



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 391**

51 Int. Cl.:
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99922950 .3**
86 Fecha de presentación : **11.05.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1078079**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

54 Título: **Métodos para formar micropartículas lipídicas unidas a proteínas, y sus composiciones.**

30 Prioridad: **12.05.1998 US 76618**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es:
The Regents of the University of California
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, California 94607-5200, US

72 Inventor/es: **Papahadjopoulos, Demetrios;**
Hong, Keelung;
Zheng, Weiwen y
Kirpotin, Dmitri

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 296 391 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

Métodos para formar micropartículas lipídicas unidas a proteínas, y sus composiciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las micropartículas lipídicas, tales como los liposomas, los complejos de lípido:ADN, los complejos de lípido:fármaco y las gotas de microemulsión, unidos a proteínas. En particular, la invención se refiere a micropartículas lipídicas con proteínas unidas que en primer lugar han sido conjugadas con moléculas de enlace que tienen un dominio polimérico hidrofílico y un dominio hidrofóbico capaz de una asociación estable con la micropartícula, o proteínas que han sido manipuladas para contener un dominio hidrofílico y un resto lipídico que permiten la asociación estable con una micropartícula lipídica.

15 **Antecedentes de la invención**

Los liposomas que consisten en moléculas catiónicas anfipáticas son vectores no víricos útiles para la liberación génica *in vitro* e *in vivo* (revisado en Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gen. Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); y Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)). En teoría, los liposomas cargados positivamente forman complejos con ácidos nucleicos cargados negativamente mediante interacciones electrostáticas para formar complejos de lípido:ácido nucleico. Los complejos de lípido:ácido nucleico presentan varias ventajas como vectores de transferencia génica. A diferencia de los vectores víricos, los complejos de lípido:ácido nucleico se pueden usar para transferir casetes de expresión de tamaño esencialmente ilimitado. Como los complejos carecen de proteínas, pueden provocar menos respuestas inmunogénicas e inflamatorias. Además, no se pueden replicar o recombinar para formar un agente infeccioso y tienen una frecuencia de integración baja.

Hay varias publicaciones que demuestran de forma convincente que los lípidos catiónicos anfipáticos pueden mediar en la liberación génica *in vivo* e *in vitro*, mostrando la expresión detectable de un gen indicador en cultivos celulares *in vitro* (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-17 (1987); Loeffler *et al.*, *Methods in Enzymology* 217: 599-618 (1993); Felgner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 2550-2561 (1994)). Debido a que los complejos de lípido:ácido nucleico en ocasiones no son tan eficaces como los vectores víricos para obtener una transferencia génica exitosa, se ha dedicado mucho esfuerzo para encontrar lípidos catiónicos que aumenten la eficacia de la transfección (Behr, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)). Los complejos de lípido:ácido nucleico se consideran con entusiasmo como una herramienta potencialmente útil para la terapia génica.

Varios grupos han informado del uso de complejos de lípido catiónico anfipático:ácido nucleico para la transfección *in vivo* tanto en animales como en humanos (revisado en Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995); Zhu *et al.*, *Science* 261: 209-211 (1993); y Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9742-9746 (1995)). Sin embargo, ni se han estudiado los problemas técnicos para la preparación de complejos que tengan una durabilidad estable. Por ejemplo, a diferencia de las preparaciones de vectores víricos, los complejos de lípido:ácido nucleico son inestables en lo que se refiere al tamaño de partícula (Behr, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)). Por lo tanto, es difícil obtener complejos de lípido:ácido nucleico homogéneos con una distribución de tamaño adecuada para la inyección sistémica. La mayoría de las preparaciones de los complejos de lípido:ácido nucleico son metaestables. Consecuentemente, estos complejos se deben usar típicamente en un periodo de tiempo corto que va de 30 minutos a unas pocas horas. En ensayos clínicos recientes usando lípidos catiónicos como vehículo para la liberación de ADN, los dos componentes se mezclaron a la cabecera del enfermo y se usaron inmediatamente (Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)). La inestabilidad estructural junto con la pérdida de actividad de la transfección de los complejos de lípido:ácido nucleico con el tiempo han sido desafíos para el desarrollo futuro de la terapia génica mediada por lípidos.

Los liposomas que consisten en moléculas catiónicas anfipáticas no son, por supuesto, la única forma de micropartículas lipídicas y la terapia génica no es la única utilidad de tales partículas. Las micropartículas lipídicas también se han usado para la liberación de fármacos y otros agentes en sitios diana. El direccionamiento de las micropartículas se obtiene generalmente mediante el uso de una proteína unida a la superficie de la micropartícula, que puede, por ejemplo, ser un ligando para el receptor de superficie celular de un tipo de célula de interés. Por el contrario, la proteína puede ser un anticuerpo que reconozca específicamente un antígeno en un tipo de célula de interés, tal como células enfermas que porten marcadores específicos. Adicionalmente, las proteínas pueden enlazarse con propósitos distintos que el direccionamiento. Por ejemplo, los liposomas pueden contener profármacos que se filtren lentamente del liposoma en la circulación. Una enzima unida al liposoma puede entonces convertir el profármaco en su forma activa.

Los métodos actuales para llevar a cabo la unión de las proteínas a las micropartículas lipídicas han sido de dos tipos. El primer tipo requiere la introducción de una molécula de enlace que lleva un grupo "activo" (uno que reacciona con un grupo funcional de la proteína) en la composición de la micropartícula antes de la conjugación de la partícula "activada" con la proteína de interés. Las desventajas de los métodos de este tipo son: reacción incompleta, a menudo incontrolable, de la proteína con la molécula de enlace; la presencia de molécula de enlace en exceso en el conjugado resultante, efecto potencialmente adverso de la molécula de enlace sobre la estabilidad de la partícula, y la incapacidad para incorporar componentes reactivos con la molécula de enlace en la composición de la partícula.

El segundo grupo de métodos emplea las etapas de (a) unión de un resto hidrofóbico, tal como una cadena hidrocarbónica, a la molécula de proteína, (b) disolver los componentes de la micropartícula lipídica, junto con el conjugado de la etapa (a) en presencia de un detergente, y (c) eliminar dicho detergente, produciendo la formación de la partícula lipídica que incorpora el conjugado de proteína (Trochilin, *Immunomethods* 4: 244-258 (1994); Laukkanen *et al.*, *Biochemistry* 33: 11664-11670 (1994)). Estos métodos tienen varias desventajas, incluyendo la imposición de limitaciones importantes en la variedad de métodos por los que se puede formar la partícula (por ejemplo, es necesario una técnica para la eliminación del detergente) y por los que el fármaco u otro agente se puede cargar en la micropartícula. Además, la etapa (b) requiere la disolución de la micropartícula. Estos métodos son por lo tanto incapaces de unir una proteína a una partícula prefabricada sin destruirla antes. La presencia de detergentes en estos métodos es inevitable porque sin un detergente la proteína modificada hidrofóticamente es insoluble en un medio acuoso.

Se ha informado de la "inserción" en liposomas de polímeros hidrofílicos unidos por el lípido a un oligopéptido pequeño (5 aminoácidos) o a un oligosacárido pequeño (Zalipsky *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 8: 111-118 (1997)). El péptido y el oligosacárido empleados fueron, sin embargo, de un tamaño (peso molecular, 500-3.000 Da) menor que, o comparable con, el de la molécula de enlace misma (peso molecular 2.750 Da). Por lo tanto, este estudio no proporciona orientación para la inserción en liposomas o en otras micropartículas proteicas lipídicas, tales como anticuerpos o sus fragmentos, conjugados con moléculas de enlace significativamente menores que la proteína. En vista de la naturaleza hidrofílica de los anticuerpos y otras proteínas, la técnica ha enseñado que la porción proteica más larga de dicho conjugado evita la asociación estable del resto de unión hidrofílico con la micropartícula lipídica.

Resumen

La invención proporciona un método para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da por medio de una molécula de enlace, comprendiendo dicho método la etapa de:

incubar la micropartícula lipídica con el polipéptido conjugado con una molécula de enlace que comprende:

(a) un dominio hidrofóbico,

(b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y

(c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en dicho polipéptido y unido a la cadena polimérica hidrofílica en un extremo contralateral con el dominio hidrofóbico,

durante un tiempo suficiente para permitir que el dominio hidrofóbico se asocie de forma estable con la micropartícula lipídica.

La invención también proporciona un método para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da, en el que dicho método comprende la etapa de:

incubar el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos agregada terminalmente que comprende principalmente aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas, cuya secuencia es seguida por un sitio de modificación lipídica con un resto lipídico agregado sintéticamente, con la micropartícula lipídica durante un tiempo suficiente para permitir que el resto lipídico se asocie de forma estable con la micropartícula lipídica.

Además, la invención proporciona una micropartícula lipídica que está conjugada con dos o más polipéptidos diferentes de al menos 6.000 Da, en la que los polipéptidos están conjugados cada uno de ellos con la micropartícula lipídica a través de una molécula de enlace, comprendiendo cada molécula de enlace:

a) un dominio hidrofóbico,

b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y

c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en dicho polipéptido conjugado con dicha molécula de enlace, cuyo grupo químico está unido a la cadena polimérica hidrofílica en un extremo contralateral con el dominio hidrofóbico, cuyos grupos funcionales son el mismo para cada polipéptido.

Adicionalmente todavía, la invención proporciona un kit para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da, comprendiendo dicho kit:

(i) un envase que contiene dicha micropartícula lipídica, y

(ii) un envase que contiene dicho polipéptido unido a un polímero hidrofílico unido a un dominio hidrofóbico;

en el que dicha micropartícula lipídica y dicho polipéptido se asocian de forma estable cuando se incuban juntos.

La micropartícula lipídica puede ser un complejo de lípido:ácido nucleico. La presente descripción proporciona un nuevo método para preparar complejos de lípido catiónico:ácido nucleico que presentan una durabilidad aumentada.

En un modo de realización, estos complejos se preparan poniendo en contacto un ácido nucleico con un policatión orgánico para producir un ácido nucleico condensado o parcialmente condensado. El ácido nucleico condensado se combina entonces con un lípido catiónico anfipático más un lípido auxiliar neutro, tal como colesterol, en una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, produciendo el complejo de lípido:ácido nucleico. Opcionalmente, se añade subsiguientemente un polímero hidrofílico al complejo de lípido:ácido nucleico. Alternativamente, el polímero hidrofílico se añade a un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que no ha sido condensado. Estos complejos de lípido:ácido nucleico tienen una durabilidad aumentada, por ejemplo cuando se almacenan a 22°C o menos, en comparación con idénticos complejos de lípido:ácido nucleico en los que el componente ácido nucleico no se ha puesto en contacto con el policatión orgánico y/o en los que el complejo de lípido:ácido nucleico no se ha puesto en contacto con un polímero hidrofílico.

Preferiblemente, el policatión es una poliamina, más preferiblemente una poliamina tal como la espermidina o la espermina.

Preferiblemente también, los complejos de lípido:ácido nucleico se preparan combinando un ácido nucleico con un lípido catiónico anfipático y combinando luego el complejo así formado con un polímero hidrofílico. Este complejo de lípido:ácido nucleico tiene una durabilidad aumentada, por ejemplo cuando se almacena a 22°C o menos, en comparación con un complejo idéntico que no ha sido combinado con el polímero hidrofílico.

El polímero hidrofílico se elige, por ejemplo, entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), un derivado de polietilenglicol con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), un derivado de polietilenglicol con tween, un derivado de polietilenglicol con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), gangliósido G_{MI} y polímeros sintéticos.

El complejo de lípido:ácido nucleico puede estar liofilizado.

En cualquiera de los métodos y composiciones de esta invención, el ácido nucleico puede ser virtualmente cualquier ácido nucleico, por ejemplo un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN) y un ácido péptidonucleico (APN), etc., y más preferiblemente es un ADN. En un modo de realización particularmente preferido, el ADN es un casete de expresión capaz de expresar un polipéptido en una célula transfectada con el complejo de lípido:ácido nucleico.

Los complejos de lípido:ácido nucleico se elaboran, por ejemplo, formando en primer lugar un liposoma y luego combinando el liposoma formado con un ácido nucleico condensado o parcialmente condensado para formar un complejo de lípido:ácido nucleico. Opcionalmente, el complejo de lípido:ácido nucleico se pone en contacto subsiguientemente con un polímero hidrofílico. Los liposomas pueden combinarse alternativamente con un ácido nucleico no condensado para formar un complejo de lípido:ácido nucleico al que se le añade posteriormente un polímero hidrofílico (por ejemplo, PEG-PE). Un complejo de lípido:ácido nucleico preparado por la combinación de un ácido nucleico y un liposoma en contacto con un polímero hidrofílico se puede combinar subsiguientemente con un polímero hidrofílico adicional. Preferiblemente, el lípido y el ácido nucleico se combinan en una relación que va de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 y lo más preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 nmoles de lípido:μg de ácido nucleico. El lípido y el polímero hidrofílico se combinan en una relación molar que va de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 5% y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0% (relación molar entre el polímero hidrofílico y el lípido catiónico del complejo).

Esta descripción también proporciona un método para transfectar un ácido nucleico en una célula de mamífero, comprendiendo el método poner en contacto la célula con uno cualquiera de los complejos de lípido:ácido nucleico preparado como se ha descrito anteriormente. El método puede usar la administración sistémica de un complejo de lípido:ácido nucleico a un mamífero. Preferiblemente, el método para la transfección usa la administración intravenosa del complejo de lípido:ácido nucleico a un mamífero. En un método particularmente preferido, el método comprende poner en contacto una célula específica que expresa un ligando que reconoce un fragmento Fab' presente en el complejo.

Esta descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo de lípido:ácido nucleico condensado como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas comprenden una dosis terapéuticamente eficaz del complejo de lípido:ácido nucleico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B ilustran el papel de un lípido neutro en la liberación génica. Se ensayó la liberación génica en tres liposomas tanto en células de cultivo (SKBR-3, célula de cáncer de mama humano) como en ratones (CD1, hembras, 20-25 g). Las muestras fueron: (1) DDAB/Col (1:1); (2) DDAB/Col/DOPE (1:0,5:0,5); (3) DDAB/DOPE (1:1); y (4) DDAB solo. La figura 1A ilustra la transfección celular. Se pusieron en placas las células SKBR-3 a razón de 50.000 células por pozo en placas de doce pozos y se incubaron durante la noche. Cada pozo recibió 1 μg de plásmido P-CMWIVSLuc+ que formó complejos con liposomas a razón de 5 nmoles de DDAB. Las células se cultivaron después de 24 horas de incubación con los complejos a 37°C. Los valores presentados son la media de 2 pozos. Los valores variaron entre 10-30% de la media. La figura 1B ilustra la transfección de ratones *in vivo*. Los ratones recibieron a través de la vena de la cola una inyección de 40 μg de plásmido P-CMWIVS-Luc+, que formó

ES 2 296 391 T3

complejos con liposomas a razón de 8 nmoles de DDAB por μg de ADN. Los valores presentados son la media de 2 ratones. Los valores variaron entre 20-25% de la media.

5 La figura 2 ilustra la expresión de un gen indicador en extractos de tejido de ratón. Los ratones recibieron (por inyección en la vena de la cola) 60 μg de plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó complejos con liposomas DDAB/Col (1:1) a razón de 8 nmoles de DDAB por μg de ADN (sin espermidina). Los valores presentados son la media de 3 ratones.

10 La figura 3 ilustra la duración de la expresión del gen indicador en pulmón de ratón. Cada animal recibió 40 μg de plásmido P-CMVIVS-Luc+, que formó complejos con liposomas DDAB/Col (1:1) a razón de 8 nmoles de DDAB por μg de ADN.

15 La figura 4 ilustra la liberación génica en pulmón de ratón mediante varios complejos estabilizados. Cada ratón recibió 60 μg de plásmido P-CMVIVS-Luc+ que formó complejos con liposomas DDAB/Col (1:1) a razón de 8 nmoles de DDAB/ μg de ADN. Los valores presentados son la media de tres ratones. Barras punteadas: complejos recién preparados; barras sólidas: muestras preparadas hace un mes. Las muestras fueron las siguientes: (1) sin adición de agente estabilizador; (2) se añadió PEG-PE a razón de 1% del lípido total a los complejos formados; y (3) se añadió espermidina (0,5 nmoles por μg de ADN) al plásmido antes de la formación del complejo.

20 Las figuras 5A y 5B ilustran la transfección *in vitro* de las líneas celulares con complejos de inmunolípido:ADN. Las muestras fueron las siguientes: (1) DDAB/DOPE (1:1), que producen complejos de liposomas catiónicos solo con ADN; (2) DDAB/DOPE (1:1) con 1% de derivado de PEG-PE con maleimida en la última posición del PEG, que producen liposomas con el componente de estabilización estérica añadido después de la formación del complejo con ADN; y (3) DDAB/DOPE (1:1) con 1% de derivado de PEG-PE con el fragmento Fab' de un anticuerpo anti-HER2 humanizado unido a la última posición del PEG a través del grupo tiol libre al resto maleimida.

