



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 031**

51 Int. Cl.:
A61K 51/00 (2006.01)
A61M 36/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03731378 .0**
96 Fecha de presentación : **27.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1507561**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

54 Título: **Composiciones para distribuir ácidos nucleicos a células.**

30 Prioridad: **24.05.2002 US 383201 P**
17.09.2002 US 411332 P
27.05.2003 US 445696

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2009

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Monahan, Sean y**
Trubetskoy, Vladimir

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 328 031 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para distribuir ácido nucleicos a células.

5 **Referencias cruzadas para solicitudes relacionadas**

Esta solicitud está relacionada con las solicitudes previas provisionales 60/383.201, presentada el 24 de mayo de 2002 y 60/411.332 presentada el 17 de septiembre de 2002.

10 **Antecedentes de la invención**

Los polímeros biológicamente activos tales como las proteínas, las enzimas y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) se han distribuido a las células usando los compuestos anfifáticos que contienen dominios tanto hidrófobos como hidrófilos. Típicamente, estos compuestos anfifáticos se organizan en estructuras vesiculares tales como los liposomas, micelas o estructuras de micelas invertidas. Los liposomas pueden contener un volumen acuoso que se rodea completamente de una membrana compuesta de moléculas de lípidos (normalmente fosfolípidos) [New 1990]. Para distribuir los ácidos nucleicos a las células se han usado liposomas cargados positivamente, neutros y cargados negativamente. Por ejemplo, la expresión de ADN plásmido en el hígado se ha logrado mediante liposomas distribuidos por la vena de la cola o por vías intraportales. Para empaquetar ácidos nucleicos en complejos para la distribución de los ácidos nucleicos a las células se han usado, también, las micelas cargadas positivamente.

Los polímeros se han usado, también, ampliamente, para la distribución de polímeros biológicamente activos a las células. Numerosas aplicaciones de distribución de fármacos utilizan matrices polímeras como el excipiente del fármaco. Se han usado polímeros para la distribución de ácidos nucleicos (polinucleótidos, oligonucleótidos y ARN) a las células con fines de investigación y terapéuticos. Esta aplicación se ha denominado transfección y terapia génica o terapia antisentido, respectivamente. Uno de los diversos métodos de distribución de ácido nucleico a las células es el uso de complejos ADN-policación. Se mostró que proteínas catiónicas como histonas y protaminas o polímeros sintéticos como polilisisina, poliarginina, poliornitina, DEAE dextrano, polibreno y polietilenimina son eficaces agentes de distribución intracelular. Los policaciones son un enlazador muy conveniente para asociar receptores o ligandos específicos con el complejo de ácido nucleico-policación y, como resultado, los complejos de ácido nucleico-policación pueden ser dirigidos a tipos de células específicos. Los policaciones también protegen el ácido nucleico en los complejos contra la degradación de la nucleasa. Esta protección es importante para la conservación tanto extracelular como intracelular del ácido nucleico.

El principal mecanismo de la translocación del ácido nucleico al espacio intracelular podía ser una endocitosis de adsorción no específica. La distribución del gen usando polímeros catiónicos puede incrementarse impidiendo la acidificación endosómica tal como con NH_4Cl o clorocina. Algunos polímeros, tales como polietilenimina y ácido poli(propil-acrílico), pueden poseer también membrana disruptiva o propiedades endosomalíticas. Varios informes han atribuido las propiedades de polietilenimina de distribuir el gen a un efecto tampón o de esponja de protones. La ruptura de endosomas se ha informado, también, como un resultado del enlace a los agentes disruptivos endosómicos del policación tales como los péptidos de fusión o los adenovirus.

Los policaciones pueden, también, facilitar la condensación del ácido nucleico. El volumen que una molécula de ADN ocupa en un complejo con policaciones es inferior, de manera espectacular, al volumen de una molécula de ADN libre. El tamaño de un complejo ADN/polímero es, probablemente, crítico para la distribución de genes *in vivo*. En términos de inyección intravenosa, el ADN necesita cruzar la barrera endotelial y llegar a las células parenquimales de interés. Los más grandes ventanales del endotelio (agujeros en la barrera endotelial) aparecen en el hígado y tienen un diámetro medio de 100 nm. Los poros trans-epiteliales en otros órganos son mucho más pequeños, por ejemplo, el endotelio del músculo puede describirse como una estructura que tiene un gran número de pequeños poros con un radio de 4 nm, y un número muy bajo de poros grandes con un radio de 20-30 nm. El tamaño de los complejos de ADN es, también, importante para el proceso de absorción celular. Después de enlazar con las células, el complejo ADN-policación se absorben, probablemente, por endocitosis. Por tanto, los complejos de ADN más pequeños de 100 nm son los preferidos.

55 **Sumario de la invención**

En una realización preferida, los autores de la invención describen composiciones para la distribución de un polímero biológicamente activo a una célula que comprende: compuestos que contienen amidinio cíclico. Los amidinios cíclicos son grupos derivados de la ciclación intramolecular de una amina con una amida (que da como resultado la formación de un anillo que se deshidrata) en el mismo polímero. La estructura de anillo resultante tiene una carga formal positiva, pero puede encontrarse en un polímero que tenga una carga global positiva, negativa o neutra. El tamaño del anillo puede ser de 5 a 9 átomos pero, lo más favorablemente, un anillo de 5, 6, u 8 miembros, tal como un imidazolinio, un anillo 1,3-piperazinio y un anillo heterocíclico de 8 miembros con nitrógeno en las posiciones 1 y 3. La amida puede ser alquílica, arílica, o puede tener cualquier sustitución o funcionalidad. Los polímeros y composiciones de la invención, son útiles para la distribución de compuestos a las células *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos que pueden distribuirse a las células pueden seleccionarse de la lista que comprende: polinucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ARN, siARN, análogos de ADN y de ARN, y polímeros biológicamente activos.

La presente invención se refiere, también, a composiciones que comprenden: policationes derivados de la ciclación intramolecular de polietilenimina, lineal o ramificada, acilada. Los polímeros obtenidos son copolímeros de las subunidades seleccionadas del grupo constituido por: etilamina, imidazolinio sustituido en posición 2, y N-acil-etilenamina. Un poliimidazolinio preferido es un derivado de polietilenimina lineal con N-propionilo. Los polímeros y composiciones de la invención pueden usarse para la distribución de compuestos a células *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos que pueden ser distribuidos a las células usando los polímeros descritos pueden ser seleccionados de la lista que comprende: polinucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ARN, si-ARN, análogos de ADN y de ARN, y polímeros biológicamente activos.

La presente invención prevé la transferencia de polinucleótidos, y otros polímeros biológicamente activos, a células *in vitro* e *in vivo*, que comprende: asociar el polímero biológicamente activo con un compuesto seleccionado del grupo constituido por: compuestos que contienen amidinio cíclico, compuestos que contienen amidinio policíclico, compuestos que contienen imidazolinio, compuestos poliimidazolinio, compuestos que contienen imidazolina, compuestos poliimidazolina, compuestos que contienen anillos 1,3-piperazinio y compuestos con anillo poli(1,3-piperazinio); y distribuir el complejo a la célula. El complejo puede ser distribuido por vía intravascular, intrarterial, intravenosa, oral, intraduodenal, por el yeyuno (o por el íleon o por el colon), por vía rectal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraparenteral, por inyecciones directas sobre el tejido, por las membranas mucosas, o en los conductos de las glándulas exocrinas salivales u otras. El polímero puede ser modificado para contener uno o más grupos funcionales que realcen la distribución del polinucleótido de otro polímero biológicamente activo a la célula.

Otros objetivos, características y ventajas de la invención serán evidentes de la descripción detallada siguiente cuando se toman conjuntamente con los dibujos que se adjuntan.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1A-1B. Ilustraciones de las estructuras químicas para (A) amidina cíclica y (B) amidinio cíclico.

Fig. 2. Ilustración de una reacción de transamidación.

Fig 3. Ilustraciones de las estructuras químicas de anillos heterocíclicos de imidazolinio.

Fig. 4. Ilustración de la formación de imidazolinio a partir de N-acil-N,N'-difenil-etilendiamina.

Fig. 5. Ilustración de la formación de imidazolinio a partir de N-alkilación de un anillo de imidazolina.

Fig. 6. Ilustración de las formaciones de un polímero de poliimidazolina y un polímero de poli-imidazolinio.

Fig. 7. Ilustraciones para la hidrólisis ácida y la hidrólisis básica de una amida.

Fig. 8. Ilustración de la estructura química de 2-imidazolina.

Fig. 9. Ilustración de la estructura química de 1,3-piperazinio.

Fig. 10. Ilustración de la polimerización química para formar polietilenimina ramificada.

Fig. 11. Ilustración de la polimerización química para formar polietilenimina lineal.

Fig. 12. Espectros UV de IPEI sustituida un 10% con N-propionilo incubada a 4°C (1) o agitada a 37°C (2). La concentración de polímero era de 0,2 mg/ml en agua.

Fig. 13. Espectros de IR de IPEI sustituida un 10% con N-propionilo incubada a 4°C (1) o agitada a 37°C (2).

Fig. 14. Comparación de la transfección de pulmón *in vivo* después de inyección, en la vena de la cola, de complejos ADN/polication que contienen IPEI (no curada) sustituida con N-propionilo o polímero que contiene imidazolinio (curado).

Fig. 15. Efecto del pH en la formación de anillo de imidazolinio en IPEI sustituida con N-propionilo medido por absorbancia UV.

Fig. 16. Ilustraciones de las estructuras químicas de polímeros MC1016 (N,N'-dimetiletildiamina monopropionilada) y MC1017 (N,N'-dimetiletildiamina N,N'-dipropionilada).

Fig. 17. Espectros UV de MC1016 calentada a 70°C frente a no tratada.

Fig. 18. Espectros UV de la formación de amidinio a partir de pentaetilenhexamina monoacilada.

Fig. 19. Espectros UV de la formación de polímero de poliimidazolinio.

Fig. 20. Espectros UV de la formación de yoduro de 1,2-dimetil-imidazolinio, yoduro de 1,2,3-trimetil-imidazolinio y 1,1,4-trimetil-4-acil-etilendiamina.

Fig. 21. Espectros UV del polímero que contiene imidazolinio derivado de la polimerización de 2-metil-2-imidazolina y epíclorohidrina.

Fig. 22. Espectros UV del polímero que contiene imidazolinio derivado de la polimerización de 2-metil-2-imidazolina y poliepiclorohidrina.

10 Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención describen una nueva clase de compuestos que contienen amidinio cíclico (Fig. 1) que facilitan la distribución de polímeros biológicamente activos a las células. Específicamente, la invención se refiere a compuestos que contienen estructuras de anillo heterocíclico catiónico derivado de la adición en 1,2 intramolecular de una amina a una amida, seguido por deshidratación. En esta invención, se contemplan polímeros con cuatro a once, y más preferiblemente cuatro a siete, enlaces de amina alejados de un carbonilo de amida que pueden experimentar esta ciclación intermolecular. Estos polímeros contienen sistemas de anillo 1,3-heterocíclico que poseen una carga formal positiva. La amida puede formarse en un polímero preformado mediante una reacción de acilación bien conocida en la técnica. Además, puede sintetizarse un polímero que contiene una amida; por ejemplo, el polímero resultante de la polimerización de una 2-oxazolina. Una hidrólisis de amida controlada puede conducirse para sintetizar un polímero con la proporción deseada de unidades que contienen amida y unidades que contienen amina libre (o sal de amina protonada). El polímero resultante puede entonces tamponarse entre pH 2-8 y dejar que experimente la reacción de ciclación. Estos polímeros pueden seleccionarse de la lista que comprende: polietileniminas parcialmente aciladas (PEI, *br*PEI), polivinilamina parcialmente acilada, polialilamina parcialmente acilada, y polipropilamina parcialmente acilada. Las estructuras de anillo formadas pueden seleccionarse de la lista que comprende: anillos de imidazolinio, anillos 1,3-piperazinio, y anillo heterocíclico de 8 miembros con nitrógeno en posiciones 1 y 3.

La Fig. 1A representa un anillo de amidina. El anillo de amidina puede ser alquilado en el nitrógeno para proporcionar un anillo de amidinio (Fig. 1B). El anillo de amidinio puede formarse, también, a partir de la ciclación intramolecular y deshidratación de una amida y una amina.

En un amidinio (subunidad amidinio), los sustituyentes R1, R2, R3 pueden ser independientemente un radical hidrógeno o un radical carbono con cualquier sustitución. El anillo puede ser de 5 a 12 átomos, y puede contener heteroátomos adicionales además de los átomos de nitrógeno en posiciones 1 y 3. Además, el anillo puede sustituirse en otras posiciones, independientemente de que sea un radical hidrógeno, un radical carbono con cualquier sustitución, o un radical heteroátomo con cualquier sustitución. El contraión (X) puede ser cualquier contraión. Los contraiones incluyen pero no se limitan a cloruro, bromuro, yoduro y tosilato.

Un poliamidinio es un polímero (copolímero aleatorio, copolímero de bloques u otro copolímero) que contiene dos o más subunidades amidinio. Un poliamidinio significa, también, un homopolímero de la subunidad amidinio. La subunidad amidinio puede estar en la cadena principal del polímero o como una cadena lateral fuera de la cadena principal del polímero. El polímero puede ser un polímero neutro neto, un policatión o un polianión.

Una poli(2-amidina) es un polímero (polímero aleatorio o polímero de bloques) que contiene una o más subunidades amidina. Una poli(2-amidina) significa también un homopolímero de la subunidad 2-amidina. La subunidad amidina puede estar en la cadena principal del polímero o como una cadena lateral fuera de la cadena principal del polímero. El polímero puede ser un polímero neutro neto, un policatión, o un polianión.

En una 2-amidina (subunidad amidina), los sustituyentes R1, R2 pueden ser, independientemente, un radical hidrógeno o un radical carbono con cualquier sustitución. El anillo puede ser de 5 a 12 átomos y puede contener heteroátomos adicionales además de átomos 1,3-nitrógeno. Además, el anillo puede estar sustituido en otras posiciones, siendo, independientemente, un radical hidrógeno, un radical carbono con cualquier sustitución o un radical heteroátomo con cualquier sustitución.

Las amidas experimentan diversas transformaciones químicas. Por ejemplo, las amidas se conocen por reaccionar con amidas o lactamos (amidias cíclicas) en una reacción de transamidación, dando como resultado la formación de un nuevo enlace amida (y un producto de expansión de anillo correspondiente en el caso de lactamos) [Chimishkyan 1985; García 1982; Stach 188; Krammer 1977; Krammer 1978; Askitoglu 1985]. Las reacciones de transamidación se conocen por ser sustitución dependiente tanto de la amina como de la amida. Fig. 2.

