los complejos de la invención, las proporciones respectivas del polímero y del ácido nucleico se determinan preferentemente de manera que la relación másica ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) entre el polímero y el ácido nucleico esté comprendido entre 1/3 y 1/4.

30 Esta relación puede, por supuesto, adaptarse por el experto en la materia en función del copolímero utilizado, de la presencia de un adyuvante (véase a continuación), del ácido nucleico, de la célula diana y del modo de administración utilizado.

35 Los complejos según la invención pueden prepararse mezclando una solución del ácido nucleico en cuestión y una solución del copolímero según la invención. Ventajosamente, estas soluciones se preparan a partir de suero fisiológico o de un tampón, tal como el tampón hepes, o de un medio citocompatible.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un complejo según la invención y eventualmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 La composición farmacéutica según la invención se puede utilizar tal cual o en asociación con otros compuestos. Así, en un modo particular de realización, la composición según la presente invención comprende además un adyuvante capaz de asociarse al complejo copolímero/ácido nucleico según la invención y mejorar el poder transfectante. En efecto, el poder transfectante de las composiciones de la invención pueden mejorarse todavía más en presencia de algunos adyuvantes (lípidos, proteínas, lipopoliaminas, polímeros sintéticos por ejemplo), capaces de asociarse al complejo copolímero/ácido nucleico según la invención.

45 Ventajosamente, los adyuvantes utilizados en las composiciones según la invención son unos lípidos catiónicos (que comprenden una o varias cargas catiónicas en su parte polar) o unos lípidos neutros.

50 En lo que se refiere a los lípidos catiónicos, puede tratarse más particularmente de lipoliamina. Otros adyuvantes particularmente ventajosos para la realización de las composiciones de la invención se representan por los lípidos neutros. La utilización de lípidos neutros es particularmente ventajosa cuando la relación de cargas R (aminas/fosfatos) es débil. De manera particularmente ventajosa, se utilizan unos lípidos naturales o sintéticos, zwitteriónicos o desprovistos de carga iónica en las condiciones fisiológicas. Estos diferentes lípidos pueden obtenerse o bien por síntesis, o bien por extracción a partir de órganos (por ejemplo el cerebro) o de huevos, mediante técnicas clásicas bien conocidas por el experto en la materia.

60 En un modo de realización particularmente ventajoso, las composiciones de la presente invención comprenden un elemento de reconocimiento que permite orientar la transferencia del ácido nucleico. Este elemento de reconocimiento puede ser un elemento de reconocimiento extracelular, que permite orientar la transferencia del ácido nucleico hacia algunos tipos celulares o algunos tejidos deseados (células tumorales, células hepáticas, células hematopoyéticas, etc.). Puede también tratarse de un elemento de reconocimiento intracelular, que permite orientar la transferencia del ácido nucleico hacia algunos compartimientos celulares preferidos (mitocondrias, núcleo, etc.).

65 Entre los elementos de selección utilizables en el ámbito de la invención, se pueden citar los azúcares, los péptidos, los oligonucleótidos, los lípidos o las proteínas. Ventajosamente, se trata de azúcares, de péptidos o de proteínas

tales como unos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, unos ligandos de receptores celulares o unos fragmentos de estos, unos receptores o fragmentos de receptores, etc. En particular, puede tratarse de ligandos de receptores de factores de crecimiento, de receptores de citoquinas, de receptores de lectinas celulares o de receptores de proteínas de adhesión. Se puede citar también el receptor de la transferrina, de los HDL y de los LDL. El elemento de selección puede también ser un azúcar que permita reconocer los receptores asialoglicoproteicos, o también un fragmento Fab de anticuerpo que permita reconocer el receptor del fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

Las composiciones según la invención pueden formularse para administraciones por vía tópica, cutánea, oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, especialmente para una inyección directa a nivel del órgano deseado, o para una administración por vía tópica (sobre la piel y/o mucosa). Puede tratarse en particular de soluciones estériles, isotónicas, o de composiciones secas, especialmente liofilizadas que, por adición, según el caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las dosis de ácido nucleico utilizadas para la inyección, así como el número de administraciones, pueden adaptarse en función de diferentes parámetros, y especialmente en función del modo de administración utilizado, de la patología en cuestión, del gen a expresar, o también de la duración del tratamiento buscado.

Como se ha indicado anteriormente, los complejos y composiciones según la invención pueden utilizarse para la transferencia de ácidos nucleicos en las células *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. En particular, los copolímeros según la invención pueden utilizarse para transferir de manera muy eficaz unos ácidos nucleicos en numerosos tipos celulares, y en particular en algunos tipos celulares habitualmente difíciles de transfectar.

Así, se describe un procedimiento para transferir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico en unas células, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de dichas células con por lo menos un complejo según la presente invención o una composición farmacéutica según la invención.

Las células pueden ser de origen procariota o eucariota, en particular animal, vegetal o humana.

Ventajosamente, las células son unas células de mamíferos, de manera ventajosa seleccionadas de entre:

- células cepas hematopoyéticas;
- células del sistema inmunitario, tales como unas células dendríticas, unos macrófagos y unos linfocitos;
- células del hígado;
- células de los músculos esqueléticos;
- células de la piel, tales como fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas y melanocitos;
- células de los vasos y microvasos sanguíneos, tales como células endoteliales y células musculares lisas;
- células epiteliales de las vías aéreas;
- células del sistema nervioso central;
- células cancerosas;
- células del tejido conjuntivo, tales como unos tenocitos.