Definiciones

30 En la presente memoria se usan las siguientes abreviaturas: Col, colesterol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; SM, esfingomielina; M-DPE, derivado de maleimida con dipalmitoietanolamina; PBS, disolución salina tamponada con fosfato; LUV, vesículas unilamelares grandes; MLV, vesículas multilamelares; PE, fosfatidiletanolamina; PEG, polietilenglicol; PEG-PE, derivado de polietilenglicol con fosfatidiletanolamina; DC-Col, 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbanoil]-colesterol; DDAB, bromuro de dimetildioctadecilamonio; DMEPC, dimiristoilglicero-3-etilfosfocolina; DODAP, dioleoil-3-dimetilamonio propano; DOEPC, dioleoilglicero-3-etilfosfocolina; DOGS, N,N-dioctadecilamidoglicilespermina; DOPE, dioleoilfosfatidiletanolamina; DOTAP, dioleoil-3-trimetilamonio propano; DOTMA, bromuro de N-[2,3-(dioleiloxi)propil]N,N,N-trimetilamonio; DSPE, diestearoilfosfatidiletanolamina; PEG-PE, N-[ω -metoxipoli(oxietileno)- α -oxicarbonil]-DSPE; POEPC, palmitoiloleoilglicero-3-etilfosfocolina.

40 La expresión "lípido catiónico anfipático" pretende incluir cualquier lípido anfipático, incluyendo los lípidos sintéticos y los análogos de lípidos, que tienen restos con un grupo principal hidrofóbico y uno polar, una carga neta positiva y que pueden formar por sí mismos espontáneamente vesículas bicapa o micelas en agua, como por ejemplo los fosfolípidos. La expresión también incluye cualquier lípido anfipático que se incorpore de forma estable en bicapas lipídicas en combinación con fosfolípidos con su resto hidrofóbico en contacto con el interior, la región hidrofóbica de la membrana bicapa, y su resto del grupo principal polar orientado hacia el exterior, superficie polar de la membrana.

50 La expresión "enlace específico" se refiere al enlace que se produce entre especies emparejadas, tales como enzima/sustrato, receptor/agonista, anticuerpo/antígeno y lectina/hidrato de carbono, que puede estar mediado por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. Cuando la interacción de las dos especies produce un complejo enlazado no covalentemente, el enlace que se produce es típicamente electrostático, enlace de hidrógeno o el resultado de interacciones lipofílicas. Consecuentemente, el "enlace específico" se produce entre especies emparejadas cuando existe interacción entre las dos que produce un complejo enlazado que tiene las características de una interacción anticuerpo/antígeno o enzima/sustrato. En particular, el enlace específico se caracteriza por el enlace de un miembro de un par a una especie particular y no a otra especie en la familia de compuestos a la que pertenece el miembro correspondiente del miembro enlazado. Así, por ejemplo, un anticuerpo se enlaza preferiblemente a un único epítope y no a otro epítope en la familia de las proteínas.

60 El término "ligando" o la expresión "resto de direccionamiento", como se usan en la presente memoria, se refiere generalmente a todas las moléculas capaces de enlazarse específicamente a una molécula diana en particular y formar un complejo enlazado como se ha descrito anteriormente. Así, el ligando y su correspondiente molécula diana forman un par de enlace específico. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos, linfocinas, citocinas, proteínas receptoras, tales como CD4 y CD8, proteínas receptoras solubilizadas, tal como CD4 soluble, hormonas, factores de crecimiento y similares, que se enlazan específicamente a las células diana deseadas, y ácidos nucleicos que se enlazan a los ácidos nucleicos correspondientes a través de un par de bases complementarias. Los restos de direccionamiento preferidos particularmente incluyen los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, el fragmento Fab').

ES 2 296 391 T3

La expresión “complejo de lípido:ácido nucleico” se refiere al producto elaborado mezclando lípidos catiónicos anfipáticos o liposomas con un ácido nucleico. El término “CLDC”, que significa “complejo de lípido catiónico:ADN” (por sus iniciales en inglés: cationic lipid:DNA complex), tal como se usa en la presente memoria, no está limitado al ADN y es una abreviatura conveniente para los complejos de lípido:ácido nucleico. El complejo de lípido:ácido nucleico también puede incluir un lípido auxiliar. El lípido auxiliar es a menudo un lípido neutro, tal como DOPE o colesterol, siendo el colesterol el más preferido. El complejo de lípido:ácido nucleico también puede contener otros compuestos, tales como un policatión que esté en contacto con el ácido nucleico del complejo, produciendo un ácido nucleico condensado, y polímeros hidrofílicos, tales como PEG y derivados del PEG.

El término “inmunoliposoma” y la expresión “complejo de inmunolípido:ácido nucleico” se refieren a un liposoma o un complejo de lípido:ácido nucleico que llevan un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que actúa como un resto de direccionamiento que permite que el complejo de lípido:ácido nucleico se enlace específicamente a una molécula “diana” particular que puede existir en disolución o puede estar enlazada a la superficie de una célula. Cuando la molécula diana es una que se encuentra típicamente en exceso relativo (por ejemplo, en 10 veces superior) y asociada con un tipo de célula particular o alternativamente en varios tipos de células expresando todas ellas una condición fisiológica particular, la molécula diana se denomina “marcador característico” de dicho tipo de célula o dicha condición fisiológica. Así, por ejemplo, un cáncer se puede caracterizar por la sobre-expresión de un marcador particular, tal como el proto-oncogén HER2 (*c-erbB-2/neu*) en el caso del cáncer de mama.

Un “polímero hidrofílico”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero neutro flexible altamente hidratado unido a moléculas de lípido. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, polietilenglicol (PEG), derivados de polietilenglicol con fosfatidiletanolamina (PEG-PE), derivados de polietilenglicol con tween, derivados de polietilenglicol con diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), gangliósido G_{M1} y polímeros sintéticos. Tales polímeros tienen típicamente un peso molecular en el intervalo de 1.000-10.000. Preferiblemente el peso molecular del PEG es de aproximadamente 2.000.

“Transfección” se refiere a poner en contacto una célula viva con un ácido nucleico, por ejemplo, como parte de un complejo de lípido:ácido nucleico.

“Actividad de la transfección” se refiere a la eficacia para introducir un ácido nucleico en una célula viva. La eficacia de la transfección se puede medir determinando la cantidad de expresión de un gen indicador que ha sido transfectado en células como parte de un complejo de lípido:ácido nucleico, por ejemplo, mediante análisis funcional o de fluorescencia.

Las expresiones “ácido nucleico condensado” y “ácido nucleico parcialmente condensado” se usan para referirse a un ácido nucleico que ha sido puesto en contacto con un catión orgánico, por ejemplo poliaminas, incluyendo espermina y espermidina, moléculas con poliamonio, tales como Polibreno (bromuro de hexadimetrina), poliaminoácidos básicos y proteínas básicas. Los ácidos nucleicos condensados ocupan típicamente un volumen significativamente menor que los ácidos nucleicos no condensados. Se considera, sin embargo, que el grado de condensación puede variar con el medio local (por ejemplo, medio lipídico en oposición al medio acuoso).

El término “durabilidad”, cuando se usa para referirse a los complejos de lípido:ácido nucleico descritos en la presente memoria, se refiere al periodo de tiempo en el que el complejo de lípido:ácido nucleico se puede almacenar (en condiciones definidas, por ejemplo a 4°C) antes de perder su actividad biológica. La actividad biológica analizada para la determinación de la durabilidad en la presente invención es la capacidad del complejo de lípido:ácido nucleico para transfectar células de mamífero *in vivo* después de la administración intravenosa. La “durabilidad” de un complejo de lípido:ácido nucleico se determina convenientemente analizando la expresión génica de ácidos nucleicos indicadores en el complejo de lípido:ácido nucleico como se describe en la presente memoria.

Un “casete de expresión” se refiere a un promotor unido de forma operable a una molécula de ADN, que contiene todos los elementos necesarios para la expresión de dicha molécula de ADN en una célula viva. El casete de expresión puede contener elementos adicionales, tales como potenciadores, origen de replicación y similares, formando un vector de expresión.

“Policatión orgánico” o “policatión” se refieren a una estructura polimérica orgánica en la que más de una unidad del polímero lleva una carga negativa y la carga neta del polímero es positiva. Ejemplos de tales cationes orgánicos son las poliaminas, incluyendo la espermina y la espermidina, moléculas con poliamonio, tal como el Polibreno (bromuro de hexadimetrina), poliaminoácidos básicos o proteínas básicas.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” es un material que no es inadecuado biológicamente o de otra forma, es decir el material puede ser administrado a un individuo junto con el complejo de lípido:ácido nucleico sin producir efectos biológicos inaceptables ni interactuar de forma perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

El término “ácido nucleico” se refiere a un polímero y oligómero compuesto por unidades de nucleótido (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o variantes estructurales relacionadas o sus análogos sintéticos) unidos mediante enlaces de fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o sus análogos sintéticos). Por lo tanto, el término se refiere a un polímero nucleotídico en el que los nucleótidos y los enlaces entre ellos se producen naturalmente (ADN

ES 2 296 391 T3

o ARN), así como varios análogos, por ejemplo y sin limitación, ácidos péptido-nucleicos (APNs), fosforoamidatos, fosforotiolatos, metilfosfonatos, ácidos 2-O-metil-ribonucleicos y similares.

5 La expresión “porcentaje en moles” cuando se refiere al porcentaje de polímero hidrofílico en un liposoma se expresa con respecto al lípido catiónico en el liposoma, a menos que se indique de otra forma. Así, por ejemplo, en un liposoma que comprende una relación entre DDAB y colesterol (Col) de 100:100, un 4 por ciento en moles de polímero hidrofílico (por ejemplo, PEG) representaría una relación de DDAB:Col:PEG de aproximadamente 100:100:4.

10 El término “idéntico” se refiere a una composición que está formada usando los mismos compuestos que otra composición, en la que la composición no se diferencia de forma estadísticamente significativa.

15 La expresión “administración sistémica” se refiere a un método de administración de un compuesto o composición a un mamífero, de forma que el compuesto o composición se libera en muchos sitios en el cuerpo a través del sistema circulatorio.

20 Como se usa en la presente memoria, una “molécula de enlace” significa una molécula que comprende (a) un dominio hidrofóbico, (b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y (c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en una molécula de proteína y unido a dicha cadena polimérica en, o cerca de, el extremo contralateral al dominio hidrofóbico.

25 La expresión “dominio hidrofóbico” de, por ejemplo, una molécula de enlace significa un ácido graso, alcohol graso, esterol u otra molécula hidrofóbica capaz de distribuirse en una fase lipídica a partir de un medio acuoso. Por ejemplo, un dominio hidrofóbico puede ser un diacilglicerol, un fosfolípido, un esterol, tal como colesterol, o un derivado de la diacilamida, tal como la N,N-diestearoil-glicenamida.

30 La expresión “resto lípido” con referencia a una molécula de proteína significa una red compuesta por uno o más dominios hidrofóbicos enlazados covalentemente de forma directa a la molécula de proteína.

Los términos “proteína” y “péptido” se diferencian generalmente en la técnica por su peso molecular, considerándose como péptidos los polipéptidos por debajo de 6.000 Dalton y considerándose como proteínas aquellos de o por encima de 6.000 Dalton. Véase, por ejemplo, McMurray, *Organic Chemistry* (Brooks/Cole Publishing Co., Belmont, CA) (1998) en la página 971. El uso de estos términos en la presente memoria sigue esta distinción.

Descripción detallada

35 Esta descripción proporciona métodos para aumentar la durabilidad de complejos de lípido catiónico:ácido nucleico y la eficacia de la transfección *in vivo* e *in vitro* de estos complejos. Dichos complejos han atraído considerable interés como un medio para liberar ácidos nucleicos que expresan varios polipéptidos terapéuticos y como un medio para liberar por sí mismos ácidos nucleicos terapéuticos (por ejemplo, antisentido). Desafortunadamente, ha sido difícil mantener y almacenar complejos de lípido:ácido nucleico homogéneos adecuados para la administración *in vivo*. Los complejos tienden a agregarse rápidamente o se descomponen en un tiempo relativamente corto. Esta inestabilidad ha hecho necesario el uso de estos complejos en un periodo corto de tiempo después de la preparación, a menudo tan corto como 30 minutos hasta unas pocas horas. Así, por ejemplo, en ensayos clínicos recientes usando lípidos catiónicos como vehículos para la liberación del ADN, los componentes de ADN y lípido se mezclaron a la cabecera de la cama y se usaron inmediatamente (Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)).

45 La inestabilidad del complejo de lípido:ácido nucleico proporciona un impedimento significativo para la aceptación general de los complejos de lípido catiónico:ácido nucleico como agentes terapéuticos. La necesidad de la preparación del complejo poco tiempo antes de su uso requiere que un establecimiento farmacéutico relativamente próximo al área de uso. Alternativamente, la combinación del lípido y el ácido nucleico a la cabecera del enfermo impone una carga de trabajo considerable, introduce problemas de control de calidad para asegurar la adecuada formación del complejo y crea una fuente de error potencial.

50 La presente descripción resuelve estos problemas proporcionando métodos para aumentar significativamente la durabilidad (tiempo de almacenamiento) de los complejos de lípido:ácido nucleico. Los métodos generalmente implican: (1) condensar el ácido nucleico antes de la incorporación en el complejo de lípido:ácido nucleico; (2) combinar un complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrofílico (por ejemplo, PEG); y (3) condensar el ácido nucleico antes de la formación del complejo y combinar el complejo con un polímero hidrofílico.

60 Aunque la condensación de los ácidos nucleicos puede conducir a la estabilidad del ácido nucleico al aislarlo (por ejemplo, en una disolución tampón acuosa), se ha descubierto sorprendentemente que el uso de un agente de condensación (por ejemplo, un policatión orgánico) proporciona un complejo de lípido:ácido nucleico que permanece capaz de transfectar una célula *in vivo* incluso después de un periodo de almacenamiento prolongado (por ejemplo, almacenamiento en frío a una temperatura de aproximadamente 22°C o inferior, más preferiblemente que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 22°C y lo más preferible a aproximadamente 4°C).

65 También se ha descubierto sorprendentemente que los complejos de lípido:ácido nucleico combinados con un polímero hidrofílico unido a un lípido anfipático (por ejemplo, PEG-PE) también presentan una durabilidad aumentada.

Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que cuando el complejo de lípido catiónico:ADN (“CLDC”) se pone en contacto con el polímero hidrofílico, el polímero hidrofílico se localiza y se incorpora en las bolsas hidrofóbicas en el complejo a través de sus cadenas laterales hidrofóbicas, dejando a la vez la parte hidrofílica en la superficie exterior, estabilizando de esta forma el complejo completo.

A la vista de estos descubrimientos, esta descripción proporciona métodos para aumentar la durabilidad de los complejos de lípido catiónico:ácido nucleico. Los métodos implican generalmente bien condensar el ácido nucleico usando un polímero y/o bien poner en contacto, por ejemplo mediante recubrimiento, el complejo de lípido:ácido nucleico con un polímero hidrofílico.

Esta invención proporciona métodos para formar micropartículas lipídicas con proteínas unidas adecuadas, por ejemplo, para dirigir las micropartículas a células o tejidos elegidos. Los métodos proporcionan varias ventajas sobre los métodos anteriores:

- (1) debido a la naturaleza cuantitativa de la inserción, el número de proteínas por partícula es altamente reproducible y se puede definir de forma precisa;
- (2) se puede unir más de un tipo de proteína a la superficie de la misma partícula en una proporción precisa;
- (3) si el conjugado proteína-molécula de enlace se purifica antes de la inserción en una superficie de la partícula, la partícula no llevará moléculas de enlace sin conjugar;
- (4) la partícula puede contener en su composición moléculas reactivas frente al grupo activo de la molécula de enlace. Por ejemplo, la partícula puede contener tioles incluso si el grupo activo es maleimida;
- (5) si la partícula es una vesícula, las moléculas de enlace/proteína solo estarán presentes en la superficie externa; y
- (6) el método aumenta la utilidad de partículas prefabricadas conocidas, tales como los liposomas farmacéuticos elaborados comercialmente, permitiendo la adición de conjugados unidos a la superficie que portan proteínas de interés.

I.- Complejos de lípido catiónico:ácido nucleico

Como se ha explicado anteriormente, esta descripción proporciona métodos para aumentar el tiempo de almacenamiento (durabilidad) de los complejos de lípido:ácido nucleico. Preferiblemente, los complejos se forman por la combinación de un ácido nucleico con un liposoma. Se considera, sin embargo, que no es necesario suministrar los lípidos como liposomas. También se considera que después de la formación del complejo, los complejos de lípido:ácido nucleico pueden no existir ya como una vesícula verdadera y, por lo tanto, no se consideran generalmente como liposomas. La preparación de los complejos de lípido:ácido nucleico es bien conocida para los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, la revisión en Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995)); Blaese *et al.*, *Cancer Gen. Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); y Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995)). Los diversos componentes y elaboración de los complejos de lípido:ácido nucleico estabilizados de la invención se describen detalladamente a continuación.

A.- Lípidos catiónicos anfipáticos

Como se ha indicado anteriormente, los métodos descritos en la presente memoria implican la formación de un complejo de un lípido catiónico con un ácido nucleico. El término “lípido catiónico” se refiere a cualquiera entre las especies lipídicas que portan una carga neta positiva a pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Col y DMRIE. Adicionalmente, están disponibles varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos que pueden usarse en la presente invención. Estas incluyen, por ejemplo, LIPOFECTIN® (liposomas catiónicos disponibles comercialmente que comprenden DOTMA y DOPE, de GIBCO/BRL, Grand Island, Nueva York, EE.UU.); LIPOFECTAMINA® (liposomas catiónicos disponibles comercialmente que comprenden DOSPA y DOPE, de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (lípidos catiónicos disponibles comercialmente que comprenden DOGS en etanol, de Promega Corp., Madison, Wisconsin, EE.UU.).

El lípido catiónico se puede usar solo o en combinación con un lípido “auxiliar”. Los lípidos auxiliares preferidos son los no iónicos o no cargados a pH fisiológico. Lípidos no iónicos particularmente preferidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, colesterol y DOPE, siendo el colesterol el más preferido.