Se ha informado de las reacciones de transamidación intramoleculares tanto en las amidas de alquilo como en las amidas de arilo. También, se ha informado de las reacciones intramoleculares entre aminas y amidas. En numerosos estudios, se ha observado una deshidratación del producto inicial de la adición. Esta reacción lleva a la formación de un anillo heterocíclico, en concreto a la formación de un sistema de anillo imidazolinio (Fig. 3A) [May *et al.* 1951; Jaenicke *et al.* 1959; Hafferl, *et al.* 1963; Barnett *et al.* 1966]. En particular, la reacción de ciclación se ha estudiado en derivados monoacilados de N,N'-difeniletildiamina (Fig. 4). A medida que el anillo de imidazolinio (Fig. 4B) se forma en la ciclación, hay un cambio en la absorbancia UV del material, con una nueva absorbancia que se desarrolla en el intervalo de $\lambda = 220-240$ nm. Los informes indican que la reacción es reversible, dependiendo

del pH de la solución, favoreciendo un imidazolínio en condiciones desde casi neutras a ácidas, y como un anillo abierto β -amino-amida en condiciones básicas. Además de los métodos de preparación adición-deshidratación, puede formarse un anillo imidazolínio mediante la N-alquilación de la imidazolina correspondiente (Fig. 5) [Anderson *et al.* 1986; Gruseck *et al.* 1987; Fernandez *et al.* 1987; Salerno *et al.* 1992; Perillo *et al.* 1975] a través de una ciclación de ión nitriló [Leonard 1965; Pfeil *et al.* 1965; Leonard *et al.* 1967], o por una reacción de ciclación de una sal de diazapentadínio [Lloyd *et al.* 1978].

Los sistemas de imidazolínio se han desarrollado como tensioactivos para uso como inhibidores de corrosión. Además, se han preparado lípidos de imidazolínio, y se han formulado con ADN en un complejo [Lasic *et al.* 1997], y con ADN para un sistema de distribución liposómica *in vivo* [Niven *et al.* 1998]. También, se han preparado polímeros de imidazolina e imidazolínio (Fig. 6). Estos sistemas de polímeros han encontrado uso como ayudantes de floculación para el desaguado de lodos. Los autores de la invención muestran ahora que los sistemas de amidínio policíclico son útiles para la distribución de ácido nucleico a las células.

La hidrólisis de amidas es un método bien conocido en la técnica y puede realizarse con procedimientos catalizados tanto por ácidos como por bases (Fig. 7). Ambos métodos dan como resultado la formación de 1 equivalente de ácido carboxílico (o ión carboxilato) y 1 equivalente de amina (o ión de amonio), y son fundamentalmente irreversibles. Generalmente, la hidrólisis de amida catalizada por bases es menos fiable que la hidrólisis ácida y por tanto, generalmente, no se usa. La hidrólisis de amida no es tan fácil como la hidrólisis de ésteres y, normalmente, requiere condiciones más rigurosas, tales como temperatura elevada.

Poliimidazolínio: Un poliimidazolínio es un polímero (copolímero aleatorio, copolímero de bloques u otro copolímero) que contiene dos o más subunidades imidazolínio. Un poliimidazolínio significa, también, un homopolímero de la subunidad imidazolínio. La subunidad imidazolínio puede estar en la cadena principal del polímero o como una cadena lateral fuera de la cadena principal del polímero. El polímero puede ser un polímero neutro neto, un polication o un polianión.

Subunidad imidazolínio: En un imidazolínio (subunidad imidazolínio), los sustituyentes R1, R2, R3, R4a, R4b, R5a y R5b (Fig. 3) pueden ser, independientemente, un radical hidrógeno o un radical carbono con cualquier sustitución. El contraión (X) puede ser cualquier contraión. Los contraiones incluyen pero no se limitan a cloruro, bromuro, yoduro y tosilato. Un anillo de imidazolínio puede formarse mediante la N-alquilación de la imidazolina correspondiente (Fig. 5).

Poli-2-imidazolina: Una poli-2-imidazolina es un polímero (polímero aleatorio o polímero de bloques) que contiene 2 o más subunidades imidazolina. Una poli-2-imidazolina significa, también, un homopolímero de la subunidad 2-imidazolina. La subunidad imidazolina puede estar en la cadena principal del polímero o como una cadena lateral fuera de la cadena principal del polímero. El polímero puede ser un polímero neutro neto, un polication o un polianión.

Subunidad 2-imidazolina: En una 2-imidazolina (subunidad imidazolina), los sustituyentes R1, R2, R4a, R4b, R5a y R5b (Fig. 8) pueden ser, independientemente, un radical hidrógeno o un radical carbono con cualquier sustitución.

Poli(1,3-piperazínio): Un poli(1,3-piperazínio) es un polímero (copolímero aleatorio, copolímero de bloques u otro copolímero) que contiene 2 o más subunidades 1,3-piperazínio. Un poli(1,3-piperazínio) significa, también, un homopolímero de la subunidad 1,3-piperazínio. La subunidad 1,3-piperazínio puede estar en la cadena principal del polímero o como una cadena lateral fuera de la cadena principal del polímero. El polímero puede ser un polímero neutro neto, un polication o un polianión.

1,3-piperazínio (Subunidad 1,3-piperazínio) (Fig. 9): En un 1,3-piperazínio (subunidad 1,3-piperazínio), los sustituyentes R1, R2, R3, R4a, R4b, R5a, R5b, R6a y R6b pueden ser, independientemente, un radical hidrógeno o un radical carbono con cualquier sustitución. El contraión (X) puede ser cualquier contraión. Los contraiones incluyen pero no se limitan a cloruro, bromuro, yoduro y tosilato.

Los polímeros de amidínio policíclico pueden prepararse a partir de una clase de polímeros denominados polietileniminas. Las propias polietileniminas se han usado frecuentemente en el área de la distribución de ácido nucleico. La polietilenimina se conoce en dos versiones preparadas mediante dos procesos de polimerización característicos. La polietilenimina ramificada (*brPEI*) se prepara por polimerización de aziridina (etilenimina) (Fig. 10). Durante la reacción de polimerización, las aminas primaria y secundaria formadas pueden actuar como nucleófilos, atacando otra molécula de aziridínio para producir una estructura muy ramificada. La composición de *brPEI* comercialmente disponible se ha evaluado recientemente que contiene una proporción de los grupos aminos de amina primaria : amina secundaria : amina terciaria de 1:1:1 [Kissel 2000]. La *brPEI* se puede polimerizar, también, en condiciones de que se obtenga un grado inferior de ramificación, dando como resultado una proporción de los grupos aminos de amina primaria : amina secundaria : amina terciaria de 1:2:1.

Se ha mostrado que la polietilenimina lineal (*lPEI*) exhibe una inferior citotoxicidad si se compara con la *brPEI* y es un eficaz agente de transferencia de genes. [Boussif *et al.* 1995; Behr 1999; Reny 1998; Patente de Estados Unidos N° 6.013.240; Park *et al.* 2001]. La *lPEI* lineal se obtiene mediante una polimerización de apertura de anillo de la N-alquil-2-oxazolona, seguido por desprotección inducida por ácidos de la amida resultante (Fig. 11). El polímero

se representa por la fórmula general: $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_n-(\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{R}$, en la que el grupo R se deriva del iniciador usado en la reacción de polimerización (la figura representa el oxazolínio final que es hidrolizado al hidroxilo terminal). Por ejemplo, se la polimerización se inicia con yoduro de metilo, el grupo R en la estructura sería CH_3 . La PEI lineal vendida para aplicaciones de terapia génica [Polyplus-transfección SAS (JetPEI); Fermentas (ExGen500)], se ha descrito como un polímero lineal de etilamina, que contiene todas las aminas secundarias, como se representa en la figura.

Las polietileniminas pueden acilarse en el átomo de nitrógeno según métodos bien conocidos en la técnica. Los polímeros resultantes tienen cuatro enlaces carbonilo de amida a partir de una amina. Estos polímeros pueden recogerse en soluciones acuosas a pH 8 o inferior, y calentarse suavemente o almacenarse durante períodos a temperatura ambiente para facilitar la reacción de ciclación para formar el anillo de amidínio cíclico, en concreto un anillo de imidazolinio. El polímero resultante es, por tanto, una combinación de etilenimina, N-acil-etilenimina (de amidas que no ciclan), y monómeros de imidazolinio sustituidos en posición 2. La proporción de los monómeros en el polímero final puede controlarse por el nivel de acilación de la polietilenimina. Además, se contempla la funcionalidad adicional puede incluirse fácilmente en el sistema uniendo la funcionalidad a un átomo de nitrógeno en la polietilenimina mediante una acilación. La amida resultante estaría disponible para experimentar la reacción de ciclación, proporcionando un imidazolinio 2-sustituido que contiene la funcionalidad atada a la posición 2 del anillo de imidazolinio.

El tamaño de un complejo de ácido nucleico/policación puede ser un factor para la distribución de genes a las células, particularmente *in vivo*. Habitualmente, el tamaño de un ácido nucleico de interés es grande, demasiado grande para facilitar la distribución sin compactar, o condensar, el ácido nucleico. Para la distribución *in vivo*, el complejo necesita cruzar la barrera endotelial para alcanzar las células parenquimales. Los ventanales más grandes del endotelio (agujeros en la barrera endotelial) aparecen en el hígado y tienen diámetros medios de 100 nm. Los poros trans-epiteliales en otros órganos son mucho más pequeños. El endotelio del músculo, por ejemplo, puede describirse como una estructura que tiene un gran número de pequeños poros, de radio 4 nm, y un número muy bajo de grandes poros con un radio de 20-30 nm. El tamaño del complejo puede, también, ser importante para la absorción celular, siendo las partículas más pequeñas las más fácilmente endocitadas.

Hay dos métodos principales para compactar el ácido nucleico: 1. Se ha mostrado que los cationes multivalentes con una carga de tres o superior condensan espontáneamente el ácido nucleico en condiciones tampón apropiadas. Estos cationes multivalentes incluyen espermidina, espermina, $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, Fe^{3+} y polímeros naturales o sintéticos tales como histona H1, protamina, polilisina y polietilenimina. Un análisis ha mostrado que la condensación de ácido nucleico se ve favorecida cuando el 90% o más de las cargas a lo largo de la cadena principal azúcar-fosfato se neutralizan [Wilson *et al.* 1979]. 2. Los polímeros (neutros o aniónicos) pueden incrementar la repulsión entre el ácido nucleico y su entorno, y se ha mostrado que compactan el ácido nucleico. Lo más significativamente, se ha mostrado que el proceso espontáneo de automontaje y agregación del ácido nucleico resulta de la restricción de grandes cantidades de ácido nucleico, debido al efecto del volumen excluido. [Strzelecka 1990a; Strzelecka 1990b]. Ya que el auto-montaje se asocia con soluciones densas de ácido nucleico local o macroscópicamente, se espera que la inserción de ácido nucleico en pequeñas cavidades de agua con un tamaño comparable al ácido nucleico tenderá a formar estructuras, monomoleculares u oligomoleculares, compactas.

El mecanismo de condensación de ácido nucleico no está claro. La fuerza electrostática entre hélices no perturbadas se eleva principalmente a partir de un mecanismo de fluctuación del contraíón que requiere cationes multivalentes y juega un papel principal en la condensación del ácido nucleico. Las fuerzas de hidratación predominan sobre las fuerzas electrostáticas cuando las hélices del ácido nucleico se acercan más que unos pocos diámetros de agua. En un ejemplo de interacciones de ácido nucleico/policación polímero, la condensación de ácido nucleico es un proceso más complicado que el ejemplo de policaciones de bajo peso molecular. Diferentes proteínas policaciónicas pueden generar formaciones en toroide y en varilla con un ácido nucleico en una proporción de carga positiva a negativa de 2-5. Los complejos de ADN T4 con poliarginina o histona pueden formar dos tipos de estructuras; una estructura alargada con una longitud del eje mayor de aproximadamente 350 nm (como ADN libre) y partículas esféricas densas. Ambas formas existen simultáneamente en la misma solución. La razón para la coexistencia de las dos formas puede explicarse como una distribución irregular de las cadenas de policación entre las moléculas de ácido nucleico. La distribución irregular genera dos conformaciones termodinámicamente favorables.

La movilidad electroforética de los complejos de ácido nucleico/policación puede cambiar de negativo a positivo en presencia de policación en exceso. Probablemente es que los grandes policaciones no se alinean completamente a lo largo del ácido nucleico sino que forman bucles de polímero que interactúan con otras moléculas de ácido nucleico. La rápida agregación y las grandes fuerzas intermoleculares entre diferentes moléculas de ácido nucleico pueden impedir el lento ajuste entre hélices necesario para formar partículas compacta y ordenadamente empaquetadas.

Los polímeros de amidínio policíclico pueden prepararse tal que tengan suficiente carga positiva para formar complejos con el ácido nucleico. Alternativamente, los monómeros de amidínio cíclico y los pequeños monómeros de amidínio policíclico pueden polimerizarse usando un proceso denominado de polimerización por plantilla. Los cationes de bajo peso molecular con valencia, es decir carga, $<+3$ no condensan el ADN en soluciones acuosas en condiciones normales. Sin embargo, las moléculas catiónicas con la carga $<+3$ pueden polimerizarse en presencia de ácido polinucleico y los polímeros resultantes pueden causar que el ácido polinucleico condense en estructuras compactas. Tal método se conoce en la química de los polímeros sintéticos como polimerización por plantilla. Durante este proceso, los monómeros (que están inicialmente débilmente asociados con la plantilla) se colocan a lo largo

de la cadena principal de la plantilla, fomentando de ese modo su polimerización. La débil asociación electrostática del polímero activo y de la plantilla se vuelve más fuerte con el crecimiento de la cadena del polímero. Trubetskoy *et al* usaron dos tipos de reacciones de polimerización para lograr la condensación del ADN: polimerización por etapas y polimerización en cadena [Trubetskoy *et al.* 1998; U.S. 08/778.657; U.S. 09/000.692; U.S. 97/24.089; U.S. 09/070.299; y U.S. 09/464.871]. La bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (AEPD), una tetramina con 2,5 cargas positivas por molécula a pH 8 se polimerizó en presencia de ADN plásmido usando los reticuladores divisibles de disulfuro amino-reactivos ditiobis-(succinimidil-propionato) y dimetil-3,3'-ditiobis-propionimidato. Ambas reacciones produjeron complejos ADN/polímero con un retraso significativo en la electroforesis de geles de agarosa, demostrando así una unión significativa y condensación de ADN. Blessing *et al* usaron un derivado de bis-tiol de espermina y una reacción de intercambio tiol-disulfuro para activar el crecimiento de la cadena. La presencia de ADN aceleró la reacción de polimerización que se midió por la velocidad de desaparición de los tioles libres en la mezcla de reacción [Blessing *et al.* 1998].