Ventajosamente, el método de transfección *in vitro* o *ex vivo*, se caracteriza por que se pone en contacto un complejo o una composición farmacéutica según la invención en un medio que contiene unas células a transfectar, en condiciones tales que existe:

- un paso del complejo a partir del medio en el citoplasma de las células,
- una liberación del ácido nucleico implicado en dicho complejo en el citosol y/o el núcleo de las células,
- transcripción y expresión del ácido nucleico en las células transfectadas,
- expresión de la proteína que corresponde al gen transfectado.

La presente invención se refiere además a la utilización de un copolímero según la invención, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al suministro intracelular de moléculas aniónicas, ventajosamente de ácido nucleico.

Se refiere además a un complejo según la invención para su utilización como medicamento destinado al suministro intracelular de ácido nucleico, ventajosamente destinado al tratamiento de tumores, más ventajosamente de leiomioma uterino o de tumor maligno tal como el carcinoma de los ovarios, de mama o del endometrio, para la preparación de una vacuna o para el tratamiento o la prevención de la deficiencia metabólica congénita o adquirida o de enfermedades asociadas con una expresión genética deficiente, más ventajosamente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los trastornos de un gen único tales como los síndromes de deficiencia inmunitaria combinada severa, la mucoviscidosis, la hemofilia, la drepanocitosis, la beta-talasemia y la distrofia muscular.

La invención se entenderá mejor a partir de la lectura de los ejemplos y de las figuras siguientes.

La figura 1 representa la migración del ADN plasmídico en electroforesis en un gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. La pista ADN corresponde a la migración de 1 µg de ADN en ausencia de polímero. Para el copolímero según la invención con $m = 25\%$ y $R_1, R_2 = H$ (His-LPEI (25%)), una LPEI no modificada (LPEI) y el copolímero según la invención con $m = 66\%$ y $R_1, R_2 = H$ (His-LPEI (66%)), las pistas 1, 2, 3 y 4 corresponden a la migración de 1 µg de ADN en presencia de 1, 2, 3 y 4 µg de polímero o copolímero. El ADN se revela bajo luz UV.

La figura 2 representa la medición de la actividad luciferasa (RLU) 48 h después de la transfección de células HeLa con 2,5 µg de plásmido que codifica la luciferasa complejo con LPEI no modificada (LPEI) o con copolímero según la invención con $m = 25\%$ y $R_1, R_2 = H$ (His-LPEI).

La figura 3 representa la medición de la toxicidad inducida por la transfección de las células HeLa con 2,5 µg de plásmido que codifica la luciferasa complejo con LPEI no modificada (LPEI) o con copolímero según la invención con $m = 25\%$ y $R_1, R_2 = H$ (His-LPEI). La viabilidad celular se mide 48 h después de la transfección por un análisis colorimétrico que utiliza el MTT.

La figura 4 representa la evaluación del número de células HeLa transfectadas con 2,5 µg de plásmido que codifica la proteína verde de la medusa (pCMV-EGFP) complejo con LPEI no modificada (D) o con copolímero según la invención con $R_1, R_2 = H$ y $m = 25\%$ (B) o $m = 4\%$ (C) comparadas con las células no transfectadas (A). El número de células que expresan la EGFP se determina después de la medición de la fluorescencia de las células (FL1-H) por citometría de flujo 48 h después de la transfección.

La figura 5 representa la medición de la actividad luciferasa (RLU) 48 h después de la transfección de células HeLa con 2,5 µg de plásmido que codifica la luciferasa complejo con el copolímero según la invención con $R_1, R_2 = H$ y $m = 4\%$, 25% o 66% o con el copolímero según la invención con $R_1 = H$ y $R_2 = \text{metilo}$ y $m = 20\%$ o 66% .

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Los copolímeros de polietileniminas según la invención se ensayan por sus propiedades de transfección de diversas líneas celulares con la ayuda, por ejemplo, del plásmido que codifica para la luciferasa.

Ejemplo 1: copolímero según la invención: $R_1 = R_2 = H$, $m = 25\%$ y complejo con el ADN de un gen informador que codifica la luciferasa

Preparación del copolímero según la invención:

Se prepara un copolímero de LPEI según la invención con $R_1 = R_2 = H$ y $m = 25\%$ de la manera siguiente:

Se empieza por la preparación de la poli(etilenimina) lineal LPEI a partir de la poli(2-metil-2-oxazolina) por hidrólisis ácida:

10 g de poli(2-metil-2-oxazolina) de masa molar 50.000 Da (Aldrich) se disuelven en 115 ml de agua destilada, a los que se añaden 75 ml de ácido clorhídrico a 37% (Aldrich). Se calienta a reflujo durante 24 horas. Después del enfriamiento, se añaden unas pastillas de sosa para llevar el medio de reacción a $\text{pH} = 14$. La LPEI precipita. Se lava el precipitado con agua destilada hasta la obtención de un lavado neutro. Se lava después el precipitado con acetona y la LPEI así obtenida se seca al vacío. El rendimiento es del 98% y el producto se verifica por resonancia magnética nuclear.