La relación molar entre el lípido catiónico y el auxiliar puede variar de 2:1 a aproximadamente 1:2, más preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 1:1,5 y lo más preferido es de aproximadamente 1:1.

Lípidos catiónicos y no iónicos adicionales adecuados para el uso en los complejos de lípido:ácido nucleico de la presente invención son bien conocidos por los expertos y se citan en varias fuentes bien conocidas, por ejemplo: *McCutcheon's Detergents and Emulsifiers* y *McCutcheon's Functional Materials*, Allured Publishing Co., Ridgewood, N. J. Los lípidos preferidos incluyen DDAB:colesterol o DOTAP:colesterol en una relación molar de 1:1.

B.- Ácido nucleico

Los complejos de lípido:ácido nucleico contienen un ácido nucleico, típicamente un casete de expresión que se ha construido usando técnicas recombinantes. Un ácido nucleico recombinante se prepara en primer lugar aislando el ácido nucleico de interés. El ácido nucleico aislado se une entonces en un casete o vector adecuado para la expresión del gen. Los métodos para preparar un ácido nucleico recombinante son conocidos por los expertos en la técnica (véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989)).

El gen de interés, por ejemplo un gen que codifica un polipéptido terapéutico o un gen indicador, se puede insertar en un “vector de expresión”, “vector de clonación” o “vector”, términos que usualmente se refieren a plásmidos u otras moléculas de ácido nucleico que son capaces de replicarse en una célula huésped elegida y expresar el gen de interés. Los vectores de expresión se pueden replicar de forma autónoma o se pueden replicar mediante su inserción en el genoma de la célula huésped. A menudo, es deseable que un vector se pueda usar en más de una célula huésped, por ejemplo en *E. Coli* para la clonación y construcción y en una célula de mamífero para la expresión. Los elementos adicionales del vector pueden incluir, por ejemplo, marcadores elegibles y mejoradores. Los marcadores elegibles, por ejemplo resistencia a la tetraciclina o resistencia a la higromicina, permiten la detección y/o selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.704.362). El vector particular usado para transportar la información génica dentro de la célula tampoco es particularmente crítico. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión de las proteínas recombinantes en células procarióticas o eucarióticas.

Los vectores de expresión tienen típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos necesarios para la expresión del ácido nucleico en las células huésped. Un casete de expresión típico contiene un promotor unido de forma operativa a la secuencia de ADN que codifica una proteína. El promotor está situado preferiblemente a aproximadamente la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heteróloga como lo está del sitio de inicio de la transcripción en su estructura natural. Como se conoce en la técnica, sin embargo, se puede dar lugar a alguna variación en esta distancia sin pérdida en su función de promotor.

En el casete de expresión, la secuencia del ácido nucleico de interés puede estar unida a una secuencia que codifica una secuencia de un péptido de señal escindible para promover la secreción de la proteína codificada en la célula transformada. El casete de expresión debería contener también una región de terminación de la transcripción en dirección 3' del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener a partir del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener a partir de un gen diferente.

Para una traducción más eficaz en células de mamífero del ARNm codificado por el gen estructural también se añaden generalmente secuencias de poliadenilación al casete de expresión. Las señales de terminación y de poliadenilación que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40, o una copia genómica parcial de un gen ya residente en el vector de expresión.

Además del casete de expresión, muchos vectores de expresión incluyen de forma óptima elementos potenciadores que pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces la de los promotores homólogos o heterólogos unidos. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen un amplio espectro de huéspedes y son activos en varios tejidos. Por ejemplo, el potenciador del gen de expresión precoz del SV40 es adecuado para muchos tipos de células. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para la presente invención incluyen los derivados del virus del polioma, del citomegalovirus humano o murino, la repetición terminal larga de varios retrovirus, tales como el virus de leucemia murino, o el virus del sarcoma de Rous y el VIH (véase, por ejemplo, *Enhancers and Eukaryotic Expression* (1983)).

Además de los ácidos nucleicos recombinantes descritos anteriormente, también se pueden usar en la invención ácidos nucleicos u oligonucleótidos sintéticos. Como punto general con respecto a los ácidos nucleicos usados en la invención, los expertos en la técnica reconocen que los ácidos nucleicos usados en la invención incluyen tanto moléculas de ADN como de ARN, así como análogos de los mismos sintéticos que no existen naturalmente y heteropolímeros, de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos de ambos. La composición particular de un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico dependerá del objetivo para el que se usará el material y del medio en el que se situará el material. Se han diseñado nucleótidos modificados o sintéticos, que no existen naturalmente, para obtener varios objetivos y para permanecer estables en varios medios, tales como aquellos en los que están presentes nucleasas, como es bien conocido en la técnica. Los nucleótidos modificados o sintéticos, que no existen naturalmente pueden diferir, en comparación con los ribo- o desoxirribonucleótidos que existen naturalmente, con respecto a las porciones de hidratos de carbono (azúcar), enlace de fosfato o base de los nucleótidos, o incluso pueden contener en algunos casos una base no nucleotídica (o no tener ninguna base), (véase, por ejemplo, Arnold *et al.*, publicación de patente PCT N° WO 89/02439). Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados o que no existen naturalmente de la invención pueden incluir ácidos nucleicos biotinilados, ácidos nucleicos O-metilados, ácidos nucleicos de esqueleto metilfosfonato, ácidos nucleicos de esqueleto fosforotioato o ácidos nucleicos de poliamida.

Los oligonucleótidos, tales como el ARN antisentido descrito a continuación, se sintetizan preferiblemente en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Biosystems u otro comercialmente disponible, según las especificaciones dadas por el fabricante. Los oligonucleótidos se pueden preparar usando cualquier método adecuado, tales como los métodos de fosfortriéster y fosfodiéster, o en sus modos de realización automatizados. En uno de dichos modos

de realización automatizados, se usan dietilfosforamiditas como material de partida y se pueden sintetizar como se describe en Beaucage *et al.* *Tetrahedron Letters* 22: 1859 (1981) y en la patente estadounidense N° 4.458.066.

C.- Ácido nucleico condensado

5

Se conocen moléculas policationicas pequeñas para condensar ácidos nucleicos mediante interacciones electroestáticas carga-carga (Plum *et al.*, *Biopolymers* 30: 631-643 (1990)). El pretratamiento de un ácido nucleico con poliaminas puede reducir por lo tanto el número de sitios de carga para formar complejos con liposomas catiónicos. Sin embargo, la condensación del ácido nucleico antes de la formación del complejo con el lípido produjo el resultado sorprendente de aumentar la durabilidad de los complejos de lípido:ácido nucleico, medida por la eficacia de la transfección. Los complejos de lípido:ácido nucleico formados con dicho pretratamiento fueron estables para una relación entre el lípido y el ADN menor, sin agregación. Los policationes orgánicos, tales como las poliaminas, moléculas con poliamonio y poliaminoácidos básicos, y sus derivados se usan para condensar el ácido nucleico antes de la formación del complejo lipídico. Un modo de realización preferido usa poliaminas, tales como la espermidina y la espermina, para condensar el ácido nucleico (véase, por ejemplo, el ejemplo 1).

D.- Polímero hidrofílico

Recientemente se ha establecido que la incorporación de PEG-PE en los liposomas produce una estabilización estérica que resulta en tiempos de circulación mayores en sangre (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1066: 29-36 (1991); Papahadjopoulos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11460-11464 (1991)). En la presente invención, la inserción de PEG-PE (por ejemplo, 1% del lípido total) en los complejos de lípido:ácido nucleico recientemente preparados evita que los complejos se agreguen durante el almacenamiento. Sin embargo, fue un descubrimiento sorprendente que la incorporación de PEG-PE no inhibió la actividad de transfección *in vivo* y también que la actividad de transfección *in vitro*, que fue inhibida, se volvió a recuperar mediante la incorporación de fragmento Fab' conjugado en el extremo del PEG-PE. La presencia de polímeros hidrofílicos en el complejo de lípido:ácido nucleico proporciona una durabilidad aumentada, medida por la eficacia de la transfección después del almacenamiento. Por lo tanto, es deseable añadir a los liposomas un polímero hidrofílico, tal como lípidos modificados con polietilenglicol (PEG) o gangliósido G_{M1}. También se pueden obtener derivados del PEG con otras moléculas anfipáticas, tales como ácidos grasos, esfingolípidos, glicolípidos y colesterol. La adición de dichos componentes evita la agregación del liposoma durante el acoplamiento del resto de direccionamiento al liposoma. Estos componentes también proporcionan un medio para aumentar el tiempo de residencia en la circulación de los complejos de lípido:ácido nucleico.

Se pueden usar varios métodos diferentes para la preparación de PEG para su incorporación en los liposomas. En un modo de realización preferido, el PEG se incorpora como un derivado de PEG con fosfatidiletanolamina (PEG-PE) o un derivado de polietilenglicol con diestearoil fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE). Los métodos para preparar PEG-PE son bien conocidos y típicamente implican la utilización de un metoxi PEG activado (con solo un extremo reactivo) y PE. Así, se puede hacer reaccionar el succinato PEG-succinimidilo en un disolvente orgánico básico (Klibanov *et al.*, *FEBS Lett.* 268: 235-237 (1990)). Un método particularmente preferido de preparación del PEG-PE se basa en la reacción del PEG con carbonildiimidazol seguido por adición de PE (véase Woodle *et al.*, *Proc. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 17: 77-78 (1990); Papahadjopoulos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11460-11464 (1991); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1066: 29-36 (1991); Woodle *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1105: 193-200 (1992); y Woodle *et al.*, *Period. Biol.* 93: 349-352 (1991)). De forma similar, en Blume *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1029: 91-97 (1990) y en la patente estadounidense N° 5.213.804 se describe un PEG activado con cloruro cianúrico en un disolvente orgánico básico. Un enfoque totalmente diferente se basa en el acoplamiento del PEG con liposomas preformados usando PEG activado con cloruro de tresilo que se añade entonces a los liposomas que contienen PE a pH elevado (Senior *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1062: 77-82 (1991)). Los derivados del PEG también están comercialmente disponibles. Así, por ejemplo el PEG-PE está disponible en Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama). Un experto en la técnica reconocerá que hay muchas otras uniones disponibles, por ejemplo detergentes, tales como tweens, unidos con PEG e inserción de derivados de lípidos con PEG en los complejos de lípido:ácido nucleico formados.

E.- Fragmento de anticuerpo Fab'

En un modo de realización preferido, los complejos de lípido:ácido nucleico están conjugados con el fragmento Fab' de un anticuerpo, que actúa como resto de direccionamiento que permite al complejo de lípido:ácido nucleico unirse específicamente a una célula diana que lleva la molécula diana (por ejemplo, un marcador característico) a la que se dirige el fragmento de anticuerpo Fab'. Los péptidos más pequeños de la región hipervariable o de otro péptido que interactúan con un ligando de superficie celular específico también pueden conjugarse con los complejos. En términos generales, el fragmento Fab' de un anticuerpo representa un monómero que comprende regiones variables y la región C_{H1} de un brazo del anticuerpo. Uno de dichos modos de realización preferidos se describe en el ejemplo 2.

Un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos esencialmente codificados por genes de la inmunoglobulina o fragmentos de genes de la inmunoglobulina. Los genes de la inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la gran cantidad de genes de región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o bien como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon que, a su vez, definen los tipos de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que la unidad estructural básica de la inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena variable ligera (V_L) y cadena variable pesada (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. En particular, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir el $F(ab)'_2$, un dímero del Fab' que es por sí mismo una cadena ligera unida a un V_H-C_{H1} mediante un enlace de disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región bisagra convirtiendo de esta forma el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed. Raven Press, N. Y. (1993) para más terminología sobre los fragmentos de anticuerpos). Aunque el fragmento Fab' se define en función de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse *de novo* bien químicamente o bien usando metodología de ADN recombinante.

Los fragmentos Fab' usados en la presente invención pueden derivarse de anticuerpos de origen animal (especialmente ratón o rata) o humano o pueden ser híbridos (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)) o humanizados (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986) y solicitud de patente británica publicada N° 8707252).

El fragmento Fab' se elige para que se una específicamente a una molécula o marcador característico de la superficie de las células a las que se desea que libere los contenidos del complejo de lípido catiónico:ácido nucleico. Una molécula es característica de una célula, tejido o estado fisiológico cuando dicha molécula se encuentra típicamente asociada con dicho tipo de célula o, alternativamente, con varias células que expresan todas ellas una condición fisiológica particular (por ejemplo, transformación). Un marcador característico específico se encuentra preferiblemente sobre las superficies de células de un tejido o tipo de célula particular, o en la superficie de tejidos o células que expresan una condición fisiológica particular y no en otros tejidos o tipos de células en el organismo. Un experto reconocerá, sin embargo, que a menudo no se requiere dicho nivel de especificidad del marcador. Por ejemplo, un marcador de superficie celular característico mostrará suficiente especificidad de tejido si solo los tejidos que no son diana no son accesibles al complejo de lípido:ácido nucleico. Alternativamente, se puede obtener una especificidad eficaz por sobreexpresión del marcador en el tejido diana en comparación con otros tejidos. Esto producirá una absorción preferencial en el tejido diana produciendo una especificidad de tejido eficaz. Así, por ejemplo, muchos cánceres se caracterizan por la sobreexpresión de marcadores de superficie celular, tales como receptor codificado por el proto-oncogén HER2 (*c-erbB-2*, *neu*) en el caso del cáncer de mama.

Un experto reconocerá que hay numerosos marcadores de superficie celular que proporcionan buenos marcadores característicos dependiendo del tejido particular que al que se desea dirigir. Estos marcadores de superficie celular incluyen, pero sin limitarse a ellos, hidratos de carbono, proteínas, glicoproteínas, complejos de MHC, interleucinas y proteínas receptoras, tales como las proteínas receptoras HER, CD4 y CD8 así como otras proteínas receptoras de factores de crecimiento y de hormonas.

Los receptores de factores de crecimiento son marcadores de superficie celular característicos particularmente preferidos. Los receptores de factores de crecimiento son receptores de superficie celular que se enlazan específicamente a factores de crecimiento y, de este modo, median una respuesta celular característica del factor de crecimiento particular. El término "factor de crecimiento", como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína o ligando polipeptídico que activa o estimula la división o la diferenciación celular o estimula una respuesta biológica, como la motilidad o la secreción de proteínas. Los factores de crecimiento son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento de transformación β (TGF- β) los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), la interleucina 2 (IL2), el factor de crecimiento de nervios (NGF), la interleucina 3 (IL3), la interleucina 4 (IL4), la interleucina 1 (IL1), la interleucina 6 (IL6), la interleucina 7 (IL7), el factor estimulante de colonias de granulocito/macrófago (GM-CSF), el factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocito (G-CSF), la eritropoietina, el receptor de interleucina 13 (IL13R) y similares. Un experto en la técnica reconoce que el término factor de crecimiento como se usa en la presente memoria incluye las citocinas y los factores estimulantes de colonias.

Los marcadores particularmente preferidos se encuentran en la familia HER de los receptores de factor de crecimiento. Más específicamente, el HER1, HER2, HER3 y HER4, siendo el HER2 el más preferido. Los receptores HER comprenden las proteínas tirosina cinasas que proporcionan por sí mismas dianas altamente específicas del anticuerpo. Así, en un modo de realización, la tirosina cinasa P185 del HER2 proporciona la diana más preferida para el fragmento Fab' de las utilizadas en los complejos de inmunolípido:ácido nucleico de la presente invención.

Se apreciará que el marcador característico no necesita ser un marcador que exista naturalmente sino que más bien puede ser introducido en la célula diana particular. Esto se puede realizar marcando directamente una célula o tejido con un marcador particular (por ejemplo, inyectando directamente el tejido diana particular con un marcador o, alternativamente, administrando al organismo completo un marcador que se incorpora selectivamente en el tejido diana). En un modo de realización, el marcador puede ser un producto génico que es codificado por un ácido nu-

cleico en un casete de expresión. El gen marcador puede estar bajo el control de un promotor que es activo solo en las células diana particulares. Así, la introducción de un vector que contiene el casete de expresión producirá la expresión del marcador solo en las células diana particulares. Un experto en la técnica reconocerá que hay numerosos enfoques que utilizan metodología de ADN recombinante para introducir marcadores característicos en las células diana.

En un modo de realización preferido, el resto de direccionamiento se unirá específicamente a productos o componentes de un receptor de factor de crecimiento, en particular productos del proto-oncogén HER2 (*c-erbB-2, neu*). Se prefiere particularmente que el resto de direccionamiento se una al receptor de factor de crecimiento codificado por la tirosina cinasa por el HER2, proteína p185^{HER2}, que generalmente está sobre-expresado en cánceres de mama (Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 (1987)). Otras dianas adecuadas para el resto de direccionamiento incluyen, pero sin estar limitadas a ellas, EGFR (HER1), HER3 y HER4, combinaciones de estos receptores, y otros marcadores asociados con cánceres. Otros anticuerpos de interés incluyen, pero sin limitarse a ellos, BR96 (Friedman *et al.*, *Cancer Res.* 53: 334-339 (1993)), e23 para el erB2 (Batra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5867-5871 (1992)), PR1 en el cáncer de próstata (Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 547-551 (1993)) y K1 en el cáncer de ovarios (Chang *et al.*, *J. Cancer* 50: 373-381 (1992)).