Para incrementar la estabilidad de un complejo poli(amidinio cíclico)/ácido nucleico el polímero puede reticularse. La estabilidad de las partículas de ácido nucleico, basadas en la condensación de ácido polinucleico, es generalmente baja *in vivo* o en presencia de otros polianiones porque los complejos se comprometen fácilmente en reacciones de intercambio de polianiones. El proceso de intercambio consta de dos etapas: 1) formación rápida de un complejo triple ácido nucleico-policación-polianión, 2) sustitución lenta de un polianión (ácido nucleico) con otro. En condiciones de equilibrio, este proceso da como resultado la formación de un nuevo complejo binario y un exceso de un tercer polianión. La presencia de una sal de bajo peso molecular puede acelerar enormemente tales reacciones de intercambio, que a menudo dan como resultado el completo desmontaje de las partículas de ácido nucleico condensadas. En consecuencia, es deseable obtener estructuras más coloidalmente estables en las que el ácido nucleico sea retenido en forma condensada en el complejo con el policación independiente de las condiciones ambientales.

En los complejos típicos ácido nucleico/policación, en los que el ácido nucleico se condensa completamente, las cargas positivas desaparecidas en el policación quedan disponibles. Si el policación contiene grupos reactivos, tales como aminas primarias, estas cargas positivas desaparecidas pueden modificarse. Esta modificación permite posibilidades prácticamente ilimitadas de modular las propiedades coloidales de los complejos mediante modificaciones químicas del complejo. Los autores de la invención han demostrado la utilidad de tales reacciones usando un sistema ADN/poli-L-lisina (ADN/PLL) reticulado con el reactivo de reticulación bifuncional dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP) que reacciona con grupos amino primarios [Trubetskoy *et al.* 1999b; documentos U.S. 08/778.657; U.S. 09/000.692; U.S. 97/24.089; U.S. 09/070.299; y U.S. 09/464.871]. Resultados similares se lograron con otros policaciones incluyendo poli(alilamina) e histona H1. El uso de otro reactivo bifuncional, glutaraldehído, se ha descrito por estabilización de complejos de ADN con péptido catiónico CWK18 [Adam *et al.* 1999].

La aproximación de enjaulado descrita anteriormente puede conducir a partículas que contienen ácido nucleico condensado más coloidalmente estables. Sin embargo, para algunas aplicaciones de distribución puede desearse alterar la carga superficial de un complejo ácido nucleico/policación. El fenómeno de recargar la superficie es bien conocido en la química coloidal y se describe en gran detalle por sistemas lipófilos/lipófilos (por ejemplo, hidrosoles de haluro de plata). La adición de poli-ion a una suspensión de partículas de látex con la superficie con carga opuesta conduce a la absorción permanente de este poli-ion sobre la superficie y, después de alcanzar la estequiometría apropiada, invertir la carga de la superficie. Los autores de la invención han demostrado que puede lograrse la estratificación similar de polielectrolitos sobre la superficie de las partículas de ADN/policación [Trubetskoy *et al.* 1999c]. El principal complejo ADN-policación (ADN/pC) usado en este estudio era el ADN/PLL (relación de carga 1:3) formado en tampón poco salino HEPES de 25 mM y recargado con cantidades crecientes de varios polianiones. Las partículas de ADN se caracterizaban después de añadir un tercer componente poli-ion a un complejo ADN/policación [Trubetskoy *et al.* 1999c]. Se encontró que ciertos polianiones, tales como poli(ácido metacrílico) y poli(ácido aspártico), descondensaban ADN en complejos de ADN/PLL. Polianiones de densidad de carga inferior, tales como PLL y poli(ácido glutámico) succinilados, no descondensaban ADN en los complejos ADN/PLL (1:3) incluso cuando se añadían a PLL 20 veces en exceso de carga. Estudios adicionales han encontrado que los efectos de desplazamiento dependen de las sales. Las medidas del potencial- ζ de las partículas de ADN/PLL durante la titulación con SPLL reveló el cambio de carga superficial de la partícula en aproximadamente el punto de equivalencia de la carga. Por ello, puede concluirse que la adición de polianión de baja densidad de carga a las partículas catiónicas de ADN/PLL da como resultado la inversión de la carga superficial de la partícula mientras se mantiene intacto el núcleo del ADN condensado. Por último, los complejos de ADN/policación pueden ser tanto recargados como reticulados o enjaulados [U.S. 08/778.657, U.S. 09/000.692, U.S. 97/24.089, U.S. 09/070.299 y U.S. 09/464.871]. Esta capa de polianión que se recarga puede reticularse para sí misma o para los policaciones en el complejo para aumentar la estabilidad coloidal.

Varias modificaciones de las partículas de ácido nucleico/cación se han creado para eliminar las interacciones no específicas de las partículas de ácido nucleico-cación y la toxicidad de las partículas catiónicas. Ejemplos de estas modificaciones incluyen la unión de estabilizantes estéricos, por ejemplo, polietilenglicol, que inhiben las interacciones no específicas entre el cation y los polianiones biológicos.

Un *polímero* es una molécula aumentada mediante uniones repetitivas entre sí de unidades más pequeñas denominadas monómeros. En esta aplicación, el término polímero incluye tanto oligómeros, que tienen de dos a aproximadamente 80 monómeros, y polímeros que tienen más de 80 monómeros. El polímero puede ser de los tipos de polímero lineal, de red ramificada, de estrella, de peine, o de rosario. El polímero puede ser un homopolímero en el que se usa

ES 2 328 031 T3

un solo monómero o puede ser un copolímero en el que se usan dos o más monómeros. Los tipos de copolímeros incluyen alternantes, aleatorios, de bloques o injertados.

Para los especialistas en la técnica de la polimerización, hay varias categorías de procesos de polimerización que pueden ser utilizados en el procedimiento descrito. La polimerización puede ser en cadena o por etapas. Esta descripción de la clasificación se usa más frecuentemente que la terminología previa de polímero de adición y de condensación. “La mayoría de las polimerizaciones por reacción en etapas son procesos de condensación y la mayoría de las polimerizaciones por reacción en cadena son procesos de adición” [Stevens 1990]. La polimerización por plantilla puede usarse para formar polímeros a partir de polímeros hijos.

La polimerización en cadena: En la polimerización por reacción en cadena el crecimiento del polímero tiene lugar por adición sucesiva de unidades de monómero hasta un número limitado de cadenas en crecimiento. Los mecanismos de iniciación y propagación son diferentes y hay normalmente una etapa de terminación de la cadena. La velocidad de polimerización permanece constante hasta que el monómero se consume. Los monómeros que contienen (pero no se limitan a ellos) grupos vinilo, acrilato, metacrilato, acrilamida y metacrilamida pueden experimentar reacción en cadena que puede ser por radicales, aniónica o catiónica. La polimerización en cadena puede también realizarse mediante polimerización por apertura de ciclo o de anillo. Varios tipos diferentes de iniciadores por radicales libres podían usarse que incluyen peróxidos, hidroxiperóxidos, y azocompuestos tales como dihidrocloruro de 2,2'-azobis-(amidinopropano) (AAP).

Tipos de monómeros

En los procesos de polimerización pueden usarse una gran variedad de monómeros. Estos incluyen monómeros orgánicos de carga positiva tales como sales de aminas, imidina, guanidina, imina, hidroxilamina, hidroziina, de heterociclo (sales) como imidazol, piridina, morfolina, pirimidina o pireno. Las aminas podían ser sensibles al pH en el que el pKa de la amina está dentro del intervalo fisiológico de 4 a 8. Aminas específicas incluyen espermina, espermidina, N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (AEPD) y bromuro de 3,3'-diamino-N,N-dimetildipropilamonio.

Los monómeros también pueden ser hidrófobos, hidrófilos o anfifáticos. Los compuestos anfifáticos tienen partes tanto hidrófilas (solubles en agua) como hidrófobas (insolubles en agua). Los grupos hidrófilos indican en términos cualitativos que el resto químico prefiere agua. Típicamente, tales grupos químicos son solubles en agua y son dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno con el agua. Ejemplos de grupos hidrófilos incluyen compuestos con los siguientes restos químicos: carbohidratos, polioxietilenos, péptidos, oligonucleótidos y grupos que contienen aminas, amidas, alcoxi-amidas, ácidos carboxílicos, azufres o hidroxilos. Grupos hidrófobos indican en términos cualitativos que el resto químico evita el agua. Típicamente, tales grupos químicos no son solubles en agua y no tienden a formar enlaces de hidrógeno. Los hidrocarburos son grupos hidrófobos.

Los monómeros pueden ser, también, agentes intercalantes tales como acridina, naranja de tiazol, o bromuro de etidio. Los monómeros pueden contener, también, restos químicos que pueden ser modificados antes o después de la polimerización incluyendo (pero no limitándose a eso) aminas (primaria, secundaria y terciaria), amidas, ácido carboxílico, éster, hidroxilo, hidracina, haluro de alquilo, aldehído y cetona.

Un polication es un polímero que contiene una carga neta positiva. El polication puede contener unidades monómeras que son de carga positiva, de carga neutra o de carga negativa, sin embargo, la carga neta del polímero debe ser positiva. Un polication también puede significar una molécula no polímera que contiene dos o más cargas positivas. Un polianión es un polímero que contiene una carga neta negativa, por ejemplo ácido poliglútamico. El polianión puede contener unidades monómeras que son de carga negativa, de carga neutra o de carga positiva, sin embargo, la carga neta en el polímero debe ser negativa. Un polianión puede significar, también, una molécula no polímera que contiene dos o más cargas negativas. El término polianión incluye polication, polianión, polímeros híbridos y polímeros neutros. El término híbrido se refiere al producto (sal) de la reacción entre un grupo ácido y un grupo básico que forman parte de la misma molécula.

Los polímeros tienen otros grupos funcionales que incrementan su utilidad. Estos grupos pueden incorporarse en el monómero antes de la formación del polímero o unirse al polímero después de su formación.

Grupo funcional. Los grupos funcionales incluyen señales que se dirigen a las células, señales de localización nuclear, compuestos que realzan la liberación de los contenidos desde endosomas u otras vesículas intracelulares (que liberan señales), y otros compuestos que alteran el comportamiento o las interacciones del compuesto o complejo al que están unidos.

Señales que se dirigen a la célula son cualquiera de las señales que realzan la asociación del polímero biológicamente activo con una célula. Estas señales pueden modificar un polímero biológicamente activo tal como un fármaco o un ácido nucleico y pueden dirigirlo a una posición de la célula (tal como un tejido) o una posición en una célula (tal como el núcleo) en un cultivo o en un organismo completo. La señal puede incrementar la unión del compuesto a la superficie de la célula y/o su asociación con un compartimento intracelular. Modificando la posición celular o del tejido del gen foráneo, puede realizarse la función del polímero biológicamente activo. La señal que se dirige a la célula puede ser, pero no se limita a, una proteína, un péptido, un lípido, un esteroide, un azúcar, un carbohidrato, un ácido

polinucleico (sin expresar) o un compuesto sintético. Las señales que se dirigen a la célula tales como los ligandos refuerzan la unión celular a los receptores. Se han usado diversos ligandos que dirigen fármacos y genes a células y a receptores celulares específicos. El ligando puede buscar una diana dentro de la membrana celular, en la membrana celular o cerca de una célula. La unión de los ligandos a los receptores inicia típicamente la endocitosis. Los ligandos incluyen agentes que se dirigen al receptor asialoglucoproteína usando residuos de asialoglucoproteína o galactosa. Otras proteínas tales como insulina, EGF o transferrina pueden usarse para el direccionamiento. Los péptidos que incluyen la secuencia RGD pueden usarse para direccionarse a muchas células. Los grupos químicos que reaccionan con grupos tiol, sulfhidrilo o disulfuro en las células pueden también usarse para dirigirse a muchos tipos de células. Folato y otras vitaminas pueden usarse también para ser direccionados. Otros grupos de direccionamiento incluyen moléculas que interaccionan con membranas tales como lípidos, ácidos grasos, colesterol, compuestos de DANSILO y derivados de anfotericina. Además, las proteínas víricas pueden usarse para unir células.

Después de la interacción de un compuesto o complejo con la célula, pueden usarse otros grupos de direccionamiento para incrementar la distribución del polímero biológicamente activo a ciertas partes de la célula.

Las señales de localización nuclear realzan el direccionamiento del compuesto farmacéutico en las proximidades del núcleo y/o su entrada en el núcleo durante la interface del ciclo celular. Tales señales de transporte nuclear pueden ser una proteína o un péptido tal como el NLS antígeno T grande SV40 o el NLS nucleoplásmico. Estas señales de localización nuclear interaccionan con diversos factores de transporte nuclear tal como el receptor NLS (carioferina alfa) que después interactúa con carioferina beta. Las propias proteínas de transporte nuclear podían también funcionar como NLS ya que son direccionadas al poro nuclear y al núcleo. Por ejemplo, la propia carioferina beta podía direccionar el ADN al complejo del poro nuclear. Varios péptidos se han derivado del antígeno T SV40. Otros péptidos NLS se han derivado de la proteína hnRNP A1, del nucleoplásmico, del c-myc, etc.

Muchos polímeros biológicamente activos, en particular compuestos grandes y/o cargados, son incapaces de cruzar las membranas biológicas. Para que estos compuestos entren en las células, o las células deben absorberlos por endocitosis, es decir, en endosomas, o debe haber una ruptura de la membrana celular que permita al compuesto cruzar. En el caso de la entrada endosómica, la membrana endosómica debe romperse para permitir el movimiento fuera del endosoma y en el interior del citoplasma. Cualquier camino de entrada en la célula requiere una ruptura o alteración de la membrana celular. Los compuestos que rompen las membranas o promueven la fusión de la membrana se denominan *compuestos con membrana activa*. Estos compuestos con membrana activa o que liberan señales, realzan la liberación de material endocitado desde los compartimentos intracelulares tales como endosomas (tempranos y tardíos), lisosomas, fagosomas, vesícula, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, red trans-Golgi (TGN) y retículo sarcoplásmico. La liberación incluye el movimiento fuera de un compartimiento intracelular en el citoplasma o en un orgánulo tal como el núcleo. Las señales que se liberan incluyen productos químicos tales como la clorocina, bafilomicina o Brefeldin A1 y la señal que retiene ER (secuencia KDEL), componentes víricos tales como los péptidos HA-2 de la subunidad hemaglutinina del virus de la gripe y otros tipos de péptidos anfifáticos. El control de cuándo y dónde es activo el compuesto con membrana activa es crucial para un transporte eficaz. Si el agente con membrana activa funciona en un cierto tiempo y lugar facilitaría el transporte del polímero biológicamente activo a través de la membrana biológica. Si el compuesto con membrana activa es demasiado activo o activo en el tiempo equivocado, entonces no tiene lugar ningún transporte o el transporte está asociado con la ruptura celular y la muerte celular. La naturaleza ha desarrollado varias estrategias para tener en cuenta el transporte a la membrana de polímeros biológicamente activos que incluyen fusión de la membrana y el uso de compuestos con membrana activa cuya actividad se modula tal que la actividad ayuda al transporte sin toxicidad. Muchas formulaciones de transporte basadas en lípidos cuentan con la fusión de la membrana y algunas actividades de péptidos con membrana activa se modulan mediante el pH. En particular, las proteínas que revisten los virus son a menudo sensibles al pH, inactivas a pH neutro o básico, y activas en las condiciones ácidas encontradas en el endosoma.