La síntesis de la acrilamida ácido N-2-(3(3H-imidazol-4-il)propanoico)) (producto de fórmula IV, $R_1, R_2 = H$) se efectúa de la manera siguiente: 3,1 g de histidina (Aldrich) se disuelven en 100 ml de agua destilada que contiene 3 g de sosa. Se añaden 1,8 g de cloruro de acrililo (Aldrich) gota a gota bajo agitación a temperatura ambiente. Se recupera el producto buscado por concentración del medio de reacción, precipitación en acetona y filtración. El producto se seca después al vacío.

La modificación de la LPEI se efectúa de la manera siguiente: 3,7 g de LPEI preparada como anteriormente, y 3 g de acrilamida ácido N-2-(3(3H-imidazol-4-il)propanoico) se disuelven en 40 ml de agua destilada. Se calienta a reflujo durante 2 días. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se evapora en seco y se recoge con 20 ml de metanol. La parte no soluble en el metanol es el producto buscado. Se termina por un secado al vacío. Este modo de realización permite obtener el copolímero según la invención con un 25% de modificación de las unidades etilenimina ($m = 25\%$).

La eficacia de la transfección del copolímero según la invención obtenido anteriormente se ha ensayado *in vitro* y se ha medido con la ayuda de un gen informador que codifica la luciferasa bajo el control del promotor CMV. Se ha comparado con la eficacia de transfección de una LPEI no modificada.

Preparación de complejos según la invención y de complejo LPEI no modificada/ ADN:

Para determinar la formación óptima de los complejos ADN/copolímero según la invención y ADN/LPEI no modificada, se preparan diferentes mezclas según el procedimiento siguiente y se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 0,6%: 30 µl de una solución de polímero a razón de 1 mg/ml se diluyen en 60 µl de tampón Hepes 10 mM, pH 7,4. Esta solución de polímero se transfiere después en 140 µl de tampón hepes 10 mM, pH 7,4 que contiene 7,5 µg de plásmido que codifica la luciferasa. La mezcla se agita fuertemente durante 4 s y después se deja en reposo a 20°C durante 30 min. Se analizan 20 µl de la mezcla por electroforesis en gel de agarosa al 0,6% que contiene bromuro de etidio que permite la revelación del ADN por irradiación UV. Las mezclas que permiten una total no-migración del ADN se consideran como las que contienen el ADN totalmente condensado con un polímero (Figura 1). Estos complejos son los que se utilizarán para la transfección de las células, es decir para los complejos ADN/LPEI no modificada en una relación molar 1/2 (µg:µg), o 1/3 (µg:µg) y 1/4 (µg:µg) para los complejos ADN/copolímero según la invención. Como lo indica el gel de agarosa, cuando la LPEI se sustituye a razón del 66% con histidina (copolímero según la invención con $R_1=R_2=H$ y $m=66\%$), las interacciones del polímero con el ADN son débiles y existe la ausencia de condensación fuerte del ADN. El tamaño y la carga global (potencial zeta) de los complejos se miden con la ayuda del zetasizer 3000 (Malvern Instruments). Los complejos ADN/LPEI no modificada tienen un tamaño de 78 nm y un potencial zeta de 13 mV, el tamaño de los complejos ADN/LPEI según la invención con $R_1=R_2=H$ y $m=25\%$ es de 250 nm y el potencial zeta es de 8 mV.

Ensayo de transfección *in vitro*:

Las células HeLa se han inoculado en una placa de 24 pocillos a la densidad inicial de 2×10^5 células por pocillo. Han sufrido una incubación durante 18-20 horas para alcanzar una confluencia del 80%. Las soluciones de complejos ADN/polímero descritos anteriormente se ajustan a 1,5 ml con un medio de cultivo celular que contiene un 10% de suero fetal de ternera. El medio de las células se sustituye entonces con 0,5 ml de la mezcla que contiene el complejo LPEI/ADN que codifica la luciferasa (2,5 µg/pocillo) o el complejo copolímero según la invención (con $R_1=R_2=H$ y $m=25\%$)/ADN que codifica la luciferasa (2,5 µg/pocillo). Se realiza después una incubación de 4 horas a 37°C en un horno con un 95% de aire y un 5% de CO_2 . El medio se sustituye después por un medio que contiene un 10% de suero fetal de ternera y se mantiene durante 48 horas en una incubadora a 37°C. Los ensayos de actividad luciferasa se realizan según el protocolo descrito en Pichon *et al.* (J. Gene Med. 2002, 4, 548-559), y la intensidad de luz emitida se normalizó después a la cantidad de proteína producida después de un análisis BCA según el modo de realización descrito en la misma referencia.

Los resultados son los siguientes:

La LPEI no modificada da una actividad luciferasa de $1,7 \cdot 10^6$ RLU/mg de proteína mientras que el copolímero según la invención con $R_1=R_2=H$ y $m=25\%$ da una actividad luciferasa de $1,5 \cdot 10^8$ RLU/mg de proteína (Figura 2).