II.- Preparación de los liposomas

Hay varios métodos disponibles para preparar liposomas como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980); en las patentes estadounidenses N° 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787; en la publicación PCT N° WO 91/17424; en Szoka y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198 (1978); Damer y Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629-634 (1976); Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348-3352 (1979); Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 812: 55-65 (1985); Mayer *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 858: 161-168 (1986); Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 242-246 (1988); *Liposomes*, cap. 1 (Ostro ed., 1983); y Hope *et al.*, *Chem. Phys. Lip.* 40: 89 (1986). Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, sonicación, extrusión, alta presión/homogenización, microfluidización, diálisis detergente, fusión inducida con calcio de las vesículas de liposoma pequeñas y métodos de infusión de éter, todos ellos bien conocidos en la técnica. Un método produce vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un disolvente o sistema de disolvente orgánico adecuado y se secan a vacío o en un gas inerte para formar una película fina de lípido. Si se desea, la película se puede volver a disolver en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario, y luego se liofiliza para formar una mezcla de lípidos más homogénea que está en una forma pulverulenta más fácilmente hidratada. Esta película se recubre con una disolución acuosa tamponada y se permite que se hidrate, típicamente durante un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaño de las vesículas multilamelares resultantes se puede desplazar hacia tamaños menores hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizadores, tales como el desoxicolato.

En un modo de realización preferido se producen principalmente liposomas unilamelares por el método de evaporación en fase inversa de Szoka y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198 (1978).

Las vesículas unilamelares se preparan generalmente por sonicación o extrusión. La sonicación se realiza generalmente en un sonicador de tipo baño, tal como un sonda de ultrasonidos de Branson a una temperatura controlada determinada por el punto de fusión del lípido. La extrusión se puede realizar mediante extrusoras de biomembrana, tal como el Lípex Biomembrane Extruder. El tamaño de poro definido en los filtros de extrusión puede generar vesículas liposómicas unilamelares de tamaños específicos. Los liposomas también se pueden formar por extrusión a través de un filtro cerámico asimétrico, tal como Ceraflow Microfilter, disponible comercialmente en Norton Company, Worcester MA.

Después de la preparación de los liposomas, los liposomas a los que no se les ha dado un tamaño adecuado durante la formación se les puede dimensionar por extrusión para obtener un intervalo de tamaño deseado y estrechar relativamente la distribución de los tamaños de los liposomas. Un intervalo de tamaño de 0,2-0,4 micrones permite que las suspensiones de liposomas sean esterilizadas por filtración a través de un filtro convencional, típicamente un filtro de 0,22 micrones. El método de esterilización por filtro se puede realizar en base a una producción elevada si los liposomas han sido dimensionados hasta aproximadamente 0,2-0,4 micrones.

Existen diversas técnicas disponibles para el dimensionado de los liposomas hasta un tamaño determinado. Un método de dimensionado se describe en la patente estadounidense N° 4.529.561 ó 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas, bien en baño o bien mediante sonda, produce una reducción de tamaño progresiva hasta vesículas unilamelares pequeñas menores de aproximadamente 0,05 micrones de tamaño. La homogenización es otro método que se basa en distribuir la energía de los liposomas de fragmentos grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogenización típico, las vesículas multilamelares se hacen recircular a través de un homogenizador de emulsión habitual hasta que se observan los tamaños de liposoma deseados, típicamente entre 0,1 y 0,5 micrones. El tamaño de las vesículas liposómicas puede ser determinado por dispersión quasi-elástica de luz (QELS) como se describe en Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 10: 421-450 (1981). El diámetro medio de los liposomas se puede reducir por sonicación de los liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitentes pueden alternarse con evaluación por QELS para conducir una síntesis de liposomas eficaz.

ES 2 296 391 T3

La extrusión de los liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica también es un método eficaz para reducir los tamaños de los liposomas hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se obtiene la distribución de tamaño de liposoma deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de tamaño de poro sucesivamente menor para obtener una reducción gradual del tamaño del liposoma. Para su uso en la presente invención, se prefieren liposomas que tienen un tamaño de aproximadamente 0,05 micrones a aproximadamente 0,5 micrones. Más preferidos son los liposomas que tienen un tamaño de aproximadamente 0,05 micrones a aproximadamente 0,2 micrones.

10 III.- Formación de los complejos de lípido:ácido nucleico

Se ha descubierto que los complejos de lípido:ácido nucleico estabilizados (por ejemplo, los que tienen un ácido nucleico condensado y un polímero hidrofílico) tienden a no formar agregados visibles grandes y tienen una eficacia de transfección y durabilidad aumentadas. Las relaciones de ácido nucleico/liposoma para preparar los complejos de lípido:ácido nucleico que no forman agregados visibles grandes pueden ser determinadas por un experto. Típicamente, la relación se determina mezclando cantidades fijas de un ácido nucleico, por ejemplo un plásmido, con varias cantidades de liposomas (véase el ejemplo 1). En general, los complejos de lípido:ácido nucleico se forman pipeteando el ácido nucleico (por ejemplo un ADN plasmídico) en una suspensión de liposomas de igual volumen y mezclando rápidamente. De forma rutinaria, los liposomas que contienen 5-10 nmoles de un lípido, tales como DDAB o DO-PE (como se han descrito anteriormente), forman un complejo con 1 μ g de plásmido, sin formar agregados visibles grandes. La inspección de agregados visibles grandes se realiza típicamente sin la ayuda de un microscopio. La finalización de la valoración de las cantidades de lípido y ácido nucleico también se obtiene analizando la eficacia de la transfección aumentada, *bien in vitro* o bien *in vivo*, en comparación con un control no estabilizado (como se describe a continuación).

Para evitar que los complejos de lípido:ácido nucleico formen agregados grandes y pierdan actividad de transfección con el tiempo, se toman dos enfoques: (1) incorporar una pequeña cantidad de un polímero hidrofílico, tal como PEG-PE (aproximadamente en relación molar al 1%) en los complejos de lípido:ácido nucleico unos pocos minutos después de su preparación; y/o (2) condensar el ácido nucleico con un polication, tal como una poliamina (por ejemplo, aproximadamente 0,05 a 5,0 nmoles de espermidina por μ g de ADN) antes de mezclarlo con los liposomas. La cantidad óptima de poliaminas y polímero hidrofílico puede ser determinada por un experto valorando la poliamina o el polímero hidrofílico con el ácido nucleico, de forma que los complejos elaborados no formen agregados grandes, por ejemplo visibles. El tamaño de estos complejos de lípido:ácido nucleico puede ser estimado por dispersión dinámica de luz en el intervalo de 410 ± 150 nm. La finalización de la valoración también se obtiene analizando la eficacia de transfección aumentada, bien *in vitro* o bien *in vivo*, en comparación con un control no estabilizado (como se describe a continuación).

IV.- Transfección y terapia génica con los complejos de lípido:ácido nucleico

La presente descripción proporciona complejos de lípido:ácido nucleico que tienen una durabilidad aumentada, para la transfección de células de mamífero, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, y métodos de producción y transfección de dichos complejos. Esto se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que un complejo de lípido:ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que ha sido condensado por contacto con un polication orgánico presenta una durabilidad aumentada. Además, esto se basa en el descubrimiento inesperado de que un complejo de lípido:ácido nucleico que se mezcla con un polímero hidrofílico después de la formación del complejo de lípido:ácido nucleico, presenta una actividad de transfección alta y una durabilidad aumentada medidas por la actividad de transfección después del almacenamiento. Tales complejos de lípido:ácido nucleico que tienen durabilidad aumentada son útiles, por ejemplo para transfección de células *in vitro* y *ex vivo* y para la liberación de ácidos nucleicos en células para terapia génica de mamíferos *in vivo* y después de administración intravenosa.

El uso de complejos de lípido:ácido nucleico para liberar ácidos nucleicos en diferentes tipos de células de mamífero produce un método seguro de transferencia y una eficacia elevada de transferencia génica. La transfección de células *in vivo* con complejos de lípido:ácido nucleico es conocida por los expertos en la técnica y puede realizarse usando técnicas estándar, como se describe en el ejemplo 1 (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995)).

Cualquier ácido nucleico heterólogo que sea adecuado para la introducción en una célula huésped puede ser usado por los expertos en la técnica. Los genes útiles para la terapia génica pueden ser introducidos en mamíferos usando los métodos y vectores de esta invención. Los genes que codifican proteínas de la sangre, enzimas, hormonas, ribozimas, ARN antisentido, inhibidores víricos y proteínas del canal iónico, son ejemplos de ácidos nucleicos heterólogos útiles en terapia génica. Se puede usar un gen heterólogo funcional para reemplazar un gen mutado en un mamífero usando terapia génica. Por ejemplo, el gen que codifica la β -globina se puede usar para tratar la β -talasemia; y el gen que codifica el CFTR puede usarse para tratar la fibrosis quística. Los genes que codifican marcadores elegibles, tales como los que confieren resistencia a los antibióticos, se pueden usar para detectar y aislar células transfectadas con los complejos de lípido:ácido nucleico. Los genes indicadores, tales como los de la luciferasa, β -galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), hormona del crecimiento humana (hGH) y la proteína fluorescente verde (GFP) son ejemplos preferidos de genes que se pueden usar en análisis para determinar la eficacia de la transfección. La luciferasa se puede usar como gen indicador para determinar la eficacia de la transfección.

La eficacia de la transfección de un gen indicador se puede determinar con un análisis que sea apropiado para el gen indicador que se utilice. Dichos análisis son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el análisis del gen indicador HGH tiene base inmunológica y emplea kits de radioinmunoensayo disponibles comercialmente. Preferiblemente, el análisis de la luciferasa se usa para detectar la transfección y expresión del gen indicador de la luciferasa. Se prefiere el análisis de luciferasa porque es muy sensible y no usa radioactividad. Se puede usar un luminómetro para medir la actividad enzimática luciferasa, como se describe en el ejemplo 1.

La terapia génica proporciona métodos para combatir enfermedades infecciosas crónicas, tales como la infección por VIH, así como enfermedades no infecciosas, tales como cáncer y defectos de nacimiento (véase generalmente Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Yu *et al.*, *Gene Ther.* 1: 13-26 (1994)). La terapia génica se puede usar para transducir células bien con un procedimiento *ex vivo* o bien con uno *in vivo*. Los métodos *ex vivo* para la terapia génica implican transducir la célula fuera del mamífero con un complejo de lípido:ácido nucleico de esta invención e introducir la célula de vuelta en el organismo. Las células pueden ser células madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea u otras células que puedan ser transfectadas por los complejos de lípido:ácido nucleico.

En humanos, las células madre hematopoyéticas se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo sangre del cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica movilizada. La purificación de células CD34⁺ se puede realizar mediante procedimientos de afinidad de anticuerpos (véase Ho *et al.*, *Stem Cells* 12 (supl. 3): 100-105 (1995); véase también Bremmer, *J. Hematotherapy* 2: 7-17 (1993)). Las células también pueden ser aisladas de los pacientes y cultivadas. Alternativamente, las células usadas para procedimientos *ex vivo* pueden ser las almacenadas en un banco de células (por ejemplo, un banco de sangre). La ventaja de usar células madre es que pueden diferenciarse en otros tipos de células *in vitro* o pueden ser introducidas en un mamífero (tal como el dador de las células) en el que se implantarán en la médula ósea. Se conocen métodos *in vitro* para diferenciar células de médula ósea en tipos de células inmunes clínicamente importantes usando citocinas, tales como GM-CSF, IFN- γ y TNF-28 (véase, por ejemplo, Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702 (1992)).

La liberación de ácidos nucleicos también se puede obtener usando terapia génica *in vivo*. Los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención se pueden administrar directamente a un paciente, preferiblemente un humano. La administración *in vivo* y *ex vivo* es por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula o célula en contacto máximo con células de sangre o de tejido. Los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención se administran de cualquier forma adecuada, preferentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los métodos adecuados para administrar a un paciente dichas partículas no víricas en el contexto de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran usando administración en aerosol (por ejemplo, usando un nebulizador u otro dispositivo para la aplicación con aerosoles) y parenteralmente, es decir intra-arterial, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscularmente. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran mediante administración en aerosol o intravenosa o intraperitonealmente por inyección en bolo. Las formulaciones particulares que son adecuadas para este uso se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (17^a edición, 1985). Típicamente, las formulaciones comprenderán una disolución de los complejos de lípido:ácido nucleico en suspensión en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso.

V-. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos de lípido:ácido nucleico se preparan según las técnicas habituales y comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se empleará disolución salina normal como vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos aceptables incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, disolución isotónica (por ejemplo, dextrosa), disolución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, incluyendo glicoproteínas para una estabilidad mejorada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para sus uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con disolución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si es necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores de pH y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Adicionalmente, la suspensión del complejo de lípido:ácido nucleico puede incluir agentes protectores del lípido, que protegen a los lípidos frente a los radicales libres y los daños peroxidativos de los lípidos durante el almacenamiento. Son adecuados los agentes de extinción de radicales libres lipofílicos, tales como el alfatocofeol y quelantes específicos del hierro solubles en agua, tales como la ferrioxamina.

La concentración de los complejos de lípido:ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos que aproximadamente 0,05%, generalmente a o al menos aproximadamente 2-5%, hasta tanto como 10 a 30% en peso y se elegirá principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo de administración particular elegido. Por ejemplo, la concentración se puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen fallo cardíaco congestivo asociado con aterosclerosis o hipertensión grave. Alternativamente, los complejos de lípido:ácido nucleico compuestos por lípidos irritantes pueden diluirse hasta bajas concentraciones para disminuir la inflamación en lugar de administración. La cantidad de complejo de lípido:ácido nucleico administrada dependerá del Fab' particular usado,

el estado de enfermedad que está siendo tratado y el juicio del médico. Generalmente, la cantidad de complejos de lípido:ácido nucleico administrada será suficiente para liberar una dosis terapéuticamente eficaz del ácido nucleico. La cantidad de complejo de lípido:ácido nucleico necesaria para liberar una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un experto en la técnica. Las dosificaciones del complejo de lípido:ácido nucleico estarán generalmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg de ácido nucleico por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg de ácido nucleico/kg de peso corporal y lo más preferido entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 5,0 mg de ácido nucleico/kg de peso corporal. Para la administración a ratones, la dosis es típicamente de 50-100 μ g por 20 g de ratón.

10 VI.- *Análisis de la semivida en sangre*

Una ayuda para la localización del complejo de lípido:ácido nucleico en un tejido diana es una semivida del complejo de lípido:ácido nucleico aumentada en el flujo sanguíneo después de la administración. Una medida de la semivida del complejo de lípido:ácido nucleico en la corriente sanguínea es la relación sangre/RES determinada a un tiempo elegido después de la administración del complejo. Típicamente, se inyectan en el organismo de ensayo complejos de lípido:ácido nucleico que contienen un marcador (por ejemplo, un marcador fluorescente, reactivo de alta densidad electrónica o marcador radiactivo) bien interno en el complejo o bien enlazado al lípido que comprende el complejo. Un periodo de tiempo fijo después se sacrifica el organismo y la cantidad de marcador detectada en la sangre (por ejemplo, midiendo la luminiscencia o por recuento de centelleo) se compara con la localizada en tejidos particulares (por ejemplo, hígado o bazo).

El tiempo de retención de los complejos de lípido:ácido nucleico en la sangre también se puede determinar simplemente tomando muestras de sangre en intervalos fijos después de la administración de los complejos de lípido:ácido nucleico que contienen el marcador y determinando la cantidad de marcador que permanece en la circulación. El resultado puede expresarse como fracción de la dosis original.

VII.- *Análisis de la transfección de tejido por los complejos de lípido:ácido nucleico*

La transfección de las células diana por los complejos de lípido:ácido nucleico de esta invención pueden determinarse de forma similar administrando los complejos de lípido:ácido nucleico que contienen un ácido nucleico que puede ser detectado por sí mismo o que codifica un producto detectable. Las muestras biológicas (por ejemplo, biopsias de tejido o muestras de fluido) se recogen entonces y se analiza la transfección detectando la presencia del ácido nucleico transfectado por sí mismo o detectando la presencia del producto expresado del ácido nucleico.

El ácido nucleico por sí mismo se puede elegir por tener una secuencia que sea fácilmente detectable, por ejemplo por amplificación del ácido nucleico. En este caso, se podría elegir un ácido nucleico que tenga sitios de inicio elegidos de forma que permitan una amplificación única del ácido nucleico de interés y no de otro en la muestra de tejido biológico en el que está siendo analizada la transfección.

Los medios para detectar secuencias de ADN específicas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar sondas de oligonucleótidos elegidos por ser complementarios con una subsecuencia elegida con la región. Alternativamente, las secuencias o subsecuencias pueden ser amplificadas por varias técnicas de amplificación del ADN incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis *et al.*, *PCR Protocols: A guide to Methods and Application* (1990)), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace, *Genomics* 4: 560 (1989); Landegren *et al.*, *Science* 241: 1077 (1988); Barringer *et al.*, *Gene* 89: 117 (1990)), amplificación de la transcripción (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173 (1989)) y replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874 (1990)).

En un modo de realización particularmente preferido, la transfección se evalúa detectando la presencia o ausencia o cuantificando un producto génico en uno o más tejidos. Cualquier gen que exprese un producto que se pueda analizar fácilmente proporcionará un indicador adecuado para el presente análisis. Los genes indicadores adecuados son bien conocidos por los expertos. Incluyen, pero sin limitarse a ellos, los de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) de bacterias, la beta-galactosidasa o la luciferasa (véase, por ejemplo, Alam *et al.*, *Analytical Biochemistry* 188: 245-254 (1990)). Un gen indicador particularmente preferido es el gen Fflux como se muestra en los ejemplos.