Otro grupo funcional comprende compuestos, tales como polietilenglicol, que disminuyen las interacciones entre las moléculas y ellos mismos, y con otras moléculas. Tales grupos son útiles en las interacciones limitantes tales como entre los factores séricos y la molécula o el complejo a ser distribuido.

Por distribuido, los autores quieren indicar que el polinucleótido u otro polímero biológicamente activo llega a asociarse con la célula. El polinucleótido u otro polímero biológicamente activo puede estar en la membrana de la célula o dentro del citoplasma, del núcleo o de otro orgánulo de la célula. El proceso de distribuir un ácido nucleico a una célula se ha denominado comúnmente *transfección* o el proceso de transfectar y, también, se ha denominado transformación. El término transfectar usado aquí se refiere a la introducción de un ácido nucleico foráneo u otro polímero biológicamente activo en las células. El polímero biológicamente activo podría usarse con fines investigadores o para producir un cambio en una célula que puede ser terapéutico. La distribución de ácido nucleico con fines terapéuticos se denomina comúnmente terapia génica. La distribución del ácido nucleico puede conducir a la modificación del material genético presente en la célula diana. El término transfección estable o establemente transfectado se refiere, generalmente, a la introducción e integración de ácido nucleico exógeno en el genoma de la célula transfectada. El término transfectante estable se refiere a una célula que ha integrado de forma estable el ácido nucleico foráneo en el ADN genómico. La transfección estable puede también obtenerse usando vectores episómicos que se replican durante la división celular eucariótica (por ejemplo, vectores ADN plásmido que contienen un papiloma virus origen de replicación, cromosomas artificiales). El término transfección transitoria o transfectado de forma transitoria se refiere a la introducción de ácido nucleico foráneo en una célula en la que el ácido nucleico foráneo no se integra en el genoma de la célula transfectada. Un polímero biológicamente activo es un compuesto que tiene el potencial para reaccionar

con compuestos biológicos. Los compuestos farmacéuticos, proteínas, péptidos, hormonas, citocinas, antígenos y ácidos nucleicos son ejemplos de polímeros biológicamente activos. Estos procesos pueden usarse para transferir ácidos nucleicos o biomoléculas en células o en un organismo tal como en la distribución de fármacos, o pueden usarse, también, en métodos analíticos.

Un *sistema de distribución* es el medio por el que un polímero biológicamente activo llega a ser distribuido. Es decir, todos los compuestos, incluyendo el propio polímero biológicamente activo, que se requieren para la distribución y todos los procedimientos que se requieren para la distribución incluyendo la forma (tal volumen y fase (sólido, líquido o gas)) y método de administración (tal como pero sin limitarse a los métodos de distribución orales o subcutáneos).

El término polinucleótido, o ácido nucleico o ácido polinucleico, es un término de la técnica que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos son unidades monómeras de polímeros polinucleótidos. Los polinucleótidos con menos de 120 unidades monómeras se llaman, a menudo, oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales tienen una cadena principal de desoxirribosa-fosfato o de ribosa-fosfato. Un polinucleótido artificial o sintético es cualquier polinucleótido que sea polimerizado *in vitro* o en un sistema de células libre y contiene la misma base o bases similares pero puede contener una cadena principal de un tipo distinto de la cadena principal de ribosa-fosfato natural. Estas cadenas principales incluyen: PNA (ácidos péptido-nucleicos), fosforotioatos, fosforodiamidatos, morfolinos y otras variantes de la cadena principal fosfato de los ácidos nucleicos naturales. Las bases incluyen purinas y pirimidinas, que además incluyen los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales. Derivados sintéticos de purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero sin limitarse a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo. El término base abarca cualquiera de los conocidos análogos de bases de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitarse a, 4-acetil-citosina, 8-hidroxi-N-6-metil-adenosina, aziridinil-citosina, pseudo-isocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometil-uracilo, dihidro-uracilo, inosina, N-6-isopentenil-adenina, 1-metil-adenina, 1-metil-pseudo-uracilo, 1-metil-guanina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metil-adenina, 2-metil-guanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N-6-metil-adenina, 7-metil-guanina, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosil-queosina, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, 2-metil-N-6-isopentenil-adenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxi-butoxosina, pseudo-uracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudo-uracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina. El término polinucleótido incluye ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) y combinaciones de ADN y ARN, y otros nucleótidos naturales y sintéticos.

El ADN puede estar en forma de cADN, ADN polimerizado *in vitro*, ADN plásmido, partes de un ADN plásmido, material genético derivado de un virus, ADN lineal, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN recombinante, ADN cromosómico, un oligonucleótido, ADN antisentido, o derivados de estos grupos. El ARN puede estar en forma de oligonucleótido ARN, tARN (ARN transferente), snARN (ARN nuclear pequeño), rARN (ARN ribosómico), mARN (ARN mensajero), ARN polimerizado *in vitro*, ARN recombinante, secuencias quiméricas, ARN antisentido, siARN (ARN interferente pequeño), ribocimas, o derivados de estos grupos. Un polinucleótido antisentido es un polinucleótido que interfiere con la función de ADN y/o ARN. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolinos, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares. El siARN comprende una estructura de doble hebra que contiene, típicamente, de 15-50 pares de bases y, preferiblemente, 21-25 pares de bases, y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen o ARN diana expresado dentro de la célula. La interferencia puede dar como resultado la supresión de la expresión. El polinucleótido puede ser una secuencia cuya presencia o expresión en una célula altera la expresión o función de los genes o ARN celulares. Además, el ADN y el ARN pueden ser de hebra simple, doble, triple o cuádruple. El polinucleótido con hebra doble, triple y cuádruple puede contener tanto ARN como ADN u otras combinaciones de ácidos nucleicos naturales y/o sintéticos.

Un polinucleótido distribuido puede estar dentro del citoplasma o del núcleo aparte del material genético endógeno. De forma alternativa, el ADN puede recombinarse con (llegar a ser parte de) el material genético endógeno. La recombinación puede causar que el ADN se inserte en el ADN cromosómico mediante cualquier recombinación homóloga o no homóloga.

Un polinucleótido puede ser distribuido a una célula para expresar una secuencia exógena de nucleótidos, para inhibir, eliminar, aumentar o alterar la expresión de una secuencia endógena de nucleótidos o para afectar a una característica fisiológica específica no asociada, de forma natural, con la célula. Los polinucleótidos pueden contener una casete de expresión codificada para expresar una proteína completa o parcial, o ARN. Una *casete de expresión* se refiere a un polinucleótido natural o producido de forma recombinante que puede expresar un gen o genes. El término *recombinante* usado aquí se refiere a una molécula de polinucleótido que está comprendida de segmentos de polinucleótidos unidos entre sí por medio de técnicas de biología molecular. La casete contiene la región codificante del gen de interés junto con cualquier otra secuencia que afecta a la expresión del gen. Una casete de expresión de ADN incluye, típicamente, un activador (que permite el inicio de la transcripción), y una secuencia que codifica una o más proteínas. Opcionalmente, la casete de expresión puede incluir, pero no se limita a, reforzadores de transcripción, secuencias no codificantes, señales de corte y empalme, señales de terminación de la transcripción y señales de poliadenilación. Una casete de expresión de ARN incluye, típicamente, un codón de iniciación de la traducción (que permite el inicio de la traducción), y una secuencia que codifica una o más proteínas. Opcionalmente, la casete de

ES 2 328 031 T3

expresión puede incluir, pero no se limita a, señales de terminación de la traducción, una secuencia de poliadenosina, sitios internos de entrada de ribosoma (IRES) y secuencias no codificantes.

5 El polinucleótido puede contener secuencias que no desempeñan una función específica en la célula diana pero se usan en la generación del polinucleótido. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias requeridas para la replicación o selección del polinucleótido en un organismo anfitrión.

10 Un polinucleótido puede usarse para modificar las secuencias de ADN genómico o extracromosómico. Esto puede lograrse distribuyendo un polinucleótido que es expresado. Alternativamente, el polinucleótido puede efectuar un cambio en la secuencia de ADN o de ARN de la célula diana. Esto puede lograrse por hibridación, formación de polinucleótido multihebra, recombinación homóloga, transformación del gen u otros mecanismos todavía por describir.

15 El término *gen* se refiere, generalmente, a una secuencia de polinucleótidos que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polinucleótido terapéutico (por ejemplo, ribocima) o un polipéptido o precursor. El polipéptido puede ser codificado mediante una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier parte de la secuencia codificante con tal de que se mantengan las deseadas propiedades de actividad o funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión de ligandos, transducción de señal) del polipéptido de longitud completa o del fragmento. El término abarca, también, la región codificante de un gen y las secuencias de inclusión situadas adyacentes a la región codificante en los extremos tanto 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo tal que el gen corresponde a la longitud del mRNA de longitud completa. Las secuencias que se sitúan en el 5' de la región codificante y que están presentes en el mRNA se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias que se sitúan en 3' o aguas abajo de la región codificante y que están presentes en el mRNA se denominan secuencias no traducidas 3'. El término *gen* abarca tanto cADN como las formas genómicas de un gen. 25 Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas intrones, regiones intermedias o secuencias intermedias. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear. Los intrones pueden contener elementos reguladores tales como reforzadores. Los intrones se separan o se cortan y empalman del transcrito nuclear o primario; los intrones, por tanto, están ausentes en el transcrito del ARN mensajero (mARN). El mRNA funciona durante la traducción especificando la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido activo. El término secuencias no codificantes se refiere, también, a otras regiones de una forma genómica de un gen que incluye, pero sin limitarse a, activadores, reforzadores, sitios de unión del factor de transcripción, señales de poliadenilación, sitios internos de entrada del ribosoma, silenciadores, secuencias aislantes y regiones de unión a la matriz. Estas secuencias pueden estar presentes cerca de la región codificante del gen (dentro de 10.000 nucleótidos) o en sitios distantes (más de 10.000 nucleótidos). Estas secuencias no codificantes influyen en el nivel o velocidad de transcripción y de traducción del gen. La modificación covalente de un gen puede influir en la velocidad de transcripción (por ejemplo, metilación del ADN genómico), la estabilidad del mRNA (por ejemplo, longitud de la cola de poliadenosina en 3'), velocidad de traducción (por ejemplo, el casquete 5'), reparación de ácido nucleico e inmunogenicidad. Un ejemplo de modificación covalente de ácido nucleico supone la acción de reactivos Label IT (Mirus Corporation, Madison, WI). 40

El término *expresión del gen*, usado aquí, se refiere al procedimiento para transformar la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, mRNA, rARN, tARN o snARN) por transcripción de un gen desoxirribonucleico (por ejemplo, mediante la acción enzimática de ARN-polimerasa), y para genes que codifican proteínas, en la proteína por traducción de mRNA. La expresión del gen puede regularse en muchas etapas del proceso. La regulación por incremento o activación se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión del gen (es decir, ARN o proteína), mientras la regulación por decremento o represión se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están involucradas en la regulación por incremento o en la regulación por decremento se denominan, a menudo, activadoras y represoras, respectivamente. 50

Un polímero biológicamente activo es un compuesto que tiene el potencial para reaccionar con componentes biológicos. Más particularmente, los polímeros biológicamente activos utilizados en esta memoria descriptiva se diseñan para cambiar los procesos naturales asociados con una célula viva. Para los fines de esta memoria descriptiva, un proceso natural celular es un proceso que está asociado con una célula antes de la distribución de un polímero biológicamente activo. Los polímeros biológicamente activos pueden seleccionarse del grupo que comprende: compuestos farmacéuticos, proteínas, péptidos, polipéptidos, hormonas, citocinas, antígenos, virus, oligonucleótidos, y ácidos nucleicos o polinucleótidos. 55

60 Ejemplos

Ejemplo 1

65 Formación de un copolímero que contiene imidazolinio

La polietilimina lineal sustituida con N-propionilo (10% de aminas aciladas, 90% de etilamina por ¹H NMR, Polysciences, Inc., ¹H NMR (D₂O, sal sódica del ácido 2,2,3,3-d₄-3-(trimetilsilil)-propiónico como patrón interno) δ 3,65-3,45, m, 6H; δ 3,15-2,80, m, 47H; δ 2,46, q, 2H; δ 1,09, t, 3H) se disolvió en agua hasta una concentración de 20

ES 2 328 031 T3

mg/ml. El pH de la solución se ajustó a pH 5,0 con ácido hidroclicórico (12 M). La solución se dividió en dos partes. Una parte se colocó a 4°C durante 48 h. La segunda parte se colocó a 37°C durante 48 h. Se obtuvo el perfil de exclusión por tamaño para cada muestra (250 µg en 250 µl de solución salina tamponada Hepes, BioCad-Sprint, Perseptive Biosystems, Inc., columnas de Eichrome Technologies, SPCCS201-30 y SPCCS203-30 conectadas en serie, eluyente de NaCl 0,2 M, controlado a λ210 y λ240. Las trazas para las muestras eran fundamentalmente idénticas, indicando que el peso molecular del polímero no era afectado por el proceso. La única diferencia observada en el ejemplo era que la muestra a 37°C tenía una absorbancia mucho mayor a λ240. Se obtuvieron los espectros UV para cada muestra (0,2 mg/ml en H₂O, λ 190 nm-300 nm). La muestra almacenada a 4°C exhibió una λ_{máx} a 205 nm, que era idéntica al material inicial de la reacción (material inicial no mostrado). La muestra mantenida a 37°C exhibió un λ_{máx} a 235 nm. Los espectros IR para cada muestra mostraron señales muy similares, con ligeras diferencias en la región de 1240-1300 cm⁻¹ y en la región de 1550-1640 cm⁻¹. El análisis por ¹H NMR indicó (D₂O, sal sódica del ácido 2,2,3,3-d4-3-(trimetilsilil)-propiónico como patrón interno) δ 3,91, s, 8,2H; δ 3,65-3,45, m, 15,6H; δ 3,15-2,80, m, 131H; δ 2,66, q, 4,4H; δ 2,46, q, 2H; δ 1,22, t, 7,6H, δ 1,09, t, 3H. Las nuevas señales a δ 3,91, δ 2,66 y δ 1,22 son consecuentes con el sistema de anillo de imidazolinio. La ¹H NMR apoya la atribución de 3,3% de aminas aciladas, 7,26% de imidazolinio y 89,1% de etilamina. Estos resultados muestran que las secciones de etilamina original permanecen y que el nuevo sistema de anillo surge con una disminución correspondiente en la amida (Fig. 12).