Así, no sólo aumenta la eficacia de transfección, sino que la toxicidad disminuye ampliamente: utilizando el análisis MTT, la toxicidad medida es de un 26% para la LPEI no modificada, es sólo de un 14% para el copolímero según la invención con $R_1=R_2=H$ y $m=25\%$ (Figura 3).

Ejemplo 2: copolímero según la invención: $R_1=R_2=H$, $m=25\%$ y complejo con el ADN de un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente de medusa

Se realizan los mismos ensayos de transfección que en el ejemplo 1 a partir del copolímero obtenido en el ejemplo 1 pero se utiliza aquí un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente de medusa (EGFP). La medición de la fluorescencia de las células en citometría de flujo permite alcanzar el número de células transfectadas así como la intensidad de la expresión del gen en las células y la viabilidad de las células en presencia del yoduro de propidio. Los resultados mostrados en la figura 4 indican que un 22% y un 13% de las células HeLa transfectadas respectivamente con el copolímero según la invención ($R_1=R_2=H$ y $m=25\%$ y $m=4\%$) expresan el transgén. El número de células transfectadas por la LPEI no modificada es más bajo (aproximadamente un 3%).

Ejemplo 3: copolímero según la invención: $R_1=R_2=H$, $m=4\%$ y complejo con el ADN de un gen informador que codifica la luciferasa

Se realizan las mismas síntesis de copolímero que en el ejemplo 1 anterior, con la única diferencia de que se efectúa la modificación química de las unidades monoméricas de la LPEI con la ayuda de grupos ácido 3-amidopropionato-1-il-(3-(3H-imidazol-4-il)propanoico a un porcentaje de solamente un 4%. Este porcentaje se obtiene calentando a reflujo la LPEI al contacto con el agente modificador sólo por un día. En las mismas condiciones que en el ejemplo 1, la eficacia de la LPEI modificada al 4% (copolímero según la invención con $R_1=R_2=H$ y $m=4\%$) es de aproximadamente $1 \cdot 10^7$ RLU/mg de proteína (figura 5), a comparar con una eficacia de $1,7 \cdot 10^6$ RLU/mg de proteína para la LPEI no modificada (figura 1).

Ejemplo 4: copolímero según la invención: $R_1=R_2=H$, $m=66\%$ y complejo con el ADN de un gen informador que codifica la luciferasa

Se realizan las mismas síntesis de copolímero que en el ejemplo 1 anterior, con la única diferencia de que se efectúa la modificación química de las unidades monoméricas de la LPEI con la ayuda de grupos ácido 3-amidopropionato-1-il-(3-(3H-imidazol-4-il)propanoico a un porcentaje del 66%. Este porcentaje se obtiene calentando a reflujo la LPEI al contacto con el agente modificador para una duración de 4 días. En las mismas condiciones que en el ejemplo 1, la eficacia de la LPEI modificada al 66% (copolímero según la invención con $R_1 = R_2 = H$ y $m = 66\%$) es de aproximadamente 1.10^4 RLU/mg de proteína (Figura 5).

Ejemplo 5: copolímero según la invención: $R_1 = H$, $R_2 = \text{metilo}$ y $m = 20\%$ o $m = 66\%$ y complejo con el ADN de un gen informador que codifica la luciferasa

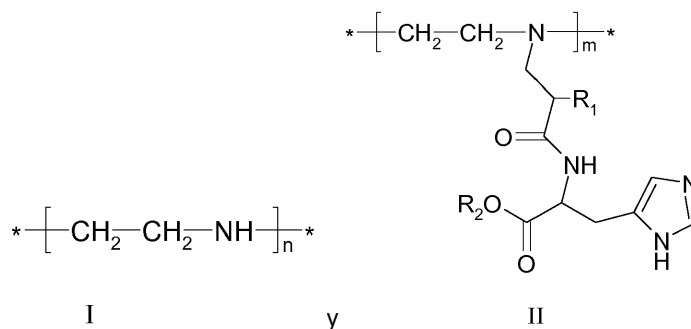
Se realizan las mismas síntesis de copolímero que en el ejemplo 1 anterior, con la única diferencia de que se efectúa la modificación química de las unidades monoméricas de la LPEI con la ayuda de grupos 3-amidopropionato-1-il-(3-(3H-imidazol-4-il)propanoato metiléster a un porcentaje del 20%. La síntesis de la acrilamida N-2-(3(3H-imidazol-4-il)propanoato metiléster) (compuesto de fórmula IV con $R_1 = H$ y $R_2 = -CH_3$) se efectúa de la manera siguiente: este agente modificador se obtiene en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, sustituyendo la histidina por su éster metilado: la acrilamida N-2-(3(3H-imidazol-4-il)propanoato metiléster). El porcentaje del 20% se obtiene calentando a reflujo la LPEI al contacto con el agente modificador para una duración de 2 días. En las mismas condiciones que en el ejemplo 1, la eficacia de la LPEI modificada al 20% (copolímero según la invención con $R_1 = H$, $R_2 = \text{metilo}$ y $m = 20\%$) es de aproximadamente $1.6.10^8$ RLU/mg de proteína, lo que es comparable con el obtenido con la ayuda de la histidina en su forma ácida (ejemplo 1, figura 2 y figura 5: His-LPEI al 25% y HisOMet-LPEI al 20%). Por el contrario, la transfección obtenida con la ayuda de LPEI modificada al 66% es muy baja (copolímero según la invención $R_1 = R_2 = \text{metilo}$ y $m = 66\%$), alrededor de 4.10^3 RLU/mg de proteína (figura 5: HisOMet-LPEI al 66%). Este resultado es conforme con el hecho de que esta LPEI demasiado sustituida por la histidina no condensa en gran medida el ADN (Figura 1).

