



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 548**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)  
**C12N 15/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05795367 .1**  
96 Fecha de presentación : **20.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1805305**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Vehículo para el transporte de una molécula seleccionada a una célula.**

30 Prioridad: **21.10.2004 NL 1027311**  
**04.11.2004 NL 1027417**  
**10.11.2004 NL 1027479**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2009**

73 Titular/es: **Synvolux IP B.V.**  
**L.J. Zielstraweg 1**  
**9713 GX Groningen, NL**

72 Inventor/es: **Ruiters, Marcel, Herman, Josef**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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

Vehículo para el transporte de una molécula seleccionada a una célula.

La presente invención se refiere a un vehículo para el transporte de una molécula seleccionada a una célula, que comprende una molécula SAINT, que mediante una interacción electrostática, más particularmente una unión no covalente, por ejemplo, mediante enlace de hidrógeno, se une a la molécula seleccionada. Además, la presente invención se refiere a la aplicación de la molécula SAINT para un transporte direccionado de una molécula seleccionada a una célula.

A partir del estado de la técnica se conoce la administración de moléculas seleccionadas a un organismo, de manera que la molécula seleccionada tiene que realizar su acción en la célula preferente del organismo o próxima a ella. Una posibilidad para liberar dichas moléculas a una célula es la administración de cantidades considerables de moléculas seleccionadas al organismo, a través de lo cual, mediante difusión, se obtendrá una concentración requerida de la molécula seleccionada en las células diana. Un problema de este proceso es que la molécula seleccionada podría generar efectos secundarios indeseados en otras partes del organismo.

REJMAN J y otros: "Characterization and transfection properties of lipoplexes stabilized with novel exchangeable polyethylene glycol-lipid conjugates" (Propiedades de caracterización y transfección de lipoplejos estabilizados con nuevos conjugados polietilenglicol-lípido intercambiables) BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1660, no. 1-2, 28 de Enero de 2004 (2004-01-28), páginas 41-52, XP004486900 ISSN: 0005-2736 da a conocer propiedades de caracterización y transfección de lipoplejos estabilizados con nuevos conjugados polietilenglicol-lípido intercambiables.

Por lo tanto, se han desarrollado procesos para liberar moléculas seleccionadas, por ejemplo fármacos, a una localización específica en el organismo en una célula específica. Un primer método aplicado comprende el acoplamiento del compuesto seleccionado a anticuerpos. Dicho acoplamiento es covalente. Como efecto, la actividad del compuesto seleccionado se reduce sustancialmente en comparación con la actividad de la molécula libre. Otro método aplicado actualmente es el empaquetamiento de las moléculas seleccionadas en liposomas. Al exterior del liposoma, en el que se empaqueta la molécula, se puede acoplar un anticuerpo. Este acoplamiento del anticuerpo al liposoma tiene lugar mayoritariamente después de la introducción de la molécula seleccionada en el liposoma. En caso de que el acoplamiento del anticuerpo tenga lugar antes de introducir la molécula seleccionada, es posible que el anticuerpo esté localizado en la membrana interna del liposoma lo que podría dar lugar a una menor eficacia del liposoma. Una desventaja general conocida de la introducción de moléculas seleccionadas, por ejemplo compuestos farmacéuticos, en liposomas, es que los compuestos farmacéuticos se desprenden lentamente del liposoma. Una segunda desventaja es que la formación del empaquetamiento (el liposoma que contiene el compuesto seleccionado en el interior) debe realizarse en una solución que contiene el compuesto seleccionado. Durante el empaquetamiento, no más de un 5% de los compuestos seleccionados se introducirán en el liposoma. Esto significa que el 95% del compuesto seleccionado no se introduce en los liposomas. Consecuentemente, la eficacia de este método es muy baja.

La presente invención está dirigida a dar a conocer un vehículo que mejora enormemente la liberación de un compuesto seleccionado a una célula.

Además, la presente invención está dirigida a dar a conocer un vehículo que permite una unión duradera y estable a la molécula seleccionada.

Para alcanzar, como mínimo, uno de los objetivos mencionados anteriormente, la presente invención da a conocer un vehículo tal como se menciona en el preámbulo, caracterizado por las medidas según la reivindicación 1. De esta manera, se da a conocer un proceso muy estable para liberar una molécula seleccionada en una célula.