Ejemplo 2

Inyecciones en ratón in vivo de formulaciones de poliimidazolinio para la transfección de pulmón

Las mismas muestras generadas en el Ejemplo 1 se formularon en preparados que contenían ADN para la transfección de genes sistémicos por vía intravenosa. Se formaron dos complejos. Complejo I. El pADN (50 µg, 25 µl de una solución acuosa de 2 µg/µl) se diluyó con HEPES 10 mM, glucosa 0,29 M, pH 7,5 (200 µl). A esta solución se añadió la muestra a 4°C (400 µg, 20 µl de una solución acuosa de 20 mg/ml). A esta solución se añadió ácido poliacrílico (50 µg, 5 µl de una solución acuosa de 10 mg/ml).

Complejo II. El pADN (50 µg, 25 µl de una solución acuosa de 2 µg/µl) se diluyó con HEPES 10 mM, glucosa 0,29 M, pH 7,5 (200 µl). A esta solución se añadió la muestra a 37°C (400 µg, 20 µl de una solución acuosa de 20 mg/ml). A esta solución se añadió ácido poliacrílico (50 µg, 5 µl de una solución acuosa de 10 mg/ml).

Usando una aguja de calibre 30, de 0,5 pulgadas (1,27 cm), se realizaron inyecciones de 250 µl del complejo en la vena de la cola en ratones ICR (Complejo I, n=4; Complejo II, n=3). A los 30 min después de la inyección, a los animales se les inyectó ácido poliacrílico (1500 µg, 150 µl de una solución acuosa de 10 mg/ml). Un día después de la inyección, los animales fueron sacrificados, y se realizaron ensayos de luciferasa en las muestras de pulmón. La expresión de la luciferasa se determinó como se ha informado previamente [Wolff *et al.* 1990]. Se usó un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). Los resultados, resumidos en la Fig. 14, indican que el complejo de poliimidazolinio es más eficaz en la transferencia del gen al pulmón que la polietiliminina lineal sustituida con 10% con N-propionilo.

Ejemplo 3

Efecto del pH en la formación de un copolímero que contiene imidazolinio

La polietiliminina lineal sustituida con N-propionilo (10% de aminas aciladas, 90% de etilamina mediante ¹H NMR, Polysciences, Inc.) se disolvió en agua a una concentración de 20 mg/ml, y el pH se ajustó a 7,4. De este patrón, se prepararon dos muestras, una en la que el pH se elevó a 8, y una segunda muestra con un pH de 5. Las muestras se calentaron a 37°C durante 64 h y se analizaron mediante espectroscopía UV. Se obtuvieron los espectros UV para cada muestra (0,2 mg/ml en H₂O, λ 190 nm-300 nm). La muestra almacenada a pH 5 mostró el mayor incremento en absorbancia a λ235-240. La muestra a pH 8 también mostró un incremento en absorbancia a λ235-240, indicando que la ciclación tiene lugar por encima de pH 8 (Fig. 15).

Ejemplo 4

Alquilación de N,N'-dimetiletildiamina con cloruro de propionilo

Síntesis de MC1016 (monoación) y MC1017 (diación). La N,N'-dimetiletildiamina (500 mg, 11,3 mmol amina, Aldrich Chemical Company) se transfirió a matraz de fondo redondo desecado con llama y se recogió con diclorometano (100 ml, 0,1 M). A la solución resultante se añadió diisopropiletildiamina (0,99 ml, 730 mg, 5,67 mmol, Aldrich Chemical Company) y la solución se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo seco/acetona. A la solución de reacción se añadió, durante 5 minutos, gota a gota, con agitación, cloruro de propionilo (0,49 ml, 525 mg, 5,67 mmol, Aldrich Chemical Company). La reacción se dejó calentar, con agitación y bajo nitrógeno, a temperatura ambiente. Después de 30 min a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se analizó mediante TLC (cromatografía de capa fina) y espectroscopía de masas (Sciex API 150EX) para verificar que la reacción era completa. La mezcla se concentró a presión reducida, y una parte (100 mg) se llevó con

ES 2 328 031 T3

H₂O. Esta solución se purificó mediante HPLC (columna C18 de Aquasil, TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/MeCN como eluyente, con un gradiente 10-90% (orgánico) durante 20 min, velocidad de elución de 1 ml/min, las fracciones se recogieron a 210 nm). Las fracciones 1-6 (de dos series) se concentraron a presión reducida, y se liofilizaron para dar N,N-dimetiletildiamina monopropionilada en forma de un sólido blanco (MC1016, 91,7 mg, Fig. 16), analizado mediante espectroscopía de masas (Sciex API 150EX). La fracción 10 (de dos series) se concentró a presión reducida, y se liofilizó para dar N,N'-dimetiletildiamina N,N'-dipropionilada en forma de un sólido blanco (MC1017, 7,8 mg, Fig. 16), analizado mediante espectroscopía de masas (Sciex API 150EX).

10 Ejemplo 5

Síntesis de cloruro de 1,3-dimetil, 2-etil-imidazolinio

La N,N-dimetiletildiamina monopropionilada (MC1016) se recogió en agua hasta una concentración final de 20 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a pH 5 con HCl concentrado. La solución resultante se calentó a 70°C durante 72 h. La muestra se analizó por espectroscopía UV (Fig. 17). El análisis indicó un incremento en la absorción a λ 210 nm para la solución calentada respecto a la muestra almacenada a 4°C.

20 Ejemplo 6

Síntesis de formación de amidinio a partir de pentaetilenhexamina monoacilada

La pentaetilenhexamina (10 mg, 0,043 mmol, Aldrich Chemical Company) se recogió en diclorometano (1 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo bajo nitrógeno, y se añadió cloruro de acetilo (3,4 mg, 0,043 mmol, Aldrich). La solución se dejó calentar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El aceite resultante se recogió en agua hasta una concentración de 20 mg/ml, y el pH se ajustó a 7 con HCl (6 M). La muestra se dividió en dos partes. La muestra 1 se dejó a temperatura ambiente mientras la muestra 2 se calentó a 80°C. Después de 48 h, las muestras se analizaron por espectroscopía UV (Espectrofotómetro Beckman DU530; Fig. 18). Los resultados indicaron un incremento de absorbancia a λ 230-235 para las muestras tanto a temperatura ambiente como a 80°C.

Ejemplo 7

35 Inyecciones en ratón in vivo de formulaciones de poliimidazolinio para la transfección del pulmón

Se prepararon tres muestras de poliimidazolinio a partir de poli(2-etil-2-oxazolina), que estaba desaminada al 90% (PolySciences), disolviendo el polímero hasta 20 mg/ml en agua, ajustando el pH a 7,4, y realizando la ciclación por incubación a elevada temperatura. El Poliimidazolinio 1 se preparó 6 semanas antes de usar, y se dejó asentar a temperatura ambiente. El Poliimidazolinio 2 se preparó 4 semanas antes de usar y se dejó asentar a temperatura ambiente. El Poliimidazolinio 3 se preparó inmediatamente antes de usar. Los tres preparados de poliimidazolinio se analizaron por espectroscopía UV (λ 190 nm-300 nm; Fig. 19). El Poliimidazolinio 1 mostró un gran incremento en absorbancia a λ 235, mientras que para Poliimidazolinio 2, este pico estaba presente pero en una menor cantidad. El poliimidazolinio no mostró absorbancia a λ 235. Los tres preparados de poliimidazolinio se usaron para elaborar varios complejos.

Complejo I. Se diluyó pADN (150 μ g, 75 μ l de una solución acuosa de 2 μ g/ μ l) con HEPES 10 mM, glucosa 0,29 M, pH 7,5 (600 μ l). A esta solución se añadió poliimidazolinio 1 (1200 μ g, 60 μ l de una solución acuosa de 20 mg/ml). A esta solución se añadió ácido poliacrílico (150 μ g, 15 μ l de una solución acuosa de 10 mg/ml).

Complejo II. Se diluyó pADN (150 μ g, 75 μ l de una solución acuosa de 2 μ g/ μ l) con HEPES 10 mM, glucosa 0,29 M, pH 7,5 (600 μ l). A esta solución se añadió poliimidazolinio 2 (1200 μ g, 60 μ l de una solución acuosa de 20 mg/ml). A esta solución se añadió ácido poliacrílico (150 μ g, 15 μ l de una solución acuosa de 10 mg/ml).

Complejo III. Se diluyó pADN (150 μ g, 75 μ l de una solución acuosa de 2 μ g/ μ l) con HEPES 10 mM, glucosa 0,29 M, pH 7,5 (600 μ l). A esta solución se añadió poliimidazolinio 3 (1200 μ g, 60 μ l de una solución acuosa de 20 mg/ml). A esta solución se añadió ácido poliacrílico (150 μ g, 15 μ l de una solución acuosa de 10 mg/ml).

Las inyecciones en la vena de la cola de 250 μ l del complejo se realizaron en ratones ICR (n=3) usando una aguja de calibre 30 de 0,5 pulgadas (1,27 cm). A los 30 minutos después de la inyección, a los animales se les inyectó ácido poliacrílico (1500 μ g, 150 μ l de una solución de 10 mg/ml en agua). Un día después de la inyección, los animales fueron sacrificados, y se realizó un ensayo de luciferasa en tejido del pulmón. Se usó un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

ES 2 328 031 T3

Complejo	Actividad relativa de la luciferasa (unidades lumínicas)		
	n1	n2	n3
Complejo I	4.231.357	2.280.870	4.933.875
Complejo II	2.671.040	2.525.587	1.186.365
Complejo III	1.774.820	878.562	2.969.813

Los resultados indican que las formulaciones de poliimidazolinio distribuyen pADN al pulmón.

Ejemplo 8

Transfección de células 3T3 con formulaciones de polimidazolinio

Se formaron varios complejos para la transfección de las células. Se disolvió polietilenimina lineal sustituida con N-propionilo (10% de aminas aciladas, 90% de etilamina mediante 1H NMR, Polysciences, Inc., /PEI10%NPr en agua hasta una concentración de 20 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a pH 7,5 con ácido hidroclicórico (12 M). El polimidazolinio derivado de este polímero se utilizó también en la formación del complejo.

Las células 3T3 se mantuvieron en DMEM. Aproximadamente 24 horas antes de la transfección, las células se llevaron a placas en una densidad apropiada en placas de 48 pocillos y se incubaron durante la noche. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. La cantidad indicada de complejo se combinó, entonces, con las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células se recolectaron después de 24 h y se analizó la actividad de la luciferasa usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de expresión de luciferasa se registró en unidades lumínicas relativas (ULR). Los números son los promedios de dos pocillos separados.

	Muestra	complejo	Proporción Peso:peso	µl/pocillo	ULR promedio
1	pADN	/PEI10%NPr	5/5	40	416.992
2	pADN	/PEI10%NPr	5/10	40	1.292.181
3	pADN	/PEI10%NPr	5/15	40	1.298.805
4	pADN	/PEI10%NPr	5/20	40	1.369.775
5	pADN	/PEI10%NPr	5/30	40	1.511.175
6	pADN	/PEI10%NPr	5/40	40	1.067.322
7	pADN	Poliimidazolinio	5/5	40	155.842
8	pADN	Poliimidazolinio	5/10	40	331.081
9	pADN	Poliimidazolinio	5/15	40	420.084
10	pADN	Poliimidazolinio	5/20	40	281.017
11	pADN	Poliimidazolinio	5/30	40	1.037.222
12	pADN	Poliimidazolinio	5/40	40	1.067.404

Los resultados indican que el poliimidazolinio puede transfectar células 3T3 con menor eficacia que la /PEI10%NPr en esas condiciones. La /PEI10%NPr mostró un perfil de toxicidad (juzgado por la confluencia final) similar al polímero de poliimidazolinio.

ES 2 328 031 T3

Ejemplo 9

Transfección de células HUH-7 con formulaciones de poliimidazolinio recargadas

- 5 La polietilenimina lineal sustituida con N-propionilo (10% de aminas aciladas, 90% de etilamina mediante 1H NMR, PolySciences, Inc.), se disolvió en agua hasta una concentración de 20 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a pH 7,5 con ácido hidroclicórico (12 M), y se formó poliimidazolinio (PI) a elevada temperatura. Las muestras se recargaron con varias cantidades de ácido poliacrílico (10 mg/ml de solución acuosa).
- 10 Las células HUH-7 se mantuvieron en DMEM. Aproximadamente 24 h antes de la transfección, las células se llevaron a placas en una densidad apropiada en placas de 48 pocillos y se incubaron durante la noche. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. La cantidad indicada de complejo se combinó, entonces, con las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células se recolectaron después de 24 h y se analizó la actividad de luciferasa usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wilbad, Alemania).
- 15 La cantidad de expresión de luciferasa se registró en unidades lumínicas relativas. Los números son los promedios para dos pocillos separados.

Transfección de células HUH7 usando complejos de ADN/poliimidazolinio (PI)/ácido poliacrílico

Complejo	Proporción peso:peso	μl/pocillo	Medio	ULR promedio
pADN/PI/PAA	5/20/0	40	Opti	3981083
pADN/PI/PAA	5/20/14	40	Opti	13111775
pADN/PI/PAA	5/20/16	40	Opti	12334305
pADN/PI/PAA	5/20/18	40	Opti	11000786
pADN/PI/PAA	5/20/19	40	Opti	11458729
pADN/PI/PAA	5/20/20	40	Opti	10099756
pADN/PI/PAA	5/20/21	40	Opti	7820030
pADN/PI/PAA	5/20/22	40	Opti	504225
pADN/PI/PAA	5/20/0	40	Suero	2197
pADN/PI/PAA	5/20/14	40	Suero	544564
pADN/PI/PAA	5/20/16	40	Suero	3165930
pADN/PI/PAA	5/20/18	40	Suero	8597630
pADN/PI/PAA	5/20/19	40	Suero	7959588
pADN/PI/PAA	5/20/20	40	Suero	6975200
pADN/PI/PAA	5/20/21	40	Suero	6504250
pADN/PI/PAA	5/20/22	40	Suero	36167

Los resultados indican que las formulaciones de poliimidazolinio recargadas son eficaces en la transfección de células HUH-7.

Ejemplo 10

Transfección de células HUH-7 con formulaciones binarias y ternarias de poliimidazolinio

- 65 La polietilenimina lineal sustituida con N-propionilo (PEI10%NPr, 10% de aminas aciladas, 90% de etilamina mediante 1H NMR, PolySciences, Inc.), se disolvió en agua hasta una concentración de 20 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a pH 7,5 con ácido hidroclicórico (12 M). Una parte de esta solución se usó para formar el poliimidazolinio (PI) manteniendo la solución a elevada temperatura. Las muestras se recargaron con varias cantidades de ácido poliacrílico (10 mg/ml de solución acuosa).