Así, mediante estos ejemplos, los inventores han puesto en evidencia que las polietileniminas lineales modificadas según la invención no solamente tienen una eficacia de transfección superior a la de las polietileniminas correspondientes no modificadas, sino que tienen también una toxicidad menor. La ventaja de esta modificación no se basa solamente en la mejora de la eficacia de transfección, sino también en el hecho de mantener una estructura lineal para el esqueleto macromolecular y aumentar la solubilidad en el agua del polímero así modificado con los pH fisiológicos.

Según el porcentaje de modificación, la eficacia y la toxicidad varían, y eso en función de la naturaleza de las células transfectadas.

REIVINDICACIONES

1. Copolímero estadístico de polietilenimina lineal que comprende las dos unidades monoméricas de fórmulas I y II siguientes:



en las que

R₁ representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo de C₁-C₆,

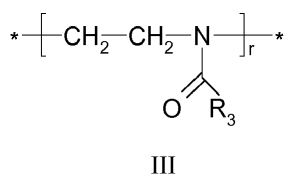
R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₆, arilo o aralquilo, en el que el grupo alquilo es de C₁-C₆,

n es un número comprendido entre el 1 y el 99% de los monómeros totales, y

m es un número comprendido entre el 1 y el 99% de los monómeros totales, ventajosamente entre el 1 y el 70% de los monómeros totales, más ventajosamente entre el 5 y el 35% de los monómeros totales,

ventajosamente, m + n = 100%.

2. Copolímero según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una unidad monomérica suplementaria de fórmula III:



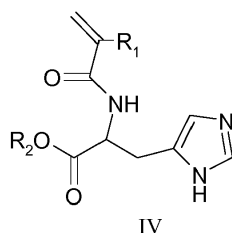
en la que

R₃ representa un grupo alquilo de C₁-C₆;

r es un número comprendido entre el 1 y el 95% de los monómeros totales, ventajosamente entre el 1 y el 10% de los monómeros totales,

ventajosamente, m + n + r = 100%.

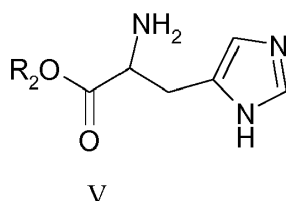
3. Procedimiento de preparación de un copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que comprende la etapa de puesta en contacto de una polietilenimina lineal solubilizada en agua a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5 con el compuesto de fórmula IV siguiente



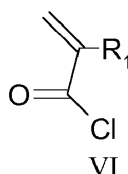
en la que R_1 y R_2 son tales como se han definido en la reivindicación 1, ventajosamente a la temperatura de reflujo del agua.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que la polietilenimina lineal tiene una masa molar media en número comprendida entre 400 Da y 1000000 de Da, ventajosamente entre 4000 y 40000 Da, aún más ventajosamente entre 10000 y 30000 Da.

5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, caracterizado por que el compuesto de fórmula general IV se obtiene por reacción del compuesto de fórmula general V siguiente



en la que R_2 es tal como se define en la reivindicación 1 con un compuesto de fórmula general VI siguiente



en la que R_1 es tal como se define en la reivindicación 1, ventajosamente en medio básico.

6. Composición farmacéutica que comprende un copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, como vector farmacéuticamente aceptable y una sustancia activa.

7. Utilización del copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, como vector farmacéuticamente aceptable de una sustancia activa en una composición farmacéutica.

8. Complejo que comprende

a) el copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2,

b) por lo menos una molécula aniónica, ventajosamente por lo menos un ácido nucleico, seleccionado en particular de entre el grupo constituido por ARN, ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN antisentido, ARN mensajero, ARN antisentido, ARN interferente, ribozimas, ARN de transferencia, ARN ribosómico, o ADN que codifica estos tipos de ARN.

9. Complejo según la reivindicación 8, en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia de genes seleccionados de entre

a) unos genes marcadores, ventajosamente seleccionados de entre los genes de:

- la luciferasa de luciérnaga;
- la proteína verde de medusa *Aequora Victoria*;
- la beta-galactosidasa de *E. Coli*;
- la cloranfenicol acetil transferasa;
- resistencia a un antibiótico, ventajosamente de resistencia a la neomicina o a la higromicina,

b) unos genes con fines terapéuticos, seleccionados ventajosamente de entre los genes que codifican para:

- unos antígenos virales, ventajosamente la nucleoproteína del virus de la gripe o la proteína NEF o GAG del virus VIH;
- unos antígenos asociados a los tumores, ventajosamente el antígeno MART1 de los cánceres con melanoma, las mucinas o el antígeno PSA de los cánceres de próstata;
- unos antígenos bacterianos;