Aunque posteriormente se mencionará la interacción de hidrógeno y el enlace de hidrógeno, en general la interacción no se limita a esta única forma. En todos los casos, se hace referencia a cualquier tipo de interacción electrostática.

En este texto, la palabra "célula" se usa en general. Sin embargo, con ésta, tal como entenderá claramente el experto en la materia, se menciona una "célula específica" a la que debe transportarse el compuesto seleccionado.

Las realizaciones preferentes se describen en las reivindicaciones 2, 3 y 4.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a la aplicación de una molécula SAINT para transportar una molécula seleccionada, de una manera direccionada, a una célula. Las moléculas Saint son habitualmente conocidas, también se describen como vehículo de transporte, y se describen ampliamente en la Patente Europea, número de publicación EP-0755924 B1 y en las patentes americanas con números de publicación US 5.853.694 y US 6.726.894, que están registradas por el presente solicitante. Las moléculas Saint son consideradas, según una amplia descripción, como anfífilos sintéticos.

La manera en que las moléculas seleccionadas, por ejemplo macromoléculas o compuestos farmacéuticos en general, son envueltas en moléculas SAINT, se describe ampliamente en la patente europea mencionada anteriormente EP 0755924 B1 y las patentes americanas US 5.853.694 y US 6.726.894.

Según una realización preferente, la molécula SAINT se une covalentemente a una molécula enlazadora. Mediante este acoplamiento covalente, se asegura que es una parte integrada y sólida del vehículo estable. Las moléculas enlazadoras se podrían unir a las moléculas SAINT en las posiciones R1, R2, R3, R4, R5 y R5', teniendo en cuenta que R5 y R5' pueden ser idénticos o diferentes. Para una descripción más extensa de este tipo de moléculas SAINT se encuentra como referencia la patente US 6.726.894. Ejemplos de las moléculas enlazadoras son, por ejemplo, las siguientes: cloruro de 1-N'-metil-4-(aminobutil, cis-9-oleil)-metilpirimidinio (enlazador amino para SAINT), y cloruro de 1-N'-metil-4-(N-succinimidil-S-acetiltioacetato, cis-9-oleil)-metilpiridinio (enlazador SATA para SAINT). En ambos casos, el grupo acetiltioacetato y el grupo SATA funcionan como (grupo) enlazador. Sin embargo, también se pueden aplicar compuestos equivalentes como grupo enlazador, incluyendo cada compuesto químico que se pueda unir covalentemente a moléculas SAINT. Aunque, en general, sólo una molécula enlazadora se unirá a la molécula SAINT, podría ser posible que una combinación de posiciones sean ocupadas por una molécula enlazadora, por ejemplo, R1, R2, R3, R4, R5 o R5' solas o una combinación de las mismas, con un máximo de todas las cinco posiciones para la enlazadora.

Según una realización preferente adicional, el ligando específico de célula se selecciona entre: un anticuerpo o un derivado del mismo, una proteína, un péptido, un compuesto con una aplicación específica como diana para una superficie celular, y otros compuestos con la especificidad de célula deseada.

Los anticuerpos o derivados de los mismos se pueden generar sintéticamente, o son variantes naturales.

En el alcance de la presente invención, se considera como ligando cada compuesto que es capaz de unirse a un receptor o proteína de una célula. Una condición previa para el ligando es que tenga una especificidad para un receptor y/o un tipo de célula. Ejemplos de estos tipos de ligandos son L-Dopa o derivados de adrenalina. El primer tipo de ligandos se une específicamente a los receptores de dopamina en la *substantia nigra*; el segundo tipo de ligando se une específicamente a los receptores adrenérgicos del organismo. Naturalmente, la presente invención no se limita a este ejemplo.

Más específicamente, se prefiere que la molécula a envolver se una en la superficie activa de la molécula SAINT. Sin limitarse a esta realización, aquí se utiliza el grupo piridinio cargado positivamente. Este grupo se une a la carga negativa de la macromolécula a envolver. Además, es posible que las moléculas SAINT se unan a la macromolécula de una manera indirecta, mediante interacción con la capa acuosa que rodea la macromolécula, en el caso de que la macromolécula tenga una carga positiva. Consecuentemente, las moléculas SAINT se unirán a las macromoléculas mediante una interacción electrostática, por ejemplo, mediante la formación de enlaces de hidrógeno, evitando así el desprendimiento de las moléculas seleccionadas de las moléculas saint.