ES 2 328 031 T3

Las células HUH-7 se mantuvieron en DMEM. Aproximadamente 24 h antes de la transfección, las células se llevaron a placas en una densidad apropiada en placas de 48 pocillos y se incubaron durante la noche. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. La cantidad indicada de complejo se combinó después con las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células se recolectaron después de 24 h y se analizó la actividad de la luciferasa usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de expresión de luciferasa se registró en unidades lumínicas relativas. Los números son los promedios para dos pocillos separados.

10

15

20

25

30

35

40

45

Complejo	Proporción peso:peso	μl/pocillo	ULR promedio	Confluencia final
ADN/PI/PAA	5/10/0	40	4292994	100
ADN/PI/PAA	5/20/0	40	3282018	85
ADN/PI/PAA	5/40/0	40	3477386	85
ADN/PI/PAA	5/60/0	40	3233045	75
ADN/PI/PAA	5/40/25	40	8530972	75
ADN/PI/PAA	5/40/30	40	7066358	75
ADN/PI/PAA	5/40/35	40	6675965	85
ADN/PI/PAA	5/40/40	40	6669150	85
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/10/0	40	1895920	90
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/20/0	40	3881579	85
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/40/0	40	5655288	60
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/60/0	40	431360	60
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/40/25	40	2390180	60
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/40/30	40	6709513	60
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/40/35	40	8483672	65
ADN/PEI10%NPr/PAA	5/40/40	40	7779514	65

Los resultados indican que el polímero poliimidazolinio es eficaz en la transfección de células HUH-7 como un complejo recargado tanto binario como ternario. Los resultados indican que el complejo recargado es más eficaz que la partícula correspondiente en el polímero no ciclado.

Ejemplo 11

55

Metilación de 2-metil-2-imidazolina

A una solución de 2-metil-2-imidazolina (52,7 mg, 0,626 mmol, Aldrich Chemical Company) en 3 ml de acetoni-trilo se añadió yoduro de metilo (86 μl, 1,377 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución resultante se calentó a reflujo. Después de 3 días, la solución se retiró del calor y se añadió éter dietílico para precipitar las sales. El precipitado resultante se secó en vacío. El material se analizó por espectroscopía de masas (Sciex API 150EX) e indicó una mezcla de yoduro de 1,2-dimetilimidazolinio (M=99), yoduro de 1,2,3-trimetilimidazolinio (M=113) y 1,1,4-tri-metil, 4-acil-etilendiamina (M+1 = 145). La mezcla se analizó por espectroscopía UV (Espectrofotómetro Beckman DU530), e indicó un cambio en λ_{máx} de 214 nm a 224 nm para la muestra de yoduro de imidazolinio respecto a la imidazolina de partida (Fig. 20).

65

ES 2 328 031 T3

Ejemplo 12

Polimerización de 2-metil-2-imidazolina y éter diglicídico de 1,4-butanodiol

5 A una solución de 2-metil-2-imidazolina (200 mg, 2,38 mmol, Aldrich Chemical Company) en 5 ml de DMF se añadió éter diglicídico de 1,4-butanodiol (458 μ l, 2,38 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución se calentó a reflujo durante 1,5 h y el gel polímero resultante se lavó con éter dietílico. La mezcla se analizó por espectroscopía UV (Espectrofotómetro Beckman DU 530), e indicó un hombro de absorbanza de λ 235 nm para el polímero de imidazolinio, indicando la incorporación del sistema de anillo en el polímero.

10

Ejemplo 13

Polimerización de 2-metil-2-imidazolina y epiclohidrina

15

A una solución de 2-metil-2-imidazolina (200 mg, 2,38 mmol, Aldrich Chemical Company) en 5 ml de DMF se añadió epiclohidrina (186 μ l, 2,38 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución se calentó a reflujo durante 16 h y el gel polímero resultante se precipitó con éter dietílico. La mezcla se analizó por espectroscopía UV (Espectrofotómetro Beckman DU 530), e indicó una absorbanza a λ 235 nm para el polímero de imidazolinio, indicando la incorporación del sistema de anillo en el polímero (Fig. 21).

20

Ejemplo 14

Polimerización de 2-metil-2-imidazolina y poliepiclorohidrina

A una solución de poliepiclorohidrina (102,9 mg, 1,48 mmol en Cl_2) en 2 ml de acetonitrilo, se añadió 2-metil-2-imidazolina (125 mg, 1,48 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución se calentó a reflujo durante 16 h y el polímero resultante se precipitó con éter dietílico. El precipitado se analizó por espectroscopía UV (Espectrofotómetro Beckman DU 530), e indicó un nuevo hombro de absorbanza de λ 220 nm para el polímero de imidazolinio, indicando la incorporación del sistema de anillo en el polímero (Fig. 22).

30

Ejemplo 15

35

Desprotecciones parciales de 2-etil-2-oxazolina

A. A una solución de 2-etil-2-oxazolina (5,00 g, 50,4 mmol en amida, Aldrich Chemical Company) en 40 ml de agua se añadió HCl (conc., 2,67 ml, 25,2 mmol, 0,5 equiv.) gota a gota durante varios minutos. La solución resultante se calentó a reflujo durante 56 h. El pH se neutralizó a pH 7 con NaOH (12 M). La solución se concentró a presión reducida y se recogió en EtOH y se filtró para retirar el NaCl. La filtración de etanol se repitió 5 veces para dar un copolímero de las siguientes subunidades: etil-amina, 2-etilimidazolinio y N-propionil-etil-amina. Las proporciones de las subunidades se determinaron por ^1H NMR siendo 88,9%, 4,9% y 6,2%, respectivamente.

40

B. A una solución de 2-etil-2-oxazolina (5,00 g, 50,4 mmol en amida, Aldrich Chemical Company), en 40 ml de agua se añadió HCl (conc., 2,67 ml, 25,2 mmol, 0,5 equiv.) gota a gota durante varios minutos. La solución resultante se calentó a reflujo durante 56 h. El pH se neutralizó a pH 7 con NaOH (12 M). La solución se concentró a presión reducida y se recogió en EtOH y se filtró para retirar el NaCl. La filtración de etanol se repitió 5 veces para dar un copolímero de las siguientes subunidades: etil-amina, 2-etilimidazolinio y N-propionil-etil-amina. Las proporciones de las subunidades se determinaron por ^1H NMR siendo 92,8%, 4% y 3,2%, respectivamente.

45

C. A una solución de 2-etil-2-oxazolina (5,00 g, 50,4 mmol en amida, Aldrich Chemical Company) en 40 ml de agua se añadió HCl (conc., 3,48 ml, 42,8 mmol, 0,85 equiv.) gota a gota durante varios minutos. La solución resultante se calentó a reflujo durante 56 h. El pH se neutralizó a pH 7 con NaOH (12 M). La solución se concentró a presión reducida y se recogió en EtOH y se filtró para retirar el NaCl. La filtración de etanol se repitió 5 veces para dar un copolímero de las siguientes subunidades: etil-amina, 2-etilimidazolinio y N-propionil-etil-amina. Las proporciones de las subunidades se determinaron por ^1H NMR siendo 95%, 3,35% y 1,65%, respectivamente.

55

D. A una solución de 2-etil-2-oxazolina (5,00 g, 50,4 mmol en amida, Aldrich Chemical Company) en 40 ml de agua se añadió HCl (conc., 6,14 ml, 75,6 mmol, 1,5 equiv.) gota a gota durante varios minutos. La solución resultante se calentó a reflujo durante 48 h. El pH se neutralizó, haciéndolo básico, hasta pH 14 con NaOH (12 M). La solución se calentó a reflujo durante 16 h. Después de 16 h, el pH se neutralizó a pH 7 con HCl (conc.). La solución se concentró a presión reducida y se recogió en EtOH y se filtró para retirar el NaCl. La filtración de etanol se repitió 5 veces para dar un copolímero de las siguientes subunidades: etil-amina, 2-etilimidazolinio y N-propionil-etil-amina. Las proporciones de las subunidades se determinaron por ^1H NMR siendo 100%, 0% y 0% respectivamente.

65

ES 2 328 031 T3

5 E. A una solución de 2-etil-2-oxazolina (5,00 g, 50,4 mmol en amida, Aldrich Chemical Company) en 40 ml de agua se añadió NaOH (3,024 g, 75,6 mmol, Aldrich Chemical Company) en partes adecuadas durante varios minutos. El polímero empezó a desaparecer a medida que el pH se incrementaba. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante 56 h. El pH se neutralizó a pH 7 con HCl (conc.). La solución se concentró a presión reducida y se recogió en EtOH y se filtró para retirar el NaCl. La filtración de etanol se repitió 5 veces para dar un copolímero de las siguientes subunidades: etil-amina, 2-etilimidazolinio y N-propionil-etil-amina. Las proporciones de las subunidades se determinaron por ¹H NMR siendo % a nivel de trazas, % a nivel de trazas y 98%, respectivamente.

10 Ejemplo 16

Acilación de polivinilamina y formación de un anillo amidinio

15 A una solución de hidrocloreuro de polivinilamina (40 mg, 0,503 mmol en amina, 25 K, Aldrich Chemical Company) en 400 μ l de agua se añadió diisopropiletilamina (35 μ l, 1,00 mmol, Aldrich Chemical Company), seguido de anhídrido acético (9,6 μ l, 0,503 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución resultante se agitó durante 12 h, y se dividió en dos partes de igual tamaño. La Muestra 1 (MC 1025) se calentó a 70°C durante 16 h. La muestra 2 (MC1026) se almacenó a 4°C.

20 Ejemplo 17

Acilación de polialilamina y formación de un anillo amidinio

25 A una solución de hidrocloreuro de polialilamina (40 mg, 0,428 mmol en amina, 15 K, Aldrich Chemical Company) en 400 μ l de agua se añadió diisopropiletilamina (30 μ l, 0,855 mmol, Aldrich Chemical Company), seguido de anhídrido acético (8,1 μ l, 0,428 mmol, Aldrich Chemical Company). La solución resultante se agitó durante 12 h, y se dividió en dos partes de igual tamaño. La Muestra 1 (MC 1029) se calentó a 70°C durante 16 h. La muestra 2 (MC1030) se almacenó a 4°C.

30 Ejemplo 18

Distribución de siARN a células in vitro

35 Se prepararon varios complejos para la transfección *in vitro* de células 3T3-Luc. Algunas formulaciones incluyen un lípido (MC 798), mientras que otras están exentas de lípido. Las transfecciones se realizaron en suero al 10%. Las células 3T3-Luc se mantuvieron en DMEM. Aproximadamente 24 h antes de la transfección, las células se llevaron a placas en una densidad apropiada en placas de 48 pocillos y se incubaron durante la noche. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. La cantidad indicada de complejo que contenía siARN anti-luciferasa (GL-2) y el polímero indicado se combinaron después con las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células se recolectaron después de 24 horas y se analizó la actividad de la luciferasa usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de expresión de luciferasa se registró en unidades lumínicas relativas. Los números son los promedios de dos pocillos separados.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 328 031 T3

Tipo de célula: 3T3-LUC

Muestra	Formulación	Concentración Proporción peso:peso	$\mu\text{l/pocillo}$	ULR
Testigo	X		100	2100570
GL-2	X	200	100	1976795
GL-2	TKO	200/8 μl	100	1094425
GL-2	TKO	200 ng/12 μl	100	517800
GL-2	PVA de referencia	200 ng/6 μl	100	1952695
GL-2	1025	200 ng/6 μl	100	1480135
GL-2	1026	200 ng/6 μl	100	1539960
GL-2	PAA de referencia	200 ng/6 μl	100	1711830
GL-2	1029	200 ng/6 μl	100	1554965
GL-2	1030	200 ng/6 μl	100	1585145
GL-2/798	PVA de referencia	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1829290
GL-2/798	1025	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1432655
GL-2/798	1026	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1511445
GL-2/798	PAA de referencia	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1610610
GL-2/798	1029	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1404530
GL-2/798	1030	200 ng/4 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$	100	1840955

Los resultados indican que el siARN puede ser distribuido a las células usando los polímeros indicados inhibiendo así la expresión del gen luciferasa.

Ejemplo 19

Distribución de ADN a células in vitro

Se prepararon varios complejos para la transfección *in vitro* de células HEPA. Las formulaciones incluyen un lípido (MC798). Las transfecciones se realizaron en suero al 10%. Las células HEPA se mantuvieron en DMEM. Aproximadamente 24 horas antes de la transfección, las células se llevaron a placas en una densidad apropiada en placas de 48 pocillos y se incubaron durante una noche. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. La cantidad indicada de complejo se combinó entonces con las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células se recolectaron después de 24 horas y se analizó la actividad de la luciferasa usando un luminómetro Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Alemania). La cantidad de expresión de luciferasa se registró en unidades lumínicas relativas. Los números son los promedios de dos pocillos separados.

Tipo de célula: HEPA

Polímero	Proporción de la concentración peso:peso:peso (ADN/lípido/polímero)	ULR
PAA	3/9/6	347944
PAA	3/15/6	1060816
1029	3/9/6	2942677
1029	3/15/6	7128621
1030	3/9/6	2857683
1030	3/15/6	2821997
1029	3/9/12	2597371

Los resultados indican que el polímero de poliamidinio puede transferir ADN a las células *in vitro*.

Lo anteriormente mencionado se considera sólo ilustrativo de los principios de la invención. Además, como para los especialistas en la técnica tendrán lugar, fácilmente, numerosas modificaciones y cambios, no se desea limitar la invención a la exacta construcción y al funcionamiento, mostrada y descrito. Por tanto, todas las adecuadas modificaciones y equivalentes caen dentro del alcance de la invención.

Referencias

Adam RC, KG Rice. *J Pharm Sci.* 739-746, 1999.

Anderson MW, Jones RCF. *J Chem Soc Perkin Trans. I*, 1986, 205.

Askitoglu. *Helv Chim Acta* 1985, 68:750.

Barnett C. Cleghorn PH, Cross GE, Lloyd D, Marshall R. *J Chem Soc C*, 1966, 93.

Behr JP *et al.* Nucleic acid containing composition, preparation and uses of same. US Patent No. 6.013.240.

Blessing T, JS Remy, JP Behr. *J. Am. Chem. Soc.* 120:8519-8520, 1998.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr J. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92:7297-7301.

Chimishkyan *J Og Chem USSR* 1985, 21:1955.

Coll JL, Chollet P, Brambilla E, Desplanques D, Behr JP, Favrot M. *In vivo* delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Hum Gene Ther.* 1999, 10(10):1659-1666.

Fernández, B. M., Reverdito, A. M., Paolucci, G. A., Perillo, I. A. *J. Heterocyclic Chem.*, 1987, 24, 1717.

Ferrari S, Pettenazzo A, Garbati N, Zacchello F, Behr JP, Scarpa M. Polyethylenimine shows properties of interest for cystic fibrosis gene therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1447(2-3):219-225.