VIII.- *Análisis de la durabilidad*

Como se ha indicado anteriormente, el término "durabilidad" se usa en la presente memoria para referirse al periodo de tiempo en el que un complejo de lípido:ácido nucleico puede ser almacenado (en condiciones definidas, por ejemplo en una disolución tampón a 4°C) antes de perder su actividad biológica. La actividad biológica analizada para la determinación de la durabilidad en la presente invención es la capacidad del complejo de lípido:ácido nucleico para transfectar células de mamíferos *in vivo* después de la administración intravenosa.

En un modo de realización preferido, la durabilidad se determina almacenando el complejo de lípido:ácido nucleico durante periodos de tiempo diferentes, inyectando uno o más animales de ensayo con el complejo y analizando la transfección (por ejemplo, la expresión de un gen indicador) en los tejidos elegidos del animal como se ha descrito anteriormente y se muestra en los ejemplos.

ES 2 296 391 T3

Se apreciará que la durabilidad se puede expresar en términos absolutos, es decir la duración de tiempo en que la composición se puede almacenar sin perder actividad. Alternativamente, la durabilidad se puede expresar en términos relativos con respecto a diferentes composiciones. Así, por ejemplo, cuando el complejo de interés muestra una actividad de transfección después de un periodo de almacenamiento fijo y esta actividad es mayor que la actividad de un complejo diferente almacenado de forma similar durante la misma cantidad de tiempo, se dice que el complejo de interés tiene una durabilidad aumentada en comparación con el complejo diferente.

IX.- *Direccionamiento de los complejos de lípido:ácido nucleico a tejidos específicos*

Se pueden usar restos de direccionamiento específicos con los complejos de lípido:ácido nucleico de la invención para dirigirlos a células o tejidos específicos. Así, el uso de un resto de direccionamiento en combinación con un complejo de lípido:ácido nucleico efector genérico proporciona la capacidad para elaborar convenientemente según las necesidades el complejo para su liberación en células y tejidos específicos.

Ejemplos de efectores en los complejos de lípido:ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que codifican citotoxinas (por ejemplo, toxina de la difteria (DT), exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), toxina de la tos ferina (PT) y la tos ferina adenilato ciclasa (CYA)), ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ácidos nucleicos marcados y ácidos nucleicos que codifican genes supresores de tumores, tales como p53, p110Rb y p72. Estos efectores pueden ser dirigidos específicamente a células, tales como células cancerosas, células inmunes (por ejemplo células B y T) y otras dianas celulares deseadas, con un resto de direccionamiento. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, muchos cánceres se caracterizan por la sobre-expresión de marcadores de superficie celular, tales como HER2 que se expresa en células de cáncer de mama o IL17R que se expresa en gliomas. Los restos de direccionamiento, tales como los anticuerpos anti-HER2 y anti-IL17R, o fragmentos de anticuerpos, se usan para liberar el complejo de lípido:ácido nucleico en la célula de elección. La molécula efectora se libera por lo tanto en un tipo de célula específico, proporcionando un tratamiento terapéutico útil y específico.

X.- *Kits de complejo de lípido:ácido nucleico*

La presente descripción proporciona kits para preparar los complejos de lípido:ácido nucleico descritos anteriormente. Dichos kits se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: liposomas, ácidos nucleicos (condensados o no condensados), polímeros hidrofílicos, derivados de polímeros hidrofílicos con restos de direccionamiento, tales como fragmentos Fab', e instrucciones. Según la presente invención se pueden preparar una gran variedad de kits y componentes, dependiendo del uso previsto del kit y las necesidades particulares del usuario. Por ejemplo, el kit puede contener uno cualquiera entre varios restos de direccionamiento para dirigir el complejo a un tipo específico de célula, como se ha descrito anteriormente.

El kit puede incluir opcionalmente materiales para instrucciones que contienen indicaciones (es decir, protocolos) para el uso de los complejos de lípido:ácido nucleico para transfectar células *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Típicamente, los materiales para instrucciones describen el procedimiento para preparar el complejo de lípido:ácido nucleico a partir de liposomas y ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. Los materiales para instrucciones también describen como mezclar el polímero hidrofílico con el complejo de lípido:ácido nucleico. Adicionalmente, los materiales para instrucciones pueden describir procedimientos para transfectar células con el complejo de lípido:ácido nucleico.

Aunque los materiales para instrucciones comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. En esta invención se contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero sin limitarse a ellos, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan dichos materiales para instrucciones.

XI.- *Preparación de micropartículas lipídicas con proteínas unidas a su superficie*

A.- *General*

La presente invención proporciona la preparación de micropartículas lipídicas con proteínas unidas a su superficie. Como se indica en la sección de Antecedentes, anteriormente, la técnica muestra que las proteínas solubles, tales como los anticuerpos, son tan grandes que su tendencia a disolverse supera la tendencia de un dominio hidrofóbico de una molécula de enlace unida a la proteína para asociarse de forma estable con una micropartícula lipídica.

Por lo tanto, la enseñanza ha sido que mientras que pequeños péptidos conjugados con una molécula de enlace de aproximadamente el mismo tamaño o mayor pudiera permitir que el dominio hidrofóbico de la molécula de enlace se asocie de forma estable con la micropartícula lipídica, las proteínas conjugadas con una molécula de enlace, que es mucho más pequeña que la proteína, no serían capaces de hacer lo mismo.

Ahora se ha encontrado que, contrariamente a las enseñanzas de la técnica, proteínas muchas veces mayores que una molécula de enlace pueden conjugarse con una molécula de enlace y además estar de forma estable y satisfactoria unidas a las micropartículas lipídicas. Los ejemplos siguientes demuestran que proteínas muchas veces mayores que las moléculas de enlace a la que están conjugadas pueden estar unidas satisfactoriamente a una micropartícula lipídica.

Este descubrimiento extiende los tipos de agentes con los que se pueden cargar dichas micropartículas. Además, extiende la variedad de métodos por los que se pueden elaborar dichas micropartículas y que además permanezcan unidas a las proteínas, ya que la unión puede tener lugar ahora en condiciones en las que la estabilidad de la micropartícula, tal como un liposoma, no se pondrá en peligro.

5

Preferiblemente, las proteínas usadas en este método tienen un peso molecular entre aproximadamente 6.000 y aproximadamente 1.000.000 Dalton. Más preferiblemente, las proteínas tienen un peso molecular entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 600.000 Dalton. Incluso más preferiblemente, las proteínas tienen un peso molecular entre aproximadamente 15.000 y aproximadamente 250.000 Dalton. Lo más preferible, las proteínas tienen un peso molecular entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 75.000 Dalton.

10

B.- Unión de proteínas por incubación de las micropartículas lipídicas con proteínas conjugadas con moléculas de enlace

15

Para su uso en esta invención, una proteína puede ser conjugada en primer lugar con una molécula de enlace que comprende (a) un dominio hidrofóbico, (b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y (c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en dicha molécula de proteína y unido a la cadena polimérica hidrofílica en, o cerca de, un extremo contralateral con el dominio hidrofóbico. Dichas moléculas de enlace son conocidas en la técnica (Allen y Martin, US 5.527.528; Shahinian y Sylvius, *Biochim. Biophys. Acta* 1239: 157-167 (1995); Zalipsky *et al.*, *J. Controlled Release* 39: 153-161, 1996; Kirpotin *et al.*, *Biochemistry* 36: 66-75 (1997)).

20

El dominio hidrofóbico de la molécula de enlace puede ser, por ejemplo, un diacilglicerol, un fosfolípido, un esteroide, tal como colesterol, o un derivado de la diacilamida, tal como la N,N-diestearoil-glicinamida. La cadena polimérica hidrofílica puede ser, por ejemplo, poli(etilenglicol), poliglicidol, poli(vinil alcohol), poli(vinil pirrolidona), polioxazolidinona, un polisacárido o un copolímero que incluya bloques de los polímeros anteriores. El grupo químico reactivo puede ser, por ejemplo, un grupo amino, grupo carboxi, grupo tiol, grupo maleimido, grupo yodoacetamido, grupo vinilsulfona, grupo aldehído, grupo hidrazina, grupo cetona, grupo cianuro cloruro vinilsulfona, o cualquier otro grupo funcional conocido en la técnica por formar enlaces con proteínas. Una proteína puede ser un anticuerpo, una enzima, un factor de crecimiento, una hormona, una proteína de enlace a un ácido nucleico o cualquier otra proteína de utilidad para una aplicación particular prevista.

30

En un modo de realización preferido de la invención, la proteína es un fragmento Fab' de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla. En un modo de realización adicional preferido, el anticuerpo de cadena sencilla es un anticuerpo Fv producido por selección a partir de una biblioteca de fagos. Los grupos maleimido, que reaccionan con los restos cisteína en la proteína, se prefieren como grupo reactivo para su uso con un fragmento de anticuerpo Fab' o con un anticuerpo de cadena sencilla.

35

La conjugación de la proteína con la molécula de enlace se puede realizar por cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica para la conjugación de proteínas. En un método preferido, la molécula de enlace puede disolverse sencillamente en una disolución tampón acuosa (lo cual es posible debido a la presencia del dominio polimérico hidrofílico) e incubada con la proteína de elección para permitir la formación de un enlace estable entre el grupo químico reactivo de la molécula de enlace y el grupo funcional apropiado de la proteína. El conjugado se puede purificar además del exceso de molécula de enlace y cualquier proteína sin conjugar mediante precipitación con sales, diálisis, cromatografía y otros métodos conocidos en la técnica de la purificación de proteínas. Alternativamente, el conjugado se puede usar sin purificación adicional.

45

Luego se incuba la proteína conjugada con las micropartículas lipídicas en un medio acuoso durante un tiempo suficiente para que el dominio hidrofóbico del conjugado se fusione en la capa lipídica superficial de la partícula. El tiempo necesario dependerá de la composición lipídica de la micropartícula, de la naturaleza del dominio hidrofóbico y de la temperatura de incubación. Típicamente, el tiempo de incubación estará en el intervalo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 50 horas. El tiempo necesario para la incubación disminuirá a medida que la temperatura a la que se realiza la incubación aumenta. Así, a 37°C la incubación generalmente se prolongará durante la noche, mientras que a 55-60°C la incubación tomará generalmente 5-60 minutos, prefiriéndose de 15-30 minutos. Los tiempos de incubación apropiados para cualquier combinación de micropartícula, dominio hidrofóbico y temperatura se pueden determinar usando los ensayos mostrados en los ejemplos siguientes.

55

C.- Preparación de proteínas que contienen dominios hidrofóbicos que se autoinsertarán en una micropartícula lipídica

60

En un modo de realización alternativo, se introducen un anclaje hidrofóbico y una cadena polimérica hidrofílica en una molécula de proteína por ADN recombinante y métodos de ingeniería de proteínas. En este caso, se introduce un dominio polimérico hidrofílico, como se ha descrito anteriormente, en la proteína de interés mediante una secuencia de poliaminoácidos agregada terminalmente que contiene principalmente aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas. Un anclaje hidrofóbico se introduce en el constructo durante su biosíntesis mediante un sitio de modificación lipídica situado en el extremo distal de la secuencia de poliaminoácidos agregada terminalmente.

65

Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de complejos estables de lípido:ADN plasmídico para liberación génica in vivo

A.- Materiales y métodos

1.- Lípidos y otros reactivos

Se obtuvo DOPE de Avanti (Alabaster, AL). Se obtuvo colesterol altamente purificado de Calbiochem (San Diego, CA). Se obtuvieron DDAB y dextrano (P. M. 40.000) de Sigma (St. Louis, MO). Se recristalizó el DDAB una vez en una disolución de acetona-metanol. Se obtuvo D-luciferina de Boehringer Mannheim. El PEG-PE fue un obsequio de Sequus Pharmaceuticals (Menlo Park, CA). El DC-Col, MMCE y DOGS se obtuvieron del UCSF Gene Transfer Vehicle Core de Gene Therapy Center. El ESPM, DOTAP, POEPC, DOEPC, DMEPC y DODAP fueron obsequios de Avanti (Alabaster, AL). Se almacenó una disolución en cloroformo de cada lípido en ampollas selladas en atmósfera de argón a -40°C . Los otros reactivos se obtuvieron con el mayor grado posible y se usaron sin purificación adicional.

2.- Preparación de los liposomas

Los liposomas catiónicos pequeños se prepararon en una disolución de dextrosa al 5% (p/v) de la manera siguiente. El DDAB o los otros lípidos catiónicos en cloroformo se mezclaron con DOPE y/o colesterol en la relación molar deseada y se eliminó el disolvente lentamente a presión reducida a 50°C en un evaporador rotatorio. La película de lípido seco se hidrató con una disolución de dextrosa al 5% precalentada a 50°C y el recipiente se selló en atmósfera de argón. La suspensión del lípido hidratado se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos (Lab Supplies, Hicksville, N. Y.) durante 5-10 minutos a 50°C . La concentración final de los liposomas fue de 5 mM de lípido catiónico y el tamaño de los liposomas se midió por dispersión dinámica de luz a 195 ± 65 nm. Los liposomas sometidos a ultrasonidos se almacenaron en atmósfera de argón a 4°C hasta su uso.

3.- Sistema indicador de luciferasa

El plásmido pCMV/IVS-luc⁺ se preparó como sigue. Se extirpó a partir de pBGt2.CAT un fragmento que contenía el promotor CMV y el intrón IgE sintético, usando Spe I y Hind III, y se clonó en pBSIIKS⁺. El ADNc que codifica la luciferasa de luciérnaga modificada (luc⁺) incluyendo la señal de poli-A tardía del SV40 se cortó del vector básico pGL-3 (Promega) con Hind III y Sal I y se puso en el clon pBS-CMV-IVS en dirección 3' de la unión. Los plásmidos se purificaron usando procedimientos de lisis alcalina adoptados y diseñados por Qiagen Corp. (Chatsworth, CA). La pureza del plásmido se midió por la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, y se almacenó en una disolución tampón que contenía Tris-Cl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0 a concentraciones de 1-2 mg/ml.

4.- Preparación de los complejos de transfección

Antes de los experimentos de transfección, la relación óptima de ADN/liposoma para formar complejos que no fueran grandes agregados, se determinó mezclando cantidades fijas de plásmido con varias cantidades de liposomas. En general, los complejos de transfección se formaron pipeteando el plásmido en una suspensión de liposoma de igual volumen y mezclando rápidamente. De forma rutinaria, liposomas que contenían 8-12 nmoles de DDAB pueden formar complejos con 1 μg de plásmido sin formar agregados grandes visibles. Dichos complejos tienen un exceso de carga positiva pero aún tienden a agregarse con el tiempo durante el almacenamiento a 4°C y pierden actividad de transfección en 4 días. Para experimentos *in vitro*, que precisan complejos mucho más diluidos, se usaron complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico ("CLDC") de 5 nmoles de DDAB por μg de ADN. Para evitar que los complejos de lípido:ADN plasmídico formen agregados grandes y pierdan actividad de transfección con el tiempo, se usaron dos enfoques: (1) incorporar una cantidad pequeña de PEG-PE (aproximadamente en una relación molar del 1%) en los complejos de lípido:ADN plasmídico unos pocos minutos después de su preparación; y/o (2) condensar el plásmido con poliaminas (por ejemplo, 0,05 a 5,0 nmoles de espermidina por μg de ADN) antes de mezclarlo con los liposomas. La cantidad óptima de poliaminas se determinó valorando las poliaminas con ADN antes de que formen agregados grandes. El tamaño de estos complejos se estimó por dispersión dinámica de luz en el intervalo de 410 ± 150 nm.

5.- Análisis de la expresión del gen indicador

La luciferasa purificada se obtuvo de Boehringer Mannheim como un patrón para calibrar el luminómetro y elaborar un patrón de control para la actividad específica relativa de la luciferasa. La expresión del gen indicador en un extracto de tejido se presentó en cantidades de nanogramo convirtiendo la unidad luminosa relativa medida en un luminómetro en unidades de peso según una curva de calibración. La luciferasa expresada en células o tejidos se extrajo con lisis celular química. El tampón de lisis eficaz consistió en tampón de fosfato de potasio 0,1M a pH 7,8, 1% de Tritón X-100, DTT 1 mM y EDTA 2 mM.

Los ratones hembras CD1 (4-6 semanas de edad, peso aproximado de 25 g) se obtuvieron de Charles River Laboratory. Los ratones recibieron complejos de lípido:ADN plasmídico mediante una inyección en la vena de la cola y se sacrificaron 24 horas después. Los animales anestesiados se perfundieron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) fría mediante punción en el corazón. Cada tejido se diseccionó y se lavó con PBS y luego se homogeneizó en un tubo de cultivo de fondo redondo de 6 ml que contenía 500 μ l de disolución tampón de lisis. Las muestras se guardaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con mezcla ocasional. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm en una centrifugadora Eppendorf. La actividad luciferasa en cada tejido se midió mezclando 100 μ l del sustrato de luciferasa reconstituido (Promega, Madison, WI) con 20 μ l del sobrenadante de homogenado de tejido en el sistema de inyección del luminómetro. La emisión de luz máxima se midió durante 10 segundos a 20°C. Las unidades relativas de luz de cada muestra se convirtieron en cantidad de luciferasa en el extracto de tejido por comparación con una curva de calibrado que fue establecida para cada serie de experimentos. El contenido de proteína en el extracto se determinó usando kits de análisis de proteína (BioRad, Richmond, CA). El ruido de fondo fue el recuento de la disolución tampón de lisis sola.