Además, existe la posibilidad de que la interacción electrostática de, por ejemplo, los átomos de carbono o los orto-electrones del anillo de piridinio, sea para la unión.

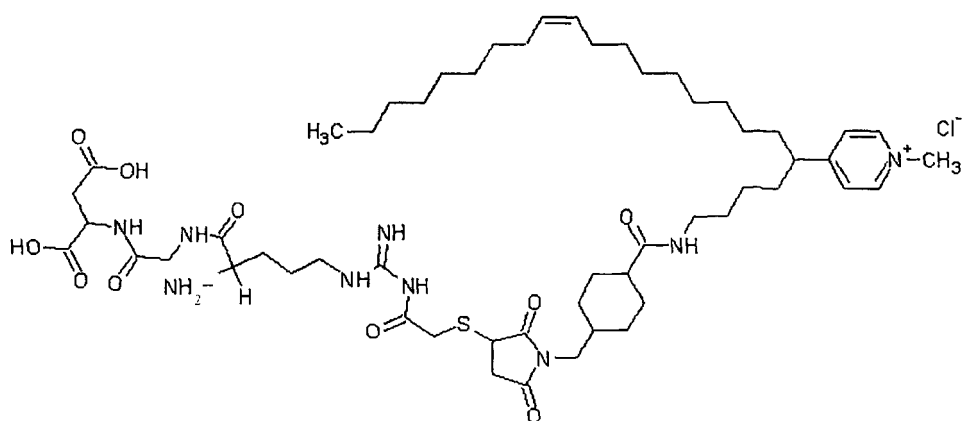
La presente invención crea la posibilidad de liberar moléculas seleccionadas, por ejemplo, un fármaco, en un sitio específico en el organismo en una célula específica. Por la presente, la ventaja que se genera es que la cantidad de fármacos que deben administrarse al organismo se pueden orientar exactamente hacia la cantidad de células que necesitan tratarse. Mediante la elección de la formulación apropiada entre las moléculas Saint y el compuesto envuelto, se evita el desprendimiento del compuesto y se libera después de la liberación, fusión o captación en la membrana celular, la cual contiene también el ligando receptor que es complementario para el ligando acoplado al enlazador. De esta manera, se evita que la molécula seleccionada se libere en otros sitios del organismo. Aquí permanecen incluidos en el vehículo de la molécula Saint.

#### Ejemplo

Las células de riñón embrionarias humanas son difíciles de transfectar. Cuando se utilizan estas células, los principales métodos de transfección de la competencia (u otros fabricantes) requieren de varios microgramos de ADN plasmídico para una transfección satisfactoria. Combinado con SAINT-18, 1  $\mu$ g (por cada 12 pocillos) normalmente da lugar a una tasa de transfección por encima del 90%. Para ser capaz de visualizar el efecto potenciador del grupo de reconocimiento SAINT-18-RGD, en este protocolo se utilizó una cantidad baja de ADN plasmídico (500 ng por cada 12 pocillos). La fórmula estructural de SAINT-enlazador-RGD se representa en la figura 1 siguiente. Además, se acopla un péptido RGD al grupo SATA del enlazador-SAINT, tal como se describe en la presente invención. El grupo RGD es un grupo de reconocimiento para la familia de receptores de integrina y está pensado para incrementar la eficacia de la transfección. Las células de riñón embrionarias humanas, cepa 293A, se cultivan en placas de 12 pocillos y se transfectan con 4 combinaciones de moléculas SAINT (es decir, SAINT-18, SAINT-18 acoplado a RGD, una mezcla de SAINT-18 y SAINT-18 acoplado a RGD, y solamente una molécula enlazadora como referencia). Se complejan 500 ng de plásmido CMV-GFP con moléculas SAINT o enlazador de 3,75 nm (por pocillo). 48 horas después de la transfección, se mide la expresión de GFP mediante análisis FACS. El porcentaje de células positivas de GFP se representan en el gráfico siguiente.

Fórmula Molecular =  $C_{56}H_{91}ClN_8O_{10}S$

Peso Molecular = 1103,88734



Fórmula estructural de SAINT-enlazador-RGD

Los resultados representados en la figura 1 muestran claramente que

1. El enlazador S-18 funciona mal como reactivo de transfección (columna 4).
2. S18/RGD es capaz de transfectar células.
3. La proporción 500:1 de S18:S18RGD aumenta la tasa de transfección en aproximadamente un 33%.