- unos antígenos parasitarios, y

c) unos genes con fines vacunales, seleccionados ventajosamente de entre los genes que codifican:

- 5
 - la distrofina y minidistrofina;
 - la proteína CFTR "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" asociada a la mucoviscidosis;
 - la alfa1-antitripsina;
 - la eritropoyetina;
 - las citoquinas tales como las interleucinas y el TNF factor de necrosis de los tumores);
 - 10
 - los factores de crecimiento tales como el TGFbeta y el PDGF;
 - las enzimas lisosómicas tales como la beta-glucosidasa;
 - la adenosina desaminasa;
 - unos ARN sentido y antisentido;
 - unos ARN interferentes;
 - 15
 - unas ribozimas;
 - los receptores de lipoproteínas de baja densidad, deficiente en el caso de hipercolesterolemia;
 - los factores de coagulación tales como los factores VII, VIII y IX;
 - las fenilalanina-hidroxilasa;
 - la tirosina hidroxilasa;
 - 20
 - la timidina quinasa del virus Herpes simplex;
 - las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad, ventajosamente los HLA-B7;
 - la citosina desaminasa,

y los elementos que permiten su expresión.

25 10. Composición farmacéutica que comprende un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9.

30 11. Procedimiento para transferir *in vitro* un ácido nucleico en unas células, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de dichas células con por lo menos un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 o una composición según la reivindicación 10.

12. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que las células son unas células de mamíferos, ventajosamente seleccionadas de entre:

- 35
 - células cepas hematopoyéticas;
 - células del sistema inmunitario, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos;
 - células del hígado;
 - células de los músculos esqueléticos;
 - células de la piel, tales como fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas y melanocitos;
 - 40
 - células de los vasos y microvasos sanguíneos, tales como células endoteliales y células musculares lisas;
 - células epiteliales de las vías aéreas;
 - células del sistema nervioso central;
 - células cancerosas;
 - células del tejido conjuntivo, tales como tenocitos.

45 13. Utilización de un copolímero según una de las reivindicaciones 1 o 2, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al suministro intracelular de moléculas aniónicas, ventajosamente de ácido nucleico.

50 14. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, para su utilización como medicamento destinado al suministro intracelular de ácido nucleico.

55 15. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, para su utilización como medicamento destinado al tratamiento de tumores, ventajosamente de leiomioma uterino, o de tumor maligno tal como el carcinoma de los ovarios, de mama o del endometrio, para la preparación de una vacuna o para el tratamiento o para la prevención de deficiencia metabólica congénita o adquirida o de enfermedades asociadas con una expresión genética deficiente, ventajosamente al tratamiento de enfermedades relacionadas con los trastornos de un gen único tales como los síndromes de deficiencia inmunitaria combinada severa, la mucoviscidosis, la hemofilia, la drepanocitosis, la beta-talasemia y la distrofia muscular.