Se cultivaron células SK-BR-3 (Park *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1327-1331 (1995)) en medio de McCoy 5A suplementado con 10% de suero bovino de ternera inactivado por calor y CO₂ al 5%. Las células SK-BR-3 en cultivo en monocapa se pusieron en placas a razón de 50.000 células por pozo en placas de 12 pozos y se incubaron durante la noche. Cada pozo recibió 0,5-1 μ g de pCMV/IVS-luc⁺ durante los 20 minutos de formación del complejo. Las células se recogieron después de 24 horas de incubación con los complejos a 37°C. La actividad luciferasa en las células se determinó como se ha descrito anteriormente.

B.- Resultados

1.- Optimización del lípido “auxiliar”

El uso de liposomas catiónicos para la transferencia génica *in vitro* se ha generalizado desde que Felgner *et al.* publicaron su estudio (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-17 (1987)). Más tarde se estableció (Felgner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 2550-2561 (1994)) que la DOPE es con mucho el lípido “auxiliar” más eficaz para la transfección génica *in vitro* y este resultado ha sido confirmado por varios laboratorios (Fardo *et al.*, en *Gene Therapy for Neoplastic Diseases*, págs. 23-55 (Huber y Lazo eds., 1994); Zhou *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1189: 195-203 (1994)). Se ha sugerido, basándose en estudios *in vitro*, que la DOPE puede facilitar la liberación citoplasmática mediante fusión de la membrana una vez que los complejos de lípido cargado positivamente:ADN plasmídico se han enlazado a la membrana celular (Zhou *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1189: 195-203 (1994)). Incluso aunque Friend *et al.* no obtuvieron ninguna evidencia morfológica de que los complejos de lípido DOTMA/DOPE:ADN plasmídico se fusionen directamente con la membrana plasmática, no excluyeron la posibilidad de sucesos de fusión (Friend *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1278: 41-50 (1996)). Estos autores sugirieron que los complejos se introducen en la célula por endocitosis y los lípidos catiónicos rompen las membranas endosómica/lisosómica y luego facilitan un escape para los complejos de ADN en el citoplasma y eventualmente en el núcleo.

Contrariamente a la mayoría de las expectativas, el papel “auxiliar” de la DOPE establecido en estudios *in vitro* no es evidente para la liberación génica *in vivo* después de una inyección i.v. de los complejos. Cuando se incluyó DOPE en los liposomas catiónicos de DDAB, se inhibió la transfección génica *in vivo*. Esta inhibición dependiente de la DOPE se muestra en la figura 1. Se encontró que el colesterol, en lugar de la DOPE, es eficaz como lípido “auxiliar” para la liberación génica *in vivo*. Se produjo una reducción de 10 veces en la expresión de la luciferasa en pulmones de ratón cuando la mitad del colesterol fue reemplazado con DOPE. Los resultados *in vivo* del DDAB y otros liposomas catiónicos no son consistentes con la suposición general de que la DOPE es un lípido “auxiliar” adecuado. Por el contrario, la DOPE en complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico atenúa la transfección *in vivo* hasta un grado tan grande que la DOPE se considera un agente inhibidor en formulaciones para la liberación génica *in vivo*. El colesterol se ha elegido para estudios *in vivo* en estudios publicados recientemente (Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 24864-70 (1995); Solodin *et al.*, *Biochemistry* 34: 13537-44 (1995)) en los que los autores no indican cómo y por qué eligieron diferentes lípidos “auxiliares” para sus diseños experimentales, es decir DOPE para estudios *in vitro* y colesterol para estudios *in vivo*. La estabilización de los liposomas aniónicos y neutros en la sangre por el colesterol es conocida desde hace mucho tiempo (Mayhew *et al.*, *Cancer Treat. Rep.* 63: 1923-1928 (1979)). Por lo tanto, es evidente que para la liberación génica sistémica se debe considerar la estabilidad de los complejos de lípido: ADN plasmídico en la sangre, varios de cuyos componentes se sabe que reaccionan con los complejos macromoleculares. De hecho, el estudio preliminar de varias formulaciones de complejos de lípido:ADN plasmídico usando microscopía electrónica de criofractura ha mostrado que los complejos que contenían colesterol eran estructuralmente más estables que los complejos que contenían DOPE en presencia de suero.

Usando complejos de lípido DDAB/Col:ADN plasmídico (8 nmoles de DDAB/ μ g de ADN) para experimentos de transfección *in vitro*, la expresión de la luciferasa detectable en el pulmón de ratones de 25 g requirió dosis de ADN que variaban de 30 μ g a 60 μ g. De forma rutinaria 40 a 60 μ g de ADN plasmídico por ratón permitieron obtener una expresión génica consistente. Se encontró que la cantidad de DDAB generalmente asociada con 80 μ g de ADN (o más) por ratón era demasiado tóxica para el animal. La expresión de la luciferasa en varios tejidos se muestra en la figura 2. Como se observó previamente (Zhu *et al.*, *Science* 261: 209-211 (1993); Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 24864-70 (1995); Solodin *et al.*, *Biochemistry* 34: 13537-44 (1995)), la máxima expresión se encontró en el tejido pulmonar. Para 60 mg de plásmido inyectados se obtuvieron de forma rutinaria 1-2 ng de luciferasa por mg de proteína de tejido. La figura 3 muestra la duración de la expresión del gen indicador en tejido pulmonar. La expresión de la luciferasa

disminuyó rápidamente y alcanzó niveles no detectables en 2 semanas. Zhu *et al.* informaron que después de una inyección i.v. de complejos de DOTMA/DOPE (1:1)-plásmido en ratones adultos, la expresión del gen indicador (CAT) se extiende a varios tejidos y la expresión máxima es para complejos con una relación de 1 μ g de plásmido por 8 nmoles de lípidos totales (Zhu *et al.*, *Science* 261: 209-211 (1993)). Sin embargo, para esta relación (correspondiente a 1 μ g de plásmido por 4 nmoles de lípido catiónico), los complejos de lípido DDAB/Col:ADN plasmídico presentaron tendencia a agregarse y no produjeron expresión génica medible en esta investigación.

Como se han usado genes indicadores diferentes en diferentes laboratorios, ha sido difícil atribuir las variaciones en la eficacia de la liberación génica *in vivo* a los cambios en la formulación de los liposomas. Para una comparación directa de los resultados de la bibliografía, las unidades luminosas relativas de la actividad luciferasa medidas en un luminómetro se convirtieron en un patrón de luciferasa purificada. Haciendo esto, la actividad de transfección máxima de las formulaciones de DDAB/Col fue 3 órdenes de magnitud mayor que los valores presentados recientemente en experimentos comparables (Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9742-9746 (1995)). Dado un mismo gen indicador junto con el mismo promotor en el diseño experimental, la diferencia en la expresión puede reflejar la elección de la formulación del liposoma. De hecho, el DDAB/Col fue uno de los vehículos de liberación génica más eficaces entre muchas formulaciones de 18 lípidos catiónicos diferentes que se seleccionaron recientemente. Los resultados preliminares de la expresión en pulmones de ratón después de una inyección i.v. indicaron que DOTMA/Col, DOTAP/Col, MMCE/Col y ESPM/Col dieron un 10-100% de la actividad de transfección del DDAB/Col y DOGS/Col, POEPC/Col, LYSPE/DOPE y DC-Col/DOPE dieron 1-10% de la actividad del DDAB/Col. DOEPC/Col, DMPE/Col, DODAP/Col y DDAB/DOPE no dieron ninguna actividad medible.

En paralelo con los estudios de transfección, la morfología de estos complejos en suero y en medio celular se examinó por microscopía electrónica de criofractura. Cuando se examinaron en 50% de suero de ratón (10 minutos de tiempo de incubación), los CLDC no estabilizados preparados un día antes eran tan pequeños como lo son en una disolución tampón con fuerza iónica baja (100-250 nm) pero mostraron muy pocas protusiones. Los CLDC no estabilizados preparados seis días antes, incubados en 50% de suero de ratón, aparecieron como agregados de partículas esféricas empaquetadas densamente, con un número elevado de partículas unidas. Dichas formulaciones habían perdido toda su actividad de transfección *in vivo* en 4 días. No se observan protusiones fibrilares residuales.

Los CLDC estabilizados con PEG-PE incubados en 50% de suero de ratón eran pequeños (100-200 nm) incluso seis días después. De forma similar, los CLDC preparados con ADN condensado también fueron bastante pequeños incluso después de seis días de almacenamiento. Específicamente, los CLDC fueron conformados como "chinchetas" que fueron estructuralmente estables en presencia de suero.

Después de incubación en medio celular (RPMI-1640 con 10% de FCS), los CLDC no estabilizados preparados seis días antes fueron morfológicamente similares a los incubados en suero de ratón, como se ha descrito anteriormente. Estos complejos, sin embargo, estaban empaquetados de forma menos compacta y no presentaban protusiones fibrilares. Una morfología similar se observó con los CLDC estabilizados con PEG-PE y con los CLDC con ADN condensado incubados en medio celular.

2.- Aumento de la durabilidad de la actividad de transfección

La relación entre la estabilidad estructural y la actividad de transfección de los complejos de lípido:ADN plasmídico no ha sido detallada en los informes publicados hasta ahora. Se han establecido procedimientos de selección para evitar agregados grandes de los complejos de lípido:ADN plasmídico cambiando la relación entre el ADN y el lípido desde una carga neta negativa a una carga positiva. Se prepararon complejos de lípido:ADN plasmídico de cada lípido catiónico particular con varias relaciones de ADN/lípido y las formulaciones estables y metaestables resultantes se usaron para la transfección *in vivo*. Se encontró que los complejos que contenían 8 a 12 nmoles de lípido catiónico por μ g de ADN tenían la actividad de transfección *in vivo* más alta. Sin embargo, la actividad de transfección de estos complejos disminuyó a lo largo del tiempo. Sin modificar los procedimientos de formación de los complejos de lípido:ADN plasmídico, se produjo una agregación visible en pocos días y la actividad de transfección disminuyó en más de mil veces hasta niveles cercanos al ruido de fondo después de un mes de almacenamiento a 4°C (figura 4). Por lo tanto, se acometió la formulación de complejos de lípido:ADN plasmídico estabilizados, lo que permitió mantener una actividad de transfección *in vivo* elevada durante el almacenamiento.

i.- Aumento de la estabilidad de la transfección: PEG-PE

La inserción de PEG-PE (1% del lípido total) en los complejos de lípido:ADN plasmídico recién formados no solo permitió evitar que los complejos se agreguen durante el almacenamiento, sino que los complejos que contenían PEG-PE también presentaron una actividad de transfección *in vivo* razonablemente alta, solo una actividad ligeramente inferior en comparación con los complejos sin PEG-PE (figura 4). La incorporación de PEG-PE en los complejos es evidente en vista de la inhibición relacionada con la dosis de la actividad de transfección al aumentar el porcentaje de PEG-PE (resultados no mostrados). De forma inesperada, el almacenamiento de los complejos que contienen PEG-PE a 4°C restauró lentamente la actividad original, como se muestra en la figura 4. Los aspectos mecanísticos del efecto de inhibición sobre la transfección por PEG-PE, así como la recuperación de la actividad después del almacenamiento a baja temperatura, no se conocen por el momento.

ii.- Aumento de la estabilidad de la transfección: poliaminas

Además del papel del PEG-PE para aumentar la durabilidad de los complejos de lípido:ácido nucleico, la condensación del ácido nucleico con poliaminas también produjo un aumento similar inesperado en la durabilidad de los complejos. Los complejos de lípido:ADN plasmídico elaborados con ADN condensado fueron estables a una relación menor entre lípido y ADN sin agregación. La figura 4 muestra el nivel de actividad de transfección *in vivo* de dicha preparación y su evolución durante el almacenamiento. De nuevo, se encontró un aumento inesperado en la actividad de transfección en complejos de lípido:ADN plasmídico tratados con poliamina y envejecidos, en comparación con la de las muestras que no se trataron previamente con poliaminas y usadas inmediatamente después de la formación de los complejos. Recientemente se ha publicado un enfoque diferente para obtener complejos de lípido catiónico/ADN estables por formación del complejo del plásmido con un lípido en micelas de lípido-detergente (Hofland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7305-7309 (1996)). Sin embargo, en dichos compuestos solo se mantuvo el 30% de la eficacia de la transfección *in vitro* en suero al 15% y no se informó de resultados *in vivo*.

iii.- Aumento de la estabilidad de la transfección: liofilización

Finalmente, se han establecido las condiciones para la estabilización de complejos de lípido:ADN plasmídico por liofilización. Los liposomas compuestos de DDAB/Col en suspensión por ultrasonidos en 5% (p/V) de dextrano en agua, cuando se mezclan con ADN en una relación de 1:10 (μg de ADN por nmol de DDAB) como se ha descrito en los métodos, se pueden liofilizar sin pérdida de actividad. La concentración final de dextrano con la que se elaboraron los complejos de lípido:ADN plasmídico fue de 8% (p/V). Las preparaciones liofilizadas se reconstituyeron añadiendo agua destilada y su actividad de transfección en los pulmones de ratones después de una inyección i.v. se midió por la expresión del gen indicador de la luciferasa. La congelación y descongelación de la preparación reconstituida no afectó a la actividad (generalmente 1-2 ng de proteína luciferasa por mg de proteína del tejido).

Varios de los complejos de lípido catiónico:ADN plasmídico descritos en la presente memoria son estables y pueden dar una actividad de transfección *in vivo* consecuente (que varía de 0,5 a 2 ng de luciferasa por mg de proteína del tejido incluso después de un almacenamiento largo a 4°C o liofilización). Las formulaciones que contienen colesterol como lípido "auxiliar" generan una eficacia de transfección *in vivo* mucho mayor. La estabilización de la estructura del complejo con PEG-PE mantiene la actividad del complejo durante el almacenamiento y puede prolongar el tiempo de circulación en la sangre para dirigirlo a tejidos específicos. La condensación del ADN con poliaminas antes de la formación de complejos con el lípido mejora el almacenamiento *in vitro* y los niveles de actividad *in vivo*. Los enfoques metodológicos para producir formulaciones estables de complejos de lípido:ADN plasmídico que presenten una actividad de transfección *in vivo* elevada confieren ventajas para establecer preparaciones farmacéuticamente aceptables y, por lo tanto, facilitan la terapia génica basada en liposomas.

Ejemplo 2

Transfección in vitro de complejos de lípido:ADN plasmídico con ligandos de direccionamiento

A.- Preparación de los fragmentos Fab'

Las secuencias rhuMAbHER2 clonadas por cadena pesada y ligera se co-expresaron en *E. Coli* como se ha descrito previamente (Carter *et al.*, *Biotechnology* 10: 163-167 (1992)). El fragmento de anticuerpo, rhuMAbHER2-Fab' se recuperó a partir de pastas de fermentación de *E. Coli* por cromatografía de afinidad con proteína G estreptocócica (Carter *et al.*, *Biotechnology* 10: 163-167 (1992)), dando un rendimiento típico de Fab' con un contenido de 60-90% de tiol libre reducido (Fab'-SH).

B.- Preparación de los liposomas

Se elaboraron complejos de ADN condensado con tres composiciones de lípido diferentes, usando los métodos descritos anteriormente en el ejemplo 1, con las siguientes modificaciones. El primer complejo se elaboró con DDAB/DOPE (1/1), que produjo complejos de liposomas catiónicos solo con ADN, como se ha descrito anteriormente. El segundo complejo se elaboró con DDAB/DOPE (1/1) con 1% de derivado de PEG-PE con maleimida en la última posición del PEG, que produjeron CLDC con el componente de estabilización estérica añadido después de la formación del complejo con el ADN. El tercer complejo se elaboró con DDAB/DOPE (1/1) con 1% de derivado de PEG-PE con el fragmento Fab' de un anticuerpo anti-Her2 humanizado enlazado en la última posición del PEG a través del grupo tiol libre al resto maleimida. Esto produjo CLDC con el ligando de direccionamiento unido al componente de estabilización estérica añadido después de la formación de complejos con el ADN.

C.- Transfección y resultados

Las células se transfectaron como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1, pero sin almacenamiento del complejo de lípido:ADN plasmídico. En este ejemplo se usaron dos líneas celulares. La primera línea celular fue la MCF-7; las células de esta línea celular no sobre-expresan el receptor HER2. Estas células se cultivaron en DME H-21 con 10% de suero bovino de ternera y en CO₂ al 5%. La segunda línea celular fue de células SK-BR3, células que sobre-expresan el receptor HER2, cultivadas en medio 5A de McCoy con suero bovino de ternera en CO₂ al 5%. La segunda línea celular fueron células SK-BR3, células que sobre-expresan el receptor HER2, cultivadas en medio

ES 2 296 391 T3

de McCoy con suero bovino de ternera y en CO₂ al 5%. En ambos casos las células (~ 5 x 10⁴ células por pozo) se transfectaron y se incubaron con 12 µg de complejo de ADN plasmídico con lípido como se ha descrito anteriormente (PCMV/IVS-luc⁺, gen indicador de la luciferasa descrito anteriormente) durante 4 horas a 37°C. Después se aspiró el sobrenadante, se añadió medio preparado recientemente y las células se incubaron durante 24 horas a 37°C. Entonces se recogieron las células lavando con PBS (libre de Ca/Mg) y luego se pusieron en suspensión en disolución tampón de lisis para el análisis de la luciferasa, como se ha descrito anteriormente.