El enlazador S18 solo no presenta una capacidad de transfección importante. Se prevé que S18-RGD 100% presenta una menor eficacia de la transfección resultante del impedimento estérico generado por el grupo RGD. Sin embargo, cuando S18RGD se mezcla con S18 en una proporción de 500:1, la eficacia de la transfección aumenta ampliamente. Se determinará una proporción más optimizada. Se obtienen resultados similares con grupos de reconocimiento diferentes a RGD (tales como un ligando específico de célula). Sin embargo, en todos los casos, se necesitará una optimización para conseguir un efecto óptimo. Este experimento indica ampliamente la característica potenciadora de la transfección de las moléculas Saint.

# REIVINDICACIONES

1. Vehículo para el transporte de una molécula seleccionada a una célula, el constituyente de dicho vehículo consiste en una o más moléculas enlazadoras SAINT, que se **caracteriza** porque la molécula SAINT está unida covalentemente a la molécula enlazadora que está unida covalentemente a un anticuerpo o un derivado del mismo, una proteína, un péptido, un compuesto que reconoce una superficie celular, u otros compuestos con especificidad celular, y en el que dicha molécula Saint es un anfifilo sintético que comprende un grupo piridinio cargado positivamente.

2. Aplicación *in vitro* de una molécula SAINT para el transporte direccionado de una molécula seleccionada a una célula, en la que la molécula SAINT está unida a la molécula seleccionada mediante una interacción electrostática, y en la que la molécula SAINT está acoplada covalentemente a la molécula enlazadora y la molécula enlazadora está acoplada covalentemente al ligando específico de la célula, y en la que dicha molécula SAINT es un anfifilo sintético que comprende un grupo piridinio cargado positivamente.

3. Aplicación, según la reivindicación 2, que utiliza un vehículo según la reivindicación 1.

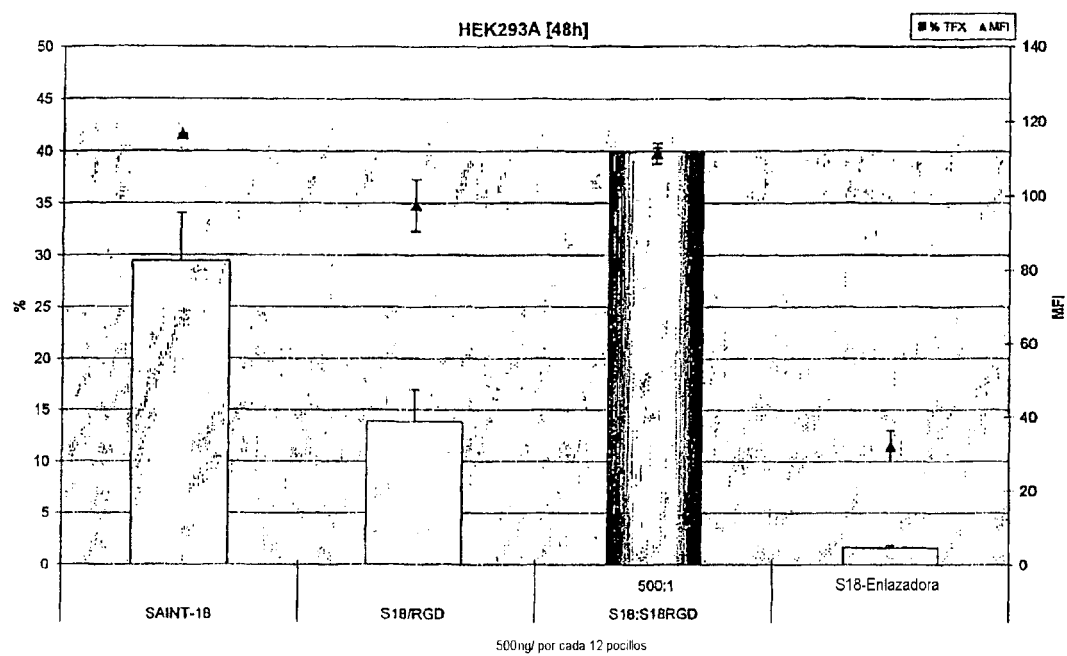


FIG. 1