García J, Vilarrasa J. New synthetic "tricks" using old reagents. A mild method for the conversion of RCONHR' to RCONHR". *Tett Lett.* 1982, 23(10): 1127-1128.

Goula D, Remy JS, Erbacher P, Wasowicz M, Levi G, Abdallah B, Demeneix BA. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* 1998, 5(5):712-717.

Gruseck U, Heuschmann M, *Chem Ber.* 1987, 120, 2053-2064.

ES 2 328 031 T3

Hafferl W, Lundin R, Ingrahm LL, *Biochemistry*, 1963, 2, 1298.

Jaenicke L, Brode E. *Ann Chem.*, 1959, 624, 120.

5 Jeong JH, Song SH, Lim DW, Lee H, Park TG. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J Controlled Release*. 2001, 73(2-3):391-399.

Krammer. *ACIEE* 1977, 16:861.

10 Krammer. *Helv Chim Acta* 1978, 61:1342.

Lasic DD, Strey H, Stuart MCA, Podgornik R, Frederik PM. *J Am Chem Soc.* 1997, 119, 832-833.

Leonard B. *J Org. Chem.* 1965, 30, 817.

15

Leonard Zwanwenburg. *J Am Chem Soc.* 1967, 89, 4456.

Lloyd D, McNab H, Marshall DR, *J Chem Soc Perkin Trans. I*, 1978, 1460.

20

May M, Bardos TJ, Barger FL, Lansford M, Ravel JM, Sutherland GL, Shive W. *J Am Soc.* 1951, 73, 3067.

New RC, p. 1. chapter 1, "Introduction" in *Liposomes: A Practical Approach*, ed. R.C. New IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1990.

25

Niven R, Pearlman R, Wedeking T, Mackeigan J, Noker P, Simpson-Herren L, Smith JG. *J Pharm Sci.*, 1998, 87, 1292.

Perillo I, Lamdan S. *J Chem Soc Perkin Trans. I*, 1975, 894.

30

Pfeil, Harder. *Angew Chime Int Ed Engl.* 1965, 44, 518.

Salerno A, Ceriani V, Perillo IA. *J Heterocyclic Chem.* 1992, 29, 1725.

Stach. *Tetrahedron* 1988, 44:1573-1590.

35

Stevens MP. *Polymer Chemistry: An Introduction* New York Oxford University Press 1990.

Strzelecka TE, Rill RL. A ²³Na-NMR study of sodium-DNA interactions in concentrated DNA solutions at low-supporting electrolyte concentration. *Biopolymers*. 1990, 30(7-8): 803-814.

40

Strzelecka TE, Rill RL. Phase transitions of concentrated DNA solutions in low concentrations of 1:1 supporting electrolyte. *Biopolymers*. 1990, 30(1-2): 57-71.

Trubetskoy VS, A Loomis, JE Hagstrom, VG Budker, JA Wolff. *Nucleic Acids Res.* 27:3090-3095, 1999b.

45

Trubetskoy VS, A Loomis, PM Slattum, JE Hagstrom, VG Budker, JA Wolff. *Bioconjugate Chem.* 10:624-628, 1999a.

Trubetskoy VS, PM Slattum, JE Hagstrom, JA Wolff, VG Budker. *Anal Biochem.* 267:309-313, 1999c.

50

Trubetskoy VS, VG Budker, LJ Hanson, PM Slattum, JA Wolff, LE Hagstrom. *Nucleic Acids Res.* 26: 4178-4185, 1998.

U.S. 08/718.657

55

U.S. 09/000.692

U.S. 09/070.299

60

U.S. 09/464.871

U.S. 09/724.089

65

von Harpe A, Petersen H, Li Y, Kissel T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J Controlled Release*. 2000, 69(2):309-322.

Wilson RW, Bloomfield VA. Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry*. 1979, 18(11):2192-2196.

ES 2 328 031 T3

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 1465-1468.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 031 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para distribuir un polinucleótido a una célula que comprende un polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico de amidinio y el polinucleótido.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido consiste en ADN.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido consiste en ARN.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido consiste en un siARN.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en un polimidazolinio.
- 15 6. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en un poli-1,3-piperazinio.
7. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en un poli(anillo heterocíclico de 8 miembros con 1,3-nitrógeno).
- 20 8. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en una polietilenimina parcialmente acilada.
- 25 9. La composición de la reivindicación 8, en la que la polietilenimina parcialmente acilada consiste en un derivado N-propionilado de polietilenimina.
10. La composición de la reivindicación 8, en la que la polietilenimina consiste en polietilenimina lineal.
- 30 11. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en polialilamina parcialmente acilada.
12. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico consiste en polivinilamina parcialmente acilada.
- 35 13. La composición de la reivindicación 1, en la que la célula consiste en una célula *in vivo*.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que la célula *in vivo* consiste en una célula de pulmón.
- 40 15. La composición de la reivindicación 13, en la que la célula *in vivo* consiste en una célula de hígado.
16. La composición de la reivindicación 15, en la que la célula de hígado consiste en un hepatocito.
- 45 17. Una composición para distribuir un polinucleótido a una célula que comprende: un polímero que contiene dos o más subunidades de amidinio cíclico, el polinucleótido, y un polianión en un complejo en el que el complejo tiene un potencial Zeta negativo.
18. Un proceso *in vitro* para distribuir un polinucleótido a una célula que comprende: proporcionar una composición definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y asociar la composición con la célula.
- 50 19. Una composición definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso como medicamento.

55

60

65

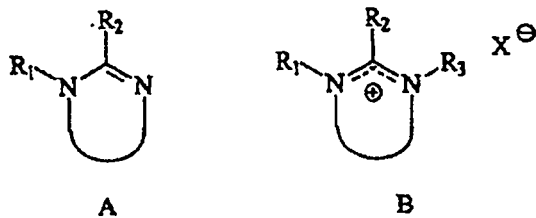


FIG. 1.

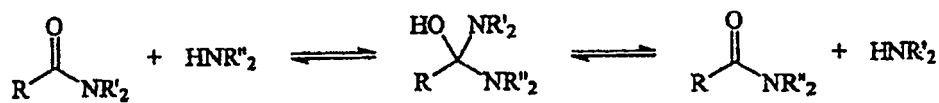


FIG. 2.

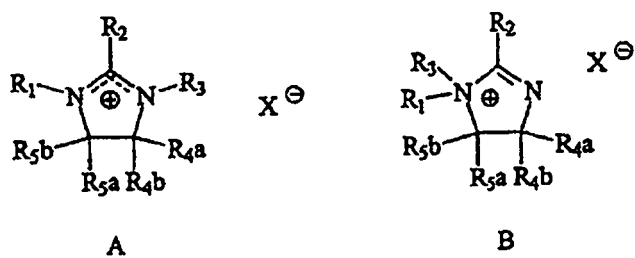


FIG. 3.

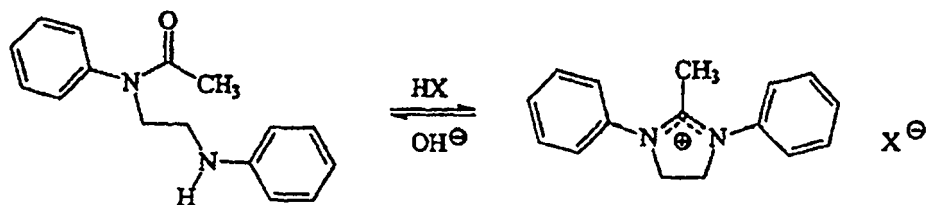


FIG. 4.

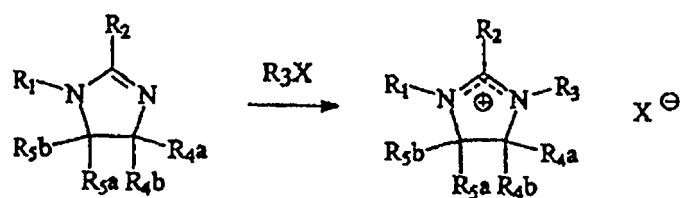


FIG. 5.

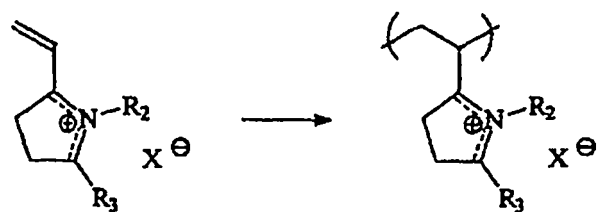
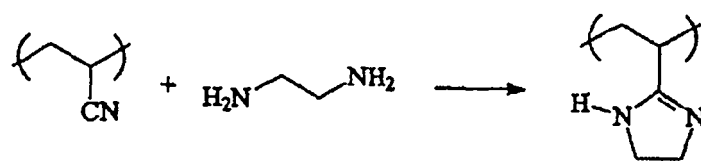


FIG. 6.

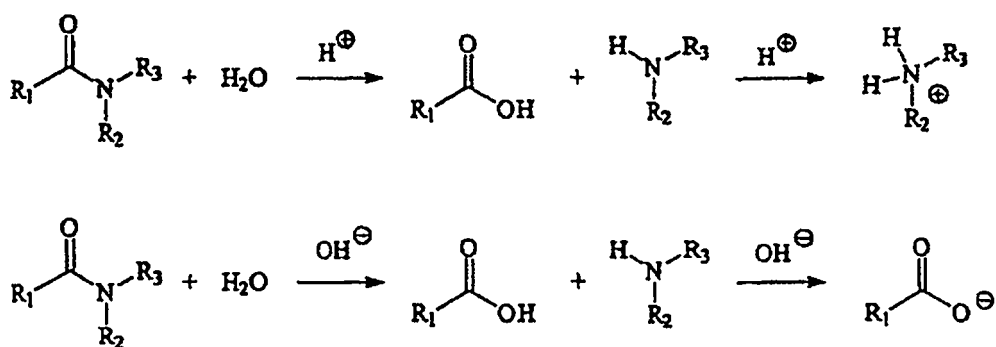


FIG. 7.

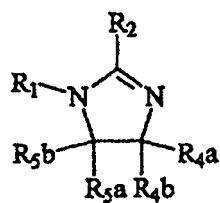


FIG. 8.

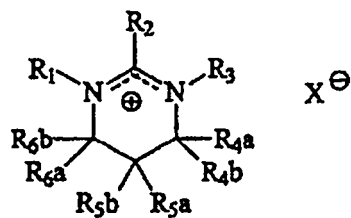


FIG. 9.

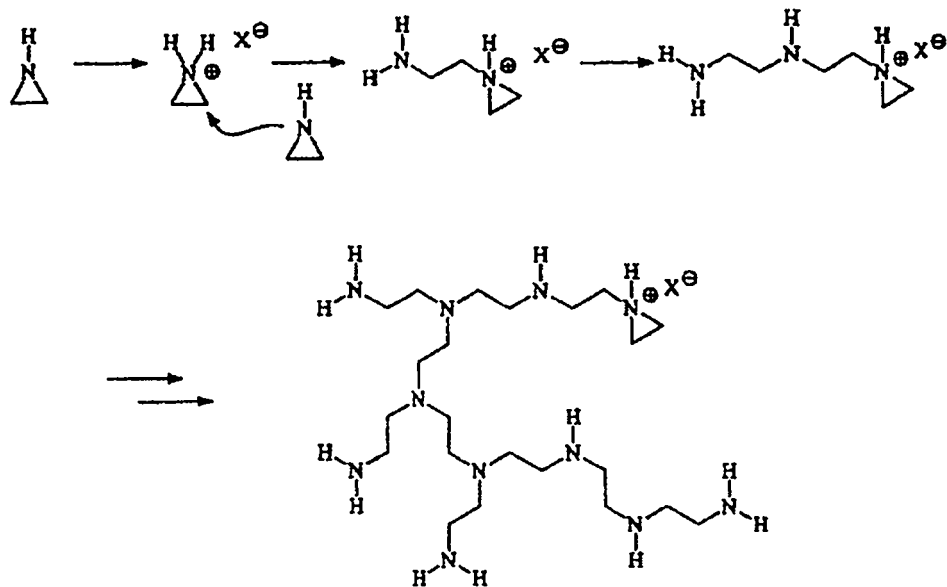


FIG. 10.

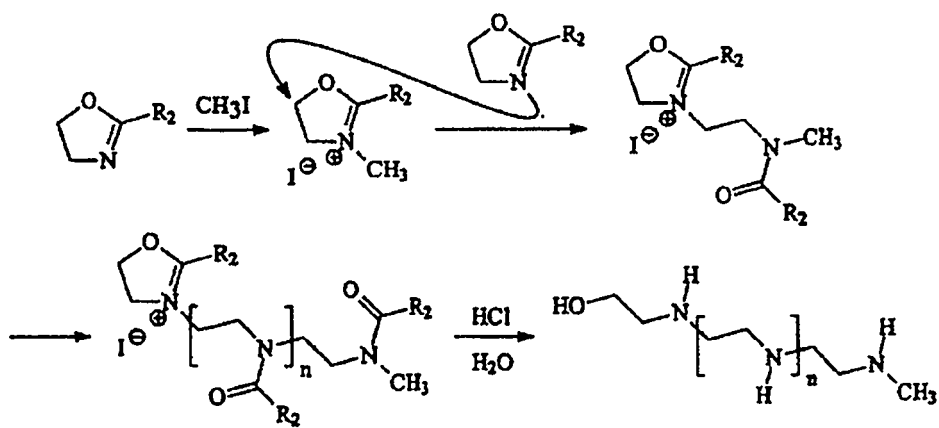


FIG. 11.