La figura 5A muestra que la transfección de células no diana, que no sobre-expresan el receptor HER2, se inhibió mediante la adición del PEG-PE, incluso en presencia del ligando de direccionamiento conjugado en el extremo del PEG a través del resto maleimida terminal. La figura 5B muestra que la transfección de las células diana que sobre-expresan el receptor HER2 también se inhibió con la adición de PEG-PE, pero la actividad de transfección se recuperó y aumentó cuando el PEG-PE se conjugó con un ligando de direccionamiento que reconoce al receptor HER2.

La comparación entre las figuras 5A y 5B indica que los inmuno-CLDC dirigidos fueron activos para transfectar las células diana mucho más eficazmente que las células no diana. Este resultado se produce debido a la adición del agente estabilizador que lleva el ligando (PEG-PE) conjugado con el anti-HER2-Fab', lo que inhibe la transfección de las células no diana (figura 5A) pero aumenta la transfección de las células diana (figura 5B).

Ejemplo 3

Preparación de la molécula de enlace maleimido-propionilamido-PEG2000- diestearoilfosfatidiletanolamina (Mal-PEG-DSPE)

Se incubaron durante 6 horas a 45°C, 100 mg (44 moles) de 4-maleimidopropionilamido-poli(etilenglicol)- α -succinimidilcarbonato (Mal-PEG-NHS; Shearwater Polymers, Inc.) preparado a partir de poli(etilenglicol) (peso molecular 2.000), 33 mg (44 µmoles) de diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE; Avanti Polar Lipids) y 12 ml (86 µmoles) de trietilamina en 1 ml de cloroformo. En este momento, la cromatografía en capa fina sobre sílice (disolvente, cloroformo/metanol 7:3) indicó la conversión completa del DSPE en un producto más rápido, negativo frente a la ninhidrina, identificado como Mal-PEG-DSPE. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice, usando gradiente en etapas de metanol en cloroformo (5%, 10%, 15% de metanol en volumen). El Mal-PEG-DSPE puro se eluyó con 15% de metanol. Rendimiento, 85 mg (65% de la teoría). Rf 0,27-0,29 (Sílice 60, CHCl₃-MeOH-H₂O, 65:25:4). Relación entre los grupos maleimida y fosfato: 0,95-1,02.

Alternativamente, esta molécula de unión se puede preparar como se describe en la patente estadounidense US 5.527.528 o en Kirpotin *et al.* (*Biochemistry*, 36: 66-75 (1997)).

Ejemplo 4

Conjugación del Mal-PEG-DSPE con el fragmento Fab' de un anticuerpo reactivo frente a la oncoproteína HER2

Se pusieron 300 nmoles de Mal-PEG-DSPE en 0,5 ml de cloroformo en un tubo de ensayo de vidrio y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo seco se disolvió en 1 ml de disolución tampón MES-20 (ácido morfolinoetano-sulfónico 20 mM, cloruro de sodio 144 mM, ácido etilendiamina-tetraacético 2 mM y NaOH hasta pH 6,0). A la disolución de Mal-PEG-DSPE se le añadieron 2,5 ml de una disolución que contenía 0,57 mg/ml de fragmentos Fab' de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado frente al dominio extracelular de la oncoproteína HER2 (rhuMAbHER2, Genentech Inc.), y el pH se ajustó cuidadosamente a 7,2-7,4 con NaOH diluida. La mezcla se incubó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 2,5 horas y la reacción se detuvo por adición de hidrocloreto de cisteína 0,2M hasta una concentración final de 5 mM. Quince minutos después de la adición de cisteína, la mezcla de reacción se dializó frente a disolución salina tamponada con HEPES (ácido hidroxietilpeiperazino-etanosulfónico 20 mM, NaCl 144 mM, NaOH hasta pH 7,2), se concentró por ultrafiltración a través de una membrana YM-10 (Amicon) a presión y se esterilizó por ultrafiltración a través de un filtro de 0,2 µm de acetato de celulosa. Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), con tinción con azul de Coomassie. La proteína total se determinó por análisis de enlace al colorante (Bio-Rad). El análisis reveló una conversión del 62% de la proteína original (P. M. 46.000) en un producto más lento (P. M. 49.000) consistente con el conjugado esperado. La recuperación de la proteína total en los productos fue de 98%.

Ejemplo 5

Conjugación del Mal-PEG-DSPE con un anticuerpo Fv de cadena sencilla reactivo frente a la proteína HER2

Se disolvieron 150 nmoles de Mal-PEG-DSPE en 0,5 ml de MES-20 y se hicieron reaccionar con 0,5 ml de una disolución que contenía 0,7 mg/ml de anticuerpo Fv de cadena sencilla C6.5Cys, reactivo frente al dominio extracelular de la oncoproteína HER2. El anticuerpo se preparó como ha sido descrito por Schier *et al.* (*Immunotechnology* 1: 73-81 (1995)). La reacción y el análisis de los productos se realizaron como se ha descrito en el ejemplo anterior. La recuperación de la proteína total fue de 86%. Aproximadamente 52% de la proteína recuperada (P. M. 27.000) estaba en forma de un producto con peso molecular mayor (P. M. 29.000-30.000), consistente con el conjugado esperado.

ES 2 296 391 T3

Ejemplo 6

Preparación de inmunoliposomas con fragmentos Fab' anti-HER2 conjugados y cargados con un indicador fluorescente sensible al pH

5 Se prepararon liposomas unilamelares pequeños (100 nm) que contenían atrapado indicador fluorescente sensible al pH de ácido 8-hidroxipirenotrisulfónico a partir de una mezcla de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (Avanti), colesterol (Calbiochem) y derivado de diesteroil-fosfatidiletanolamina con metoxipolioxietilenglicol (P. M. 1.900) (Sygena) en una relación molar de 30:20:3 como se describe en Kirpotin *et al.* (*Biochemistry*, 36: 66-75 (1997)) y se esterilizó por filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,2 μm . 0,26 ml de preparación de liposomas que contenía 2 μmoles de fosfolípidos se mezclaron con 0,106 ml de una disolución que contenía 100 μg de conjugado Fab'-PEG-DSPE anti-HER2 preparado según el ejemplo 4 anterior y se incubó durante la noche a 37°C. Después de la incubación, se separaron los liposomas del material no enlazado por filtración en gel sobre una columna de Sepharose 4B (Pharmacia), usando una disolución salina tamponada con HEPES como eluyente. Los liposomas se eluyeron en el volumen vacío de la columna. La cantidad de proteína enlazada con el liposoma se determinó mediante el análisis de enlace al colorante Bio-Rad y la concentración del liposoma se midió por el fósforo total usando el método del molibdato (Morrison, *Anal. Biochem.*, 7: 218-224 (1964). El análisis por SDS-PAGE de los liposomas (véase el ejemplo 13) reveló la presencia de conjugado Fab'-PEG-DSPE anti-HER2, pero no de Fab' anti-HER2 libre en la preparación de liposomas. La proteína asociada al liposoma se cuantificó por SDS-PAGE (véase el ejemplo 13) y el enlace del conjugado Fab'-PEG-DSPE añadido con los liposomas se expresó como porcentaje entre la relación proteína/fosfolípido de salida y la relación proteína/fosfolípido de entrada. El enlace del conjugado Fab'-PEG-DSPE con los liposomas fue de 80%. La pérdida de HPTS de los liposomas durante la incubación con el conjugado proteína-PEG-DSPE con los liposomas fue menor que 2%.

25 Ejemplo 7

Preparación de inmunoliposomas con anticuerpos scFv anti-HER2 conjugado y cargado con un indicador fluorescente sensible al pH

30 Usando el procedimiento del ejemplo 6, el conjugado de Fv C6.5Cys anti-HER2 de cadena sencilla con Mal-PEG-DSPE, obtenido según el ejemplo 5, se incubó con liposomas cargados con HPTS en una relación de entrada de 15,6 μg de proteína por 1 μmol de fosfolípido en el liposoma. Después de la separación del material no enlazado por filtración en gel sobre Sepharose 4B, los liposomas se analizaron como se ha descrito en el ejemplo 6. La relación proteína/fosfolípido de salida fue de 14,4 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, lo que indica el 92,3% de enlace del conjugado a los liposomas.

Ejemplo 8

40 *Absorción de los liposomas por células que sobre-expresan el HER2*

Células de cáncer de mama humano que sobre-expresan el HER2 (SK-BR-3) se cultivaron en medio 5A de McCoy con 10% de suero de ternera fetal, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin a 37°C y CO₂ al 5%. Veinticuatro horas antes del análisis, las células se recogieron por tratamiento con EDTA 5 mM en disolución salina tamponada con fosfato y se pusieron en placas de cultivo celular de 24 pozos con una densidad de 200.000 células/pozo en 1 ml de medio de cultivo celular. Los liposomas se añadieron al medio de cultivo celular en los pozos (por triplicado) para obtener una concentración final de 25 μM de fosfolípidos liposómicos. Luego se incubaron las placas durante 4 horas con agitación suave a 37°C y en CO₂ al 5%. Después de la incubación, los medios se aspiraron de los pozos, las capas celulares se lavaron cuatro veces con 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato, se recogieron en 1 ml de EDTA 5 mM en disolución salina tamponada con fosfato y las cantidades de liposomas enlazados a las células y endocitosados se determinaron por fluorimetría como se describe en Kirpotin *et al.*, *Biochemistry* 36: 66-75 (1997). Para comparación, las incubaciones se realizaron también con los liposomas conjugados con Fab' anti-HER2 y scFv mediante moléculas de unión Mal-PEG-DSPE incluidas previamente en la composición de los liposomas (Kirpotin *et al.*, *Ibid.*). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

55

60

65

Liposomas	Proteínas por liposoma	Liposomas asociados con células totales, nmoles de fosfolípido/10 ⁶ células	Liposomas endocitosados, % del total
Sin anticuerpos	0	0,0059 ± 0,00036	0
Fab' anti-HER2, conjugación con la molécula de enlace pre-incorporada	34	0,744 ± 0,086	86 ± 7,8
scFv anti-HER2, conjugación con la molécula de enlace pre-incorporada	37	0,311 ± 0,025	59,3 ± 4,3
Fab' anti-HER2, según el ejemplo 4	43	1,304 ± 0,054	95,9 ± 3,2
scFv anti-HER2, según el ejemplo 5	39	0,576 ± 0,035	60,4 ± 0,9

Como ponen de manifiesto estos datos, el enlace a la célula diana y la internalización de los liposomas preparados según la presente invención fue al menos igual, y a menudo superior, al de liposomas similares preparados según el mejor método de la técnica anterior.

Ejemplo 9

Preparación de doxorubicina inmunoliposómica anti-HER2 por modificación de la doxorubicina liposómica pre-elaborada con conjugado Fab'-PEG-DSPE anti-HER2 a 55°C

0,38 ml de doxorubicina liposómica disponible comercialmente (Doxil[®], Sequus Pharmaceuticals, Inc.) que contenía 2 mg/ml de doxorubicina se mezcló con 0,26 ml de preparación de conjugado Fab'-PEG-DSPE anti-HER2 obtenido según el ejemplo 6, se incubó a 55°C durante 20 minutos y se enfrió rápidamente en agua helada. El material no enlazado y los componentes de peso molecular bajo se eliminaron por filtración en gel de los productos de incubación a través de una columna con Sepharose 4B (Pharmacia). Los liposomas se recogieron en el volumen vacío de la columna y se analizó la proteína por SDS-PAGE, el fosfolípido por el método del molibdato y la doxorubicina por espectrometría después de disolución en isopropanol acidificado ($E1_{480}^{%} = 208$). Obtenido: aproximadamente, 45 Fab'/liposoma (enlace al conjugado añadido 77%). No se observó pérdida de doxorubicina de los liposomas (contenido de doxorubicina antes de la incubación, 145,9 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido; después de la incubación, 155,8 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido).

Ejemplo 10

Preparación de doxorubicina inmunoliposómica anti-HER2 por modificación de la doxorubicina liposómica pre-elaborada con conjugado scFv-PEG-DSPE anti-HER2 a 55°C

La modificación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 9, usando 0,4 ml de preparación de conjugado C6.5Cys-PEG-DSPE (ejemplo 5) y 0,35 ml de Doxil[®]. Obtenido: 48 proteínas/liposoma (enlace cuantitativo del conjugado a los liposomas); pérdida de fármaco: 3,7% (contenido de doxorubicina antes de la modificación, 145,9 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido; después de la modificación, 140,5 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido).

Ejemplo 11

Preparación de doxorubicina inmunoliposómica anti-HER2 por modificación de Doxil[®] co conjugado Fab'-PEG-DSPE anti-HER2 a 37°C

La modificación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 9 anterior, usando 0,31 ml de Doxil[®] y 0,212 ml de preparación de Fab'-PEG-DSPE anti-HER2 (ejemplo 4), pero la incubación fue durante la noche a 37°C. Obtenido: 46 Fab'/liposoma (82% de enlace del conjugado añadido a los liposomas); no se observó pérdida del fármaco (doxorubicina antes de la modificación, 145,9 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido; después de la modificación, 146,0 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido). La temperatura de transición del constituyente lipídico de Doxil[®] (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) es próxima a 55°C. Por lo tanto, la modificación es igualmente eficaz cuando los lípidos del liposoma están en estado de gel.

ES 2 296 391 T3

Ejemplo 12

Preparación de doxorubicina inmunoliposómica anti-HER2 por modificación de Doxil® con conjugado scFv-PEG-DSPE anti-HER2 a 37°C

5 La modificación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 11, usando 0,31 ml de Doxil® y 0,4 ml de preparación de conjugado C6.5Cys-PEG-DSPE (ejemplo 5). Obtenido: 49 proteínas/liposoma (enlace cuantitativo del conjugado a los liposomas). No se detectó pérdida del fármaco (doxorubicina antes de la modificación, 145,9 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido; después de la modificación, 150,30 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido). Por lo tanto, la modificación de los liposomas con el conjugado scFv-PEG-DSPE fue igualmente eficaz cuando los lípidos del liposoma estaban en estado de gel.

Ejemplo 13

15 *Cuantificación del anticuerpo conjugado en los liposomas y productos de conjugación preparados según los ejemplos 6-12*

La cantidad de conjugado proteína-PEG en el producto de conjugación y en los liposomas se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras según Laemmli (1974). Típicamente, se mezclaron alícuotas de 5-20 μl de la muestra analítica con 6x de disolución tampón de muestra que contenía SDS y colorante (azul de bromofenol), se incubó durante 1 minuto a 60°C y se aplicó sobre un gel de poliacrilamida (dimensiones: 10x10x0,075 cm) con una concentración de 10-12% y un contenido de agente de reticulación de 2,6%. La separación se realizó en un aparato de electroforesis de gel en lámina vertical con una corriente constante de 30 mA. Las bandas de proteína se desarrollaron por tinción con azul de Coomassie usando métodos convencionales. El conjugado formó una banda distinta con menos movilidad electroforética que la proteína original. Para la cuantificación de la proteína, las bandas se escindieron y el colorante se extrajo en dimetilformamida acuosa al 50% a 100°C durante 30 minutos. La cantidad de colorante extraído se cuantificó por espectrometría a 595 nm y la cantidad de proteína por banda se determinó por comparación con una curva de calibrado obtenida a partir de bandas procesadas de forma similar de cantidades estándar obtenidas de forma concomitante a partir de la proteína correspondiente (Fab' o scFv).

Ejemplo 14

35 *Liberación de la doxorubicina en células cancerosas que sobre-expresan el HER2 con inmunoliposomas anti-HER2 preparados según los ejemplos 9-12*

Se cultivaron células de cáncer de mama humano (SK-BR-3) que sobre-expresan el HER2 y se pusieron en placas como se ha descrito en el ejemplo 8 anterior. Se añadieron las preparaciones de doxorubicina inmunoliposómica anti-HER2 (ejemplos 9-12 anteriores) al medio de cultivo celular en los pozos (por triplicado) hasta obtener una concentración final de fosfolípidos liposómicos de 200 μM (0,030 \pm 0,001 mg/ml de doxorubicina). Las placas se incubaron entonces durante 4 horas con agitación suave a 37°C y CO₂ al 5%. Después de incubación se aspiró el líquido de los pozos, las capas celulares se lavaron 3 veces con 1 ml cada vez de disolución salina tamponada con fosfato y las células se recogieron en 0,5 ml de EDTA 5 mM en disolución salina tamponada con fosfato, se aglomeraron por centrifugación y se extrajeron con una mezcla de HCl 0,3N/etanol al 50%. La cantidad de doxorubicina en los extractos de etanol-HCl se determinó por espectrofluorometría (longitud de onda de excitación 470 nm; longitud de onda de emisión 590 nm) y se normalizó a la cantidad de células en las placas. Para comparar, se hicieron también incubaciones con los liposomas conjugados con scFv (C6.5Cys) anti-HER2 mediante moléculas de enlace de Mal-PEG-DSPE incorporadas previamente en la matriz lipídica del liposomas (Kirpotin *et al.*, 1997). Para evaluar la especificidad del enlace, en algunos de los pozos las células se incubaron previamente con 5 μg de anticuerpo monoclonal bivalente anti-HER2 libre (MAb anti-HER2). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Preparación de doxorubicina Liposómica	Absorción de doxorubicina, pg/célula (media \pm desv. est.)
Ejemplo 9	1,652 \pm 0,046
Ejemplo 10	1,364 \pm 0,016
Ejemplo 11	1,518 \pm 0,040
Ejemplo 12	1,118 \pm 0,005
scFv anti-HER2, conjugación a la molécula de enlace activa incorporada en el liposoma	0,372 \pm 0,015
Ejemplo 9 + MAb anti-HER2	0,372 \pm 0,015

ES 2 296 391 T3

Los inmunoliposomas preparados según la presente invención fueron capaces de liberar doxorubicina encapsulada en los liposomas en células diana incluso más eficazmente que los inmunoliposomas preparados con los métodos anteriores, es decir: la conjugación del fragmento de anticuerpo a los liposomas que contienen la molécula de enlace activada. La incubación previa de las células con anticuerpo libre reactivo frente al antígeno diana (proteína HER2) sobre la superficie celular produjo una disminución de diez veces en la absorción de la doxorubicina inmunoliposómica preparada según la presente invención; por lo tanto, la absorción fue específica de la diana.