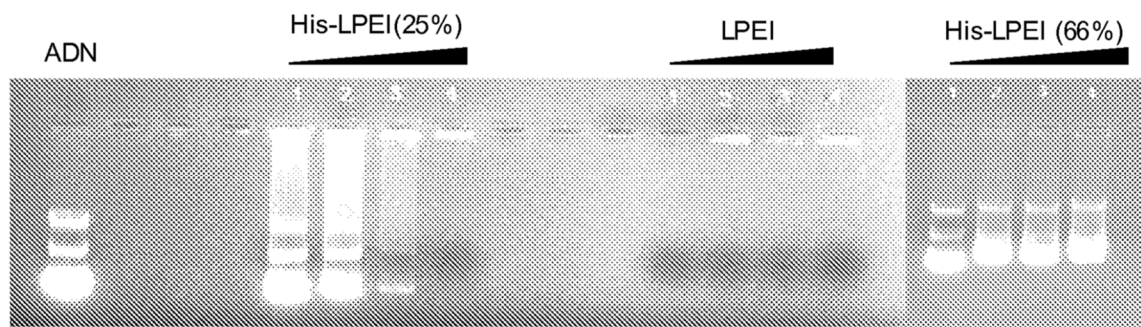


Figura 1

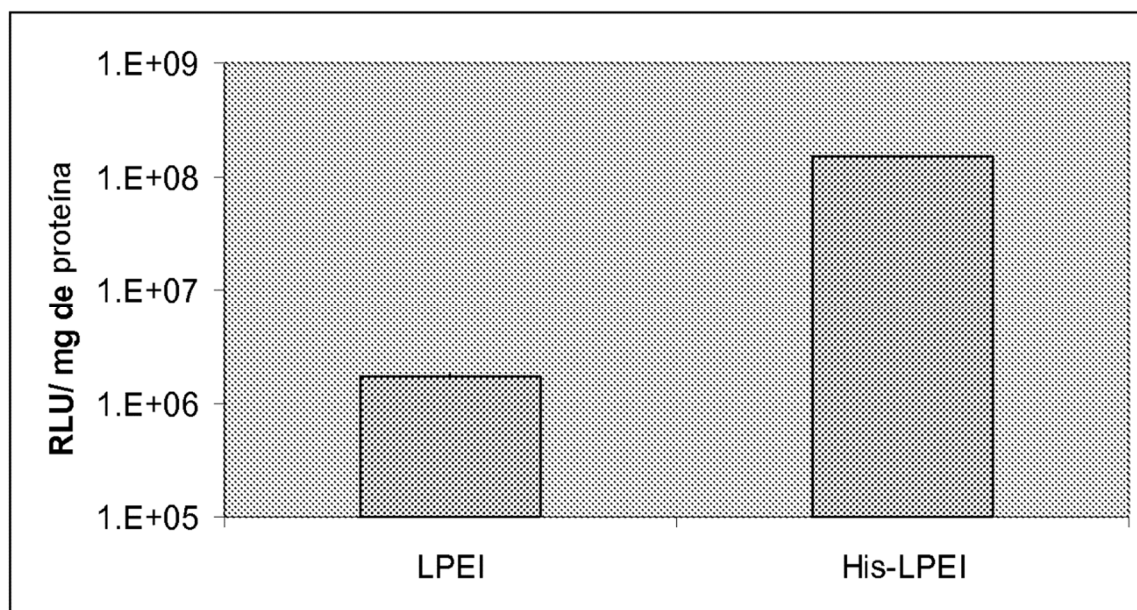


Figura 2

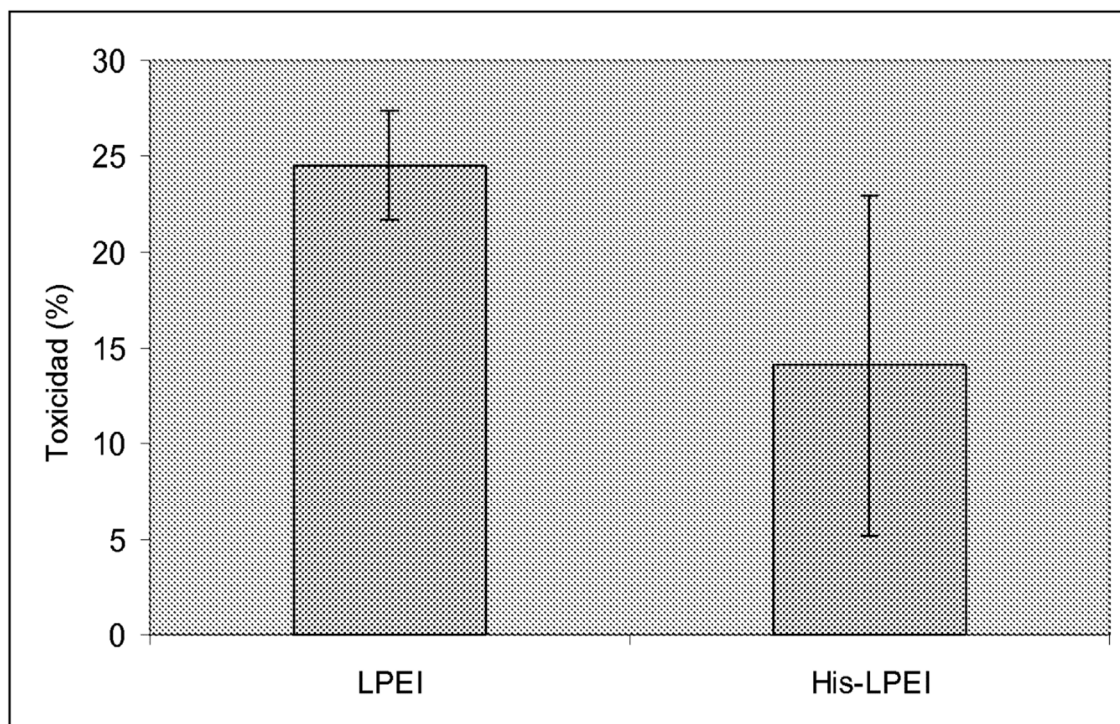