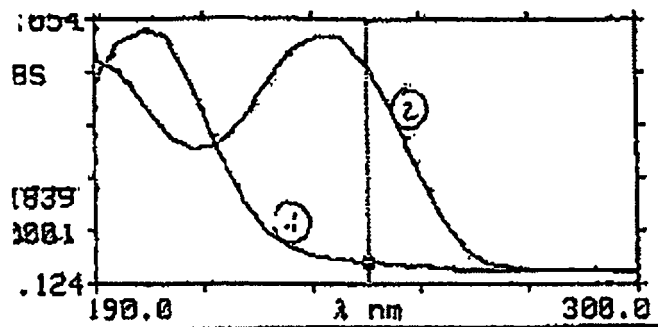


FIG. 12

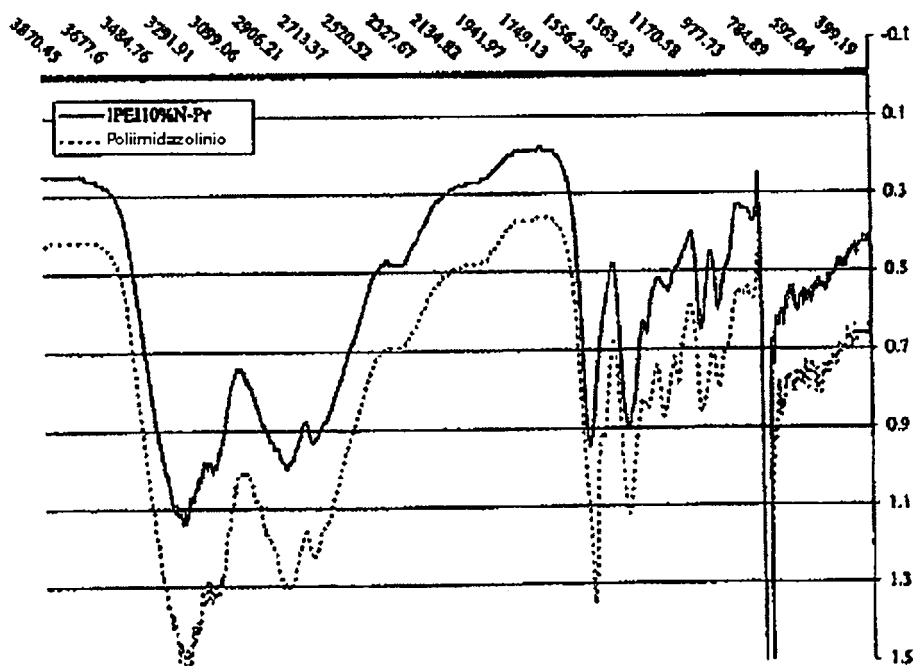


FIG. 13

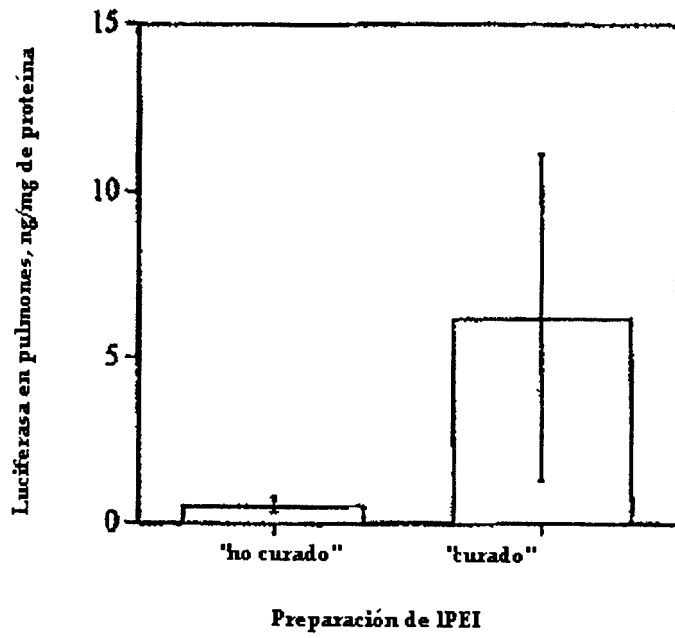


FIG. 14

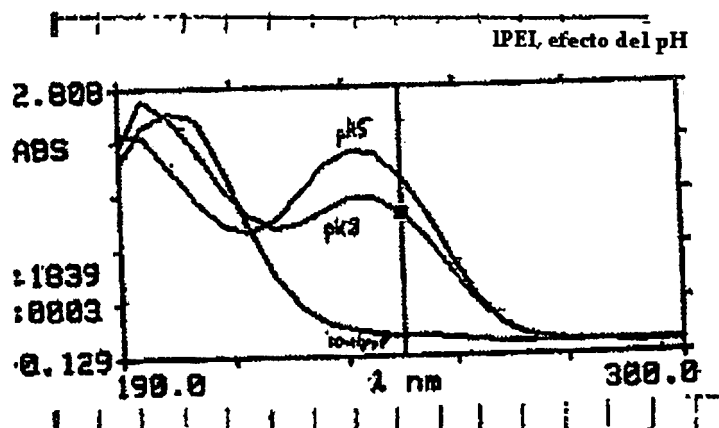


FIG. 15

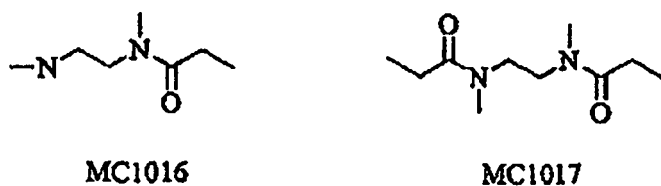


FIG. 16

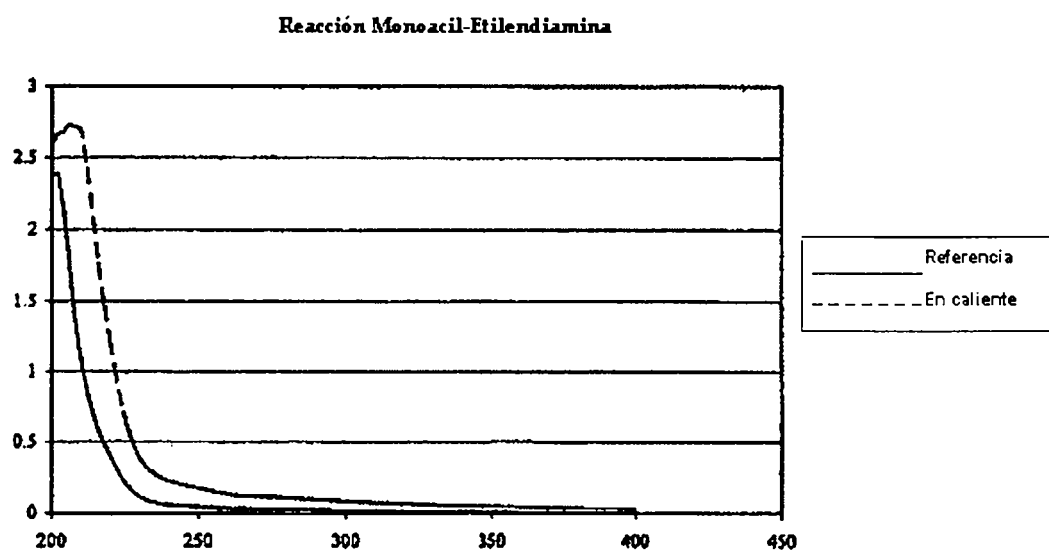


FIG. 17

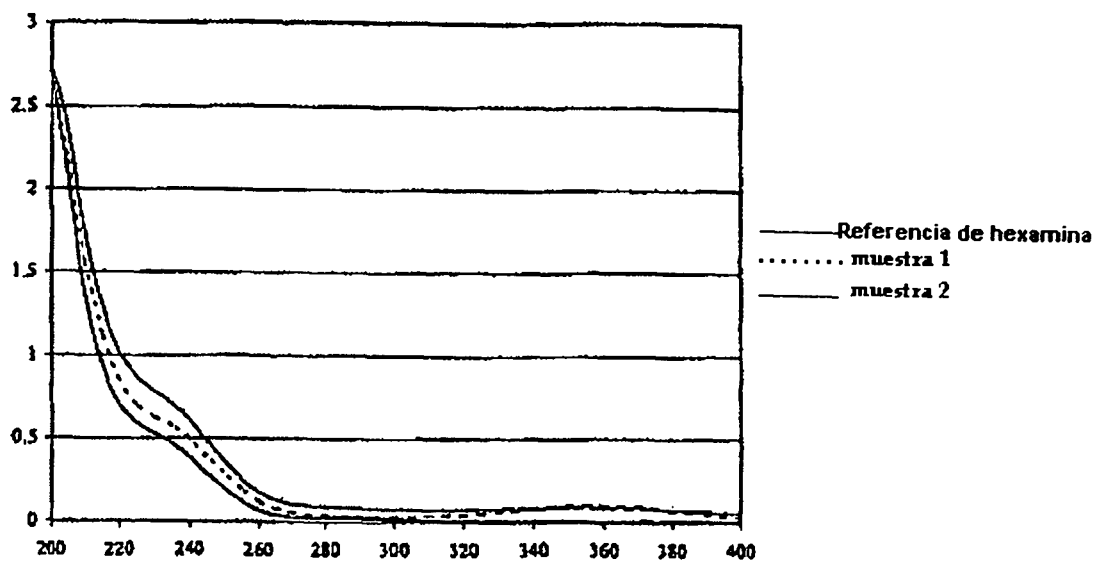


FIG. 18

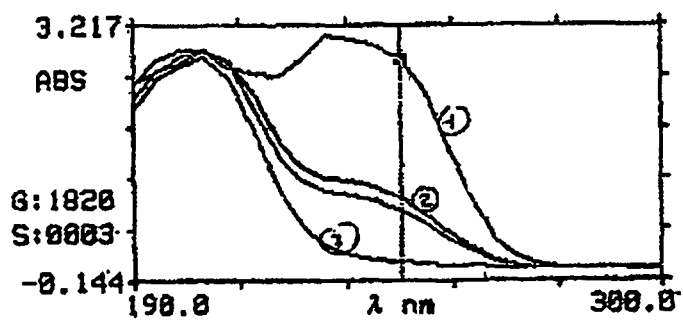


FIG. 19

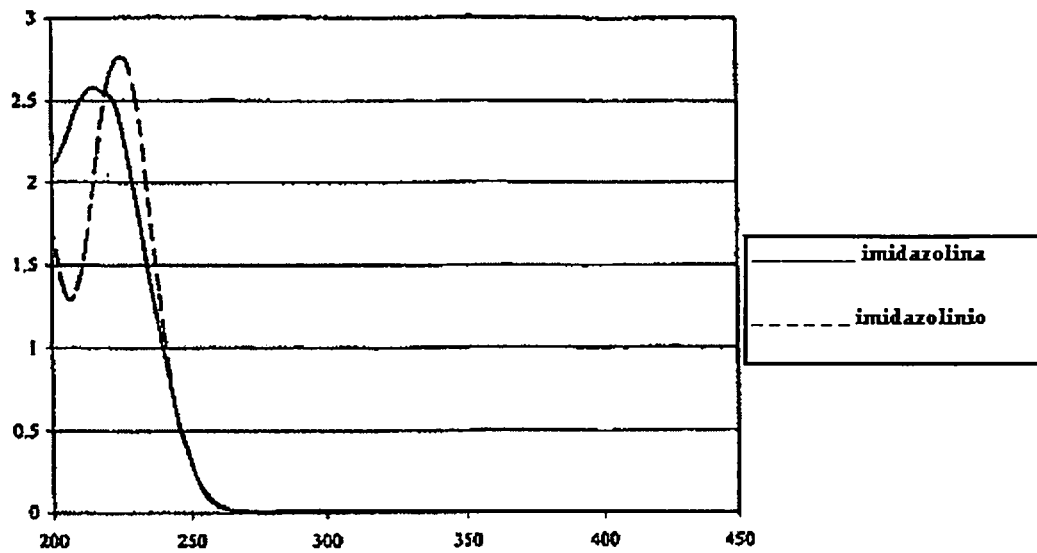


FIG. 20

235011

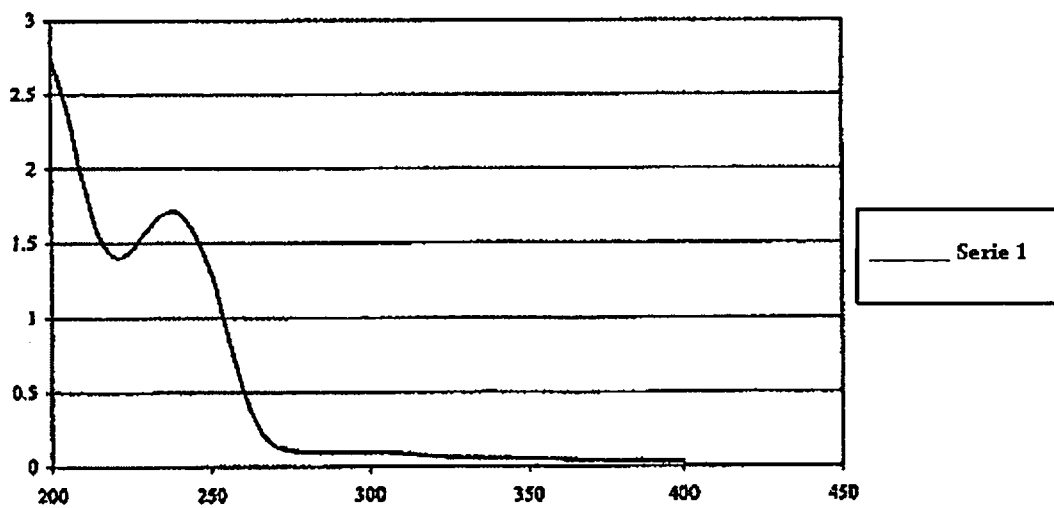


FIG. 21

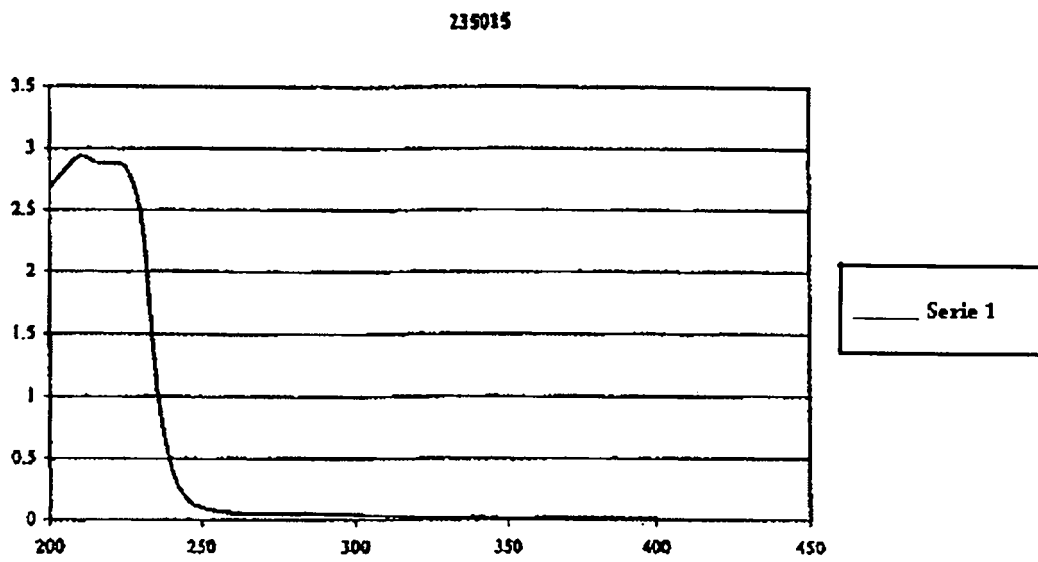


FIG. 22