Ejemplo 15

Preparación de las micropartículas de complejo de lípido-ADN con fragmentos de anticuerpo conjugados

Se preparó una suspensión de micropartículas de lípido-ADN (que tienen un tamaño de 410 ± 150 nm, medido por dispersión dinámica de luz) compuestas por ADN plasmídico (pCMV/IVS-Luc⁺; $10 \mu\text{g/ml}$), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB, 60 nmoles/ml) y dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE, 60 nmoles/ml) en dextrosa acuosa al 5%, como se ha descrito en Hong *et al.* (*FEBS Lett.* 400: 233-237 (1997)). El conjugado de Fab'-PEG-DSPE se preparó por incubación conjunta de Mal-PEG-DSPE y fragmentos Fab' de anticuerpo anti-HER2 con una relación molar de 4:1, con una concentración de proteína de $0,3 \text{ mg/ml}$ en disolución tampón acuosa fisiológica a pH 7,2 durante 2 horas. Las micropartículas de lípido-ADN con fragmentos Fab' anti-HER2 conjugados se prepararon por incubación de las micropartículas de lípido-ADN con el conjugado en la cantidad de 0,5% en moles con respecto al contenido lipídico total en las partículas durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Las partículas de control con la molécula de enlace sola (control no dirigido) se prepararon de forma similar, pero sin conjugar, el Mal-PEG-DSPE extinguido con β -mercaptoetanol se sustituyó con el conjugado de Fab'-PEG-DSPE.

Ejemplo 16

Transfección dirigida por ADN de las células con micropartículas de lípido-ADN con fragmentos de anticuerpo conjugados

La actividad de transfección de micropartículas de ADN de pCMV/IVS-Luc⁺-lípido preparadas como en el ejemplo 15 anterior, se estudió en cultivos de células de cáncer de mama humano: SK-BR-3 (que sobre-expresan el antígeno diana, oncoproteína del HER2) y MCF-7 (la línea con baja expresión del HER2). La expresión del gen indicador (luciferasa) se determinó por luminometría después de 24 horas de exposición de las células a los complejos de lípido-ADN ($1 \mu\text{g}$ de ADN por 50-100.000 células) en medio de crecimiento suplementado con suero al 10% y sirvió como medida de la eficacia de la transfección. La descripción detallada de este procedimiento experimental se da en Hong *et al.*, *FEBS Lett.* 400: 233-237 (1997). Las micropartículas de ADN conjugado con Fab' anti-HER2-lípido preparadas según esta invención fueron aproximadamente 25 veces más eficaces para la liberación del plásmido en las células SK-BR-3 positivas para la diana que las partículas no dirigidas emparejadas. En las células MCF-7 negativas para la diana, las partículas dirigidas y no dirigidas de ADN-lípido tuvieron igual eficacia. Así, las partículas de lípido-ADN modificadas por el anticuerpo preparadas según la invención, son capaces de liberación específica de la diana de ADN funcional en células de cáncer humanas.

Células	Micropartículas	Expresión de la luciferasa, ng/mg de proteína celular (media \pm desv. est.)
SK-BR3	ADN/lípido solo	$116,2 \pm 35,4$
SK-BR3	ADN/lípido + Mal-PEG-DSPE (* control no dirigido)	$40,4 \pm 0,1$
SK-BR3	ADN-lípido + Fab'-PEG-DSPE (dirigido)	995 ± 197
MCF-7	ADN/lípido solo	$6,44 \pm 0,34$
MCF-7	ADN/lípido + Mal-PEG-DSPE (* control no dirigido)	$0,58 \pm 0,30$
MCF-7	ADN-lípido + Fab'-PEG-DSPE (dirigido)	$0,71 \pm 13$

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da por medio de una molécula de enlace, comprendiendo dicho método la etapa de:

incubar la micropartícula lipídica con el polipéptido conjugado con una molécula de enlace que comprende:

(a) un dominio hidrofóbico,

(b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y

(c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en dicho polipéptido y unido a la cadena polimérica hidrofílica en un extremo contralateral con el dominio hidrofóbico,

durante un tiempo suficiente para permitir que el dominio hidrofóbico se asocie de forma estable con la micropartícula lipídica.

2. Un método para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da, en el que dicho método comprende la etapa de:

incubar el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos agregada terminalmente que comprende principalmente aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas, cuya secuencia es seguida por un sitio de modificación lipídica con un resto lipídico agregado sintéticamente, con la micropartícula lipídica durante un tiempo suficiente para permitir que el resto lipídico se asocie de forma estable con la micropartícula lipídica.

3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la micropartícula lipídica es un liposoma.

4. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la micropartícula lipídica es un complejo de lípido:ácido nucleico.

5. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la micropartícula lipídica es un complejo de lípido:fármaco.

6. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la micropartícula lipídica es una gota de microemulsión.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido es un anticuerpo.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es un fragmento Fab' de un anticuerpo.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es una enzima.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es una hormona.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es un factor de crecimiento.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido es una proteína de enlace a un ácido nucleico.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el grupo reactivo es un grupo maleimido.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la incubación se produce en un medio acuoso.

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido conjugado se somete a una etapa de purificación para separarlo de la molécula de enlace que no ha reaccionado y del polipéptido sin modificar antes de la incubación con la micropartícula.

17. El método según la reivindicación 16, en el que la etapa de purificación se elige entre el grupo que consiste en precipitación con sales, diálisis y cromatografía.

18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dos o más polipéptidos están unidos a dicha micropartícula lipídica.

ES 2 296 391 T3

19. Un método para unir varios polipéptidos a una micropartícula lipídica, en el que al menos uno de los polipéptidos se une por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

5 20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la micropartícula contiene en su composición moléculas reactivas con el grupo químico.

10 21. El método según la reivindicación 20, en el que el grupo químico se elige entre el grupo que consiste en: un grupo amino, un grupo carboxi, un grupo tiol, un grupo maleimido, un grupo yodoacetoamido, un grupo vinilsulfona, un grupo aldehído, un grupo hidrazina, un grupo cetona y un grupo cloruro de cianuro.

10 22. Una micropartícula lipídica que se conjuga con dos o más polipéptidos diferentes de al menos 6.000 Da, en la que los polipéptidos se conjugan cada uno de ellos con la micropartícula lipídica a través de una molécula de enlace, comprendiendo cada molécula de enlace:

15 a) un dominio hidrofóbico,

b) una cadena polimérica hidrofílica unida terminalmente al dominio hidrofóbico, y

20 c) un grupo químico reactivo frente a uno o más grupos funcionales en dicho polipéptido conjugado a dicha molécula de enlace, cuyo grupo químico está unido a la cadena polimérica hidrofílica en un extremo contralateral con el dominio hidrofóbico, cuyos grupos funcionales son el mismo para cada polipéptido.

25 23. La micropartícula lipídica según la reivindicación 22, en la que la micropartícula lipídica se elige entre el grupo que consiste en: un liposoma, un complejo de lípido:ácido nucleico, un complejo de lípido:fármaco y una gota de microemulsión.

24. Un kit para preparar una micropartícula lipídica unida a un polipéptido de al menos 6.000 Da, comprendiendo dicho kit:

30 (i) un envase que contiene dicha micropartícula lipídica, y

(ii) un envase que contiene dicho polipéptido enlazado a un polímero hidrofílico unido a un dominio hidrofóbico;

35 en el que dicha micropartícula lipídica y dicho polipéptido se asocian de forma estable cuando se incuban juntos.

25. El kit según la reivindicación 24, en el que el polipéptido se enlaza con el polímero hidrofílico por derivación química.

40 26. El kit según la reivindicación 24, en el que el polipéptido comprende el polímero hidrofílico.

45 27. El kit según la reivindicación 24, 25 ó 26, en el que dicho polipéptido es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un fragmento Fab' de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla, una proteína receptora, una linfocina, una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento o una proteína de enlace a un ácido nucleico.

28. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que dicho polipéptido se enlaza específicamente a un marcador de superficie celular.

50 29. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho polímero hidrofílico es PEG, PEG-PE, PEG-DSPE, un derivado de detergente con PEG o un polímero sintético.

30. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la micropartícula lipídica es un liposoma con PEG.

55 31. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos 77% de las moléculas de polipéptido se asocian de forma estable con la micropartícula lipídica.

32. El método según la reivindicación 31, en el que al menos 80% de las moléculas de polipéptido se asocian de forma estable con la micropartícula lipídica.

60 33. El método según la reivindicación 31, en el que al menos 92,3% de las moléculas de polipéptido se asocian de forma estable con la micropartícula lipídica.

65 34. El método según la reivindicación 31, en el que las moléculas de polipéptido se asocian de forma estable con la micropartícula lipídica.

FIG. 1A

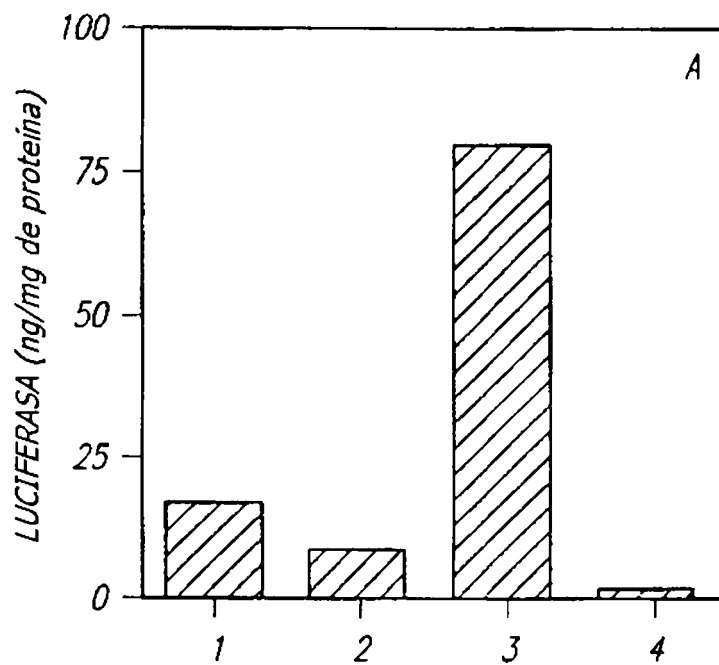


FIG. 1B

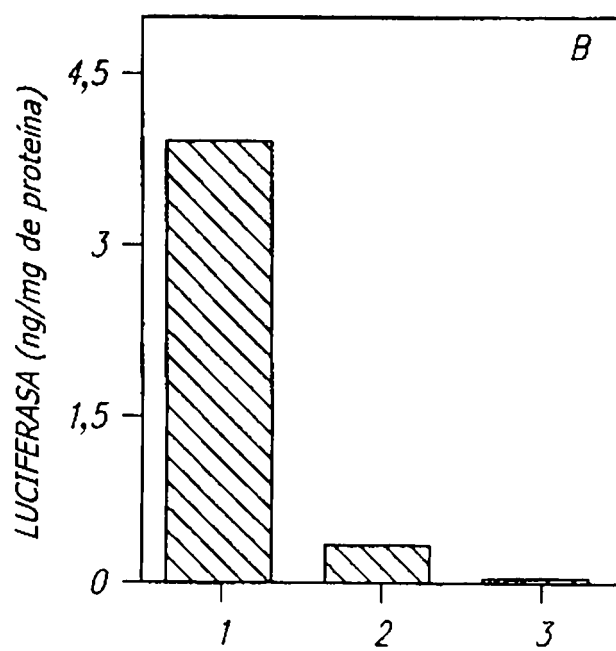


FIG. 2

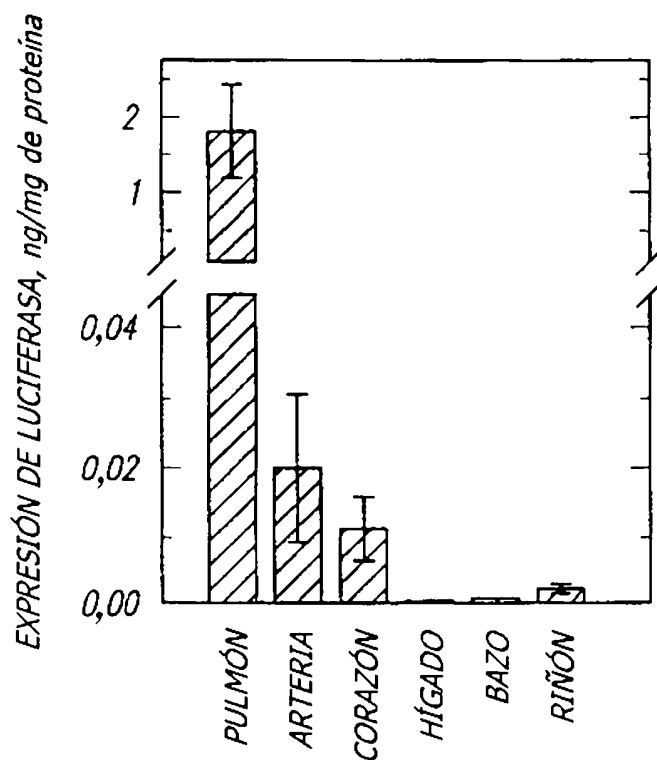


FIG. 3

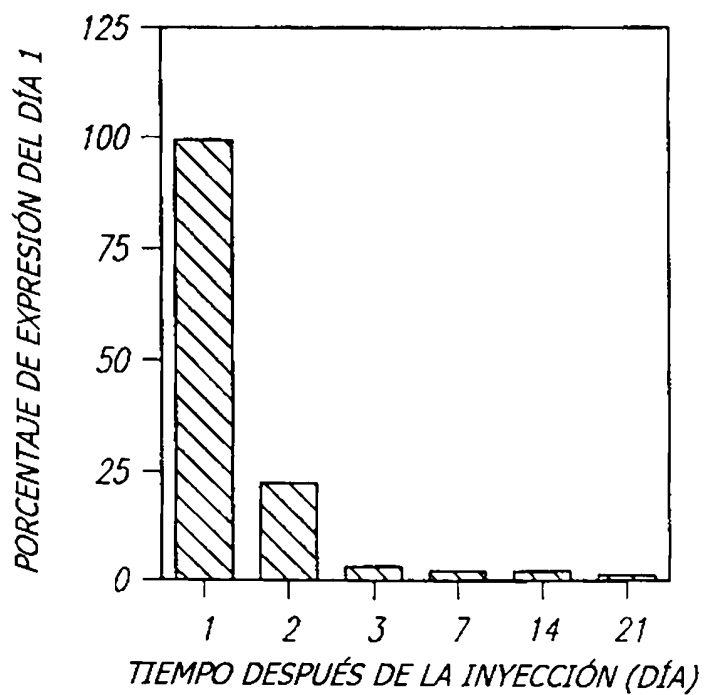


FIG. 4

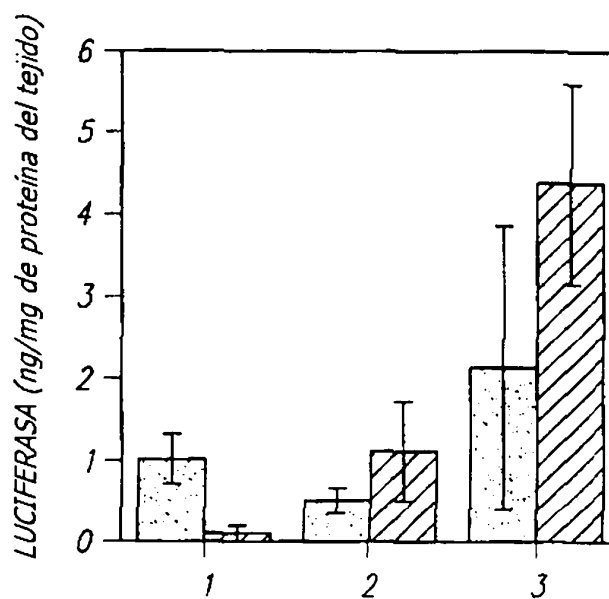


FIG. 5A

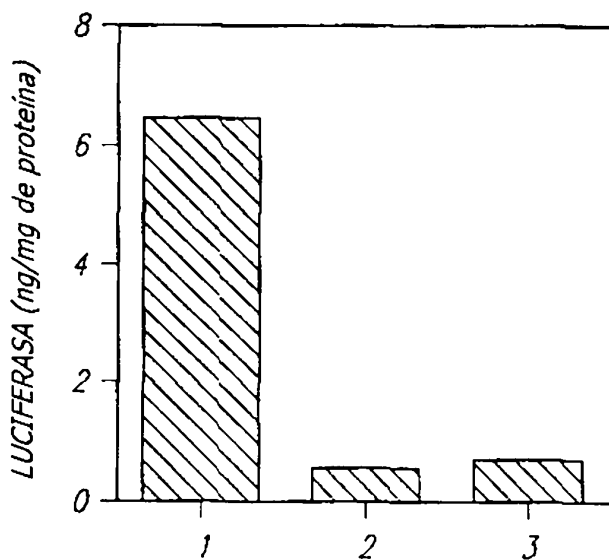


FIG. 5B