Figura 3

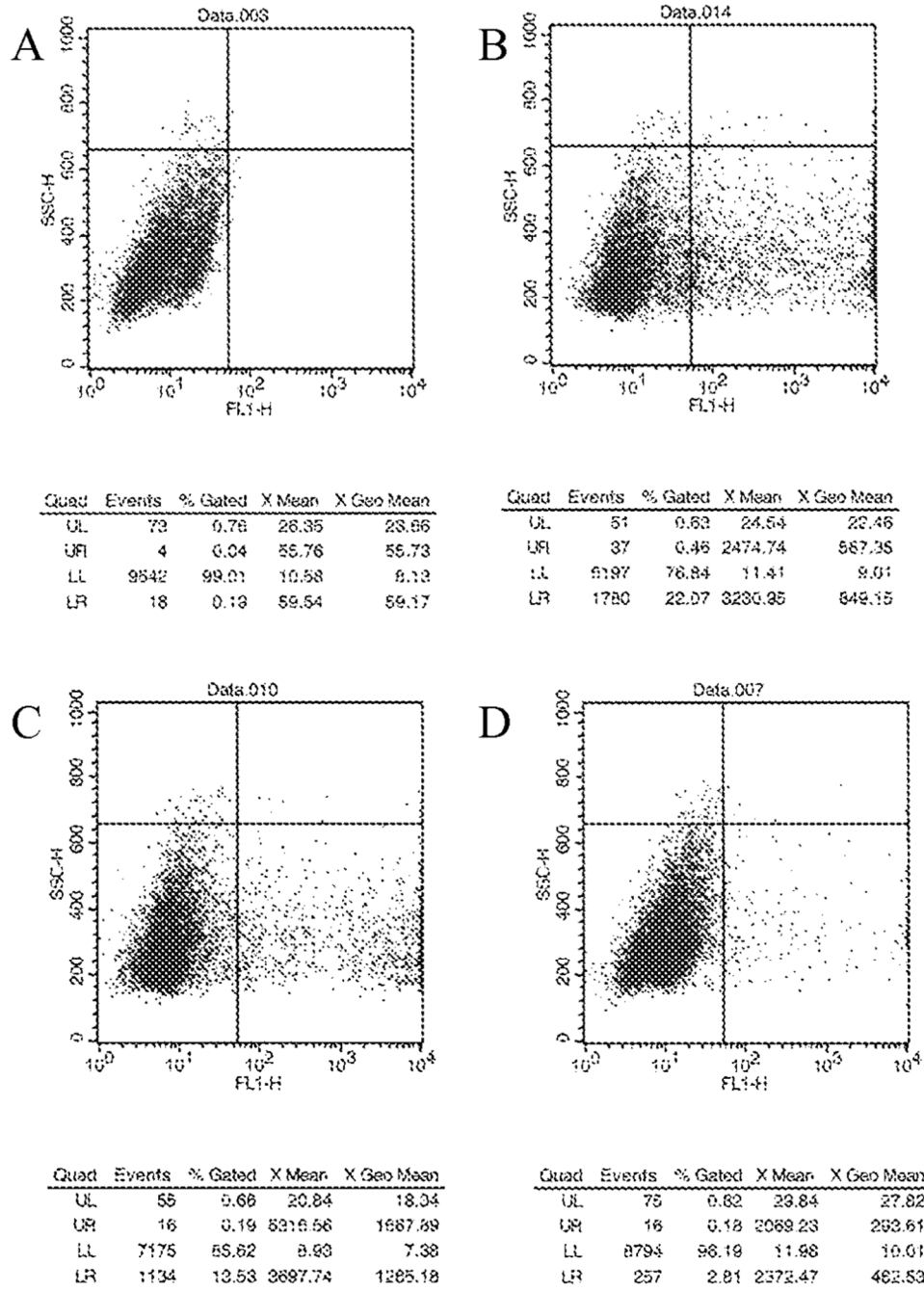


Figura 4

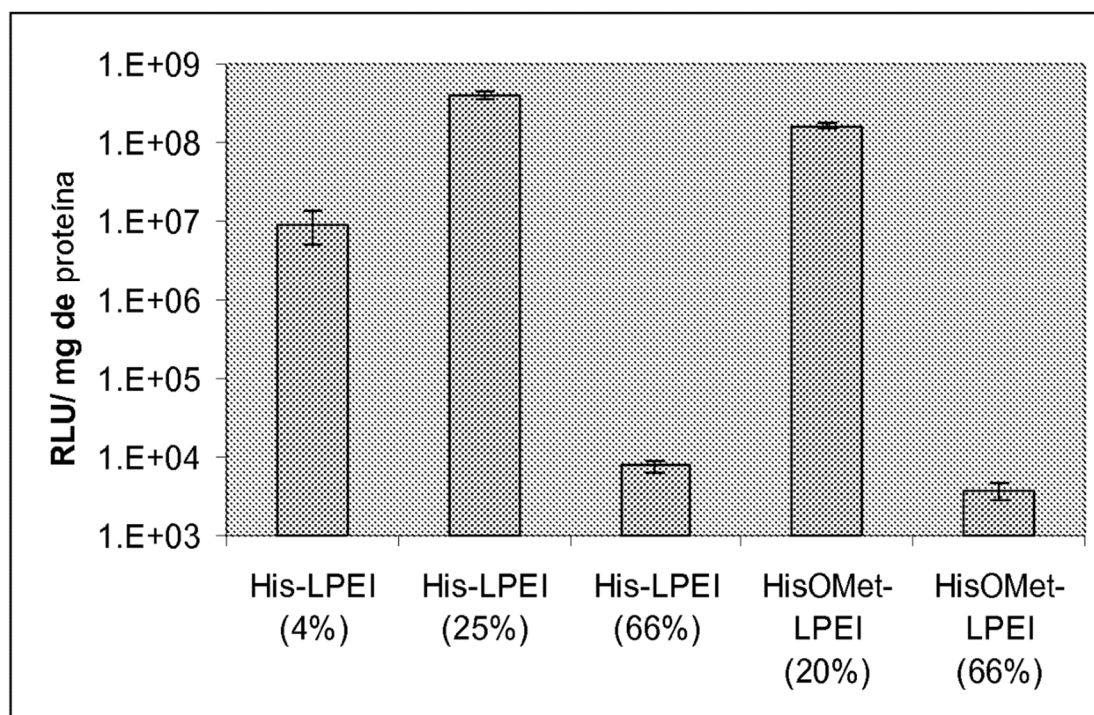


Figura 5