

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 131**

51 Int. Cl.:

C08F 293/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2009 E 09747510 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2281011**

54 Título: **Copolímeros de dibloques y sus complejos con polinucleótidos para el suministro en células**

30 Prioridad:

13.05.2008 US 52908 P 13.05.2008 US 52914 P
22.08.2008 US 91294 P 06.11.2008 US 112054 P
06.11.2008 US 112048 P 08.12.2008 US 120769 P
24.12.2008 US 140779 P 24.12.2008 US 140774 P
21.04.2009 US 171377 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)
4311 11th Avenue NE, Suite 500
Seattle, WA 98105-4608, US y
PHASERX, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

STAYTON, PATRICK S.;
HOFFMAN, ALLAN S.;
CONVERTINE, ANTHONY J.;
BENOIT, DANIELLE;
DUVALL, CRAIG L.;
JOHNSON, PAUL y
GALL, ANNA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 404 131 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

Copolímeros de dibloques y sus complejos con polinucleótidos para el suministro en células

5 REFERENCIAS CRUZADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/052.908, presentada el 13 de mayo, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/052.914, presentada el 13 de mayo, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/091.294, presentada el 22 de agosto, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/112.054, presentada el 06 de noviembre, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/112.048, presentada el 06 de noviembre, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/120.769, presentada el 12 de diciembre, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/140.779, presentada el 24 de diciembre, 2008, solicitud provisional de EE.UU. n° 61/140.774, presentada el 24 de diciembre, 2008, y solicitud provisional de EE.UU. n° 61/171.377, presentada el 21 de abril, 2009.

15

DECLARACIÓN EN CUANTO A LA INVESTIGACIÓN CON PATROCINIO FEDERAL

[0002] Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno con el contrato n° 5 R01 EB 2991-03, concedido por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

20

CAMPO

[0003] Esta invención se refiere a los campos de la química orgánica, química de polímeros, bioquímica, biología molecular y medicina. En particular, se refiere a copolímeros (p. ej., copolímeros de dibloques) y a sus complejos con polinucleótidos para usar como vehículos para el suministro de polinucleótidos en células vivas.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] En algunos casos, es beneficioso proporcionar agentes terapéuticos (p. ej., oligonucleótidos) a células vivas. En algunos casos, el suministro de dichos polinucleótidos a una célula viva proporciona un beneficio terapéutico.

30

RESUMEN

[0005] La presente invención proporciona un copolímero como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona copolímeros que comprenden al menos dos bloques, comprendiendo entonces el primer bloque al menos una unidad constitutiva que es hidrófila a pH fisiológico, y comprendiendo el segundo bloque una pluralidad de restos hidrófobos. En algunas realizaciones, el segundo bloque comprende además una especie cargable, sea en el estado cargado o no cargado, que es aniónica a pH fisiológico. Sin embargo, cuando el pH es aproximadamente el pK_a de la especie cargable, existirá una distribución de equilibrio de la especie cargable en ambas formas, es decir, aproximadamente 50% será aniónica y aproximadamente 50% no estará cargada. Cuanto más alejado esté el pH del pK_a de la especie cargable, habrá un desplazamiento correspondiente en este equilibrio de forma que a valores de pH mayores predominará la forma aniónica y a valores de pH menores predominará la forma no cargada. Las realizaciones descritas en el presente documento incluyen la forma de los copolímeros a cualquier valor de pH. A un valor de pH de un endosoma (un pH endosómico), la especie cargable predominará en la forma no cargada.

35

40

45

[0006] Preferiblemente, cuando un polímero descrito en el presente documento está en contacto con una membrana celular, altera o desestabiliza de otra forma la membrana y entra en el entorno celular. En realizaciones específicas, un polímero proporcionado en el presente documento es endosomolítico o desestabiliza de otra forma una membrana endosómica.

50

[0007] La presente invención se refiere a un copolímero (p. ej., copolímero de dibloques) que comprende:

55 un primer bloque que comprende una primera unidad constitutiva que es hidrófila a pH fisiológico normal,

un segundo bloque que comprende:

una segunda unidad constitutiva que es catiónica a pH fisiológico normal y que puede ser igual o diferente de la primera unidad constitutiva;

60

una tercera unidad constitutiva que es aniónica a pH fisiológico normal;

un resto potenciador de la hidrofobicidad en el que:

el resto potenciador de la hidrofobicidad está covalentemente unido a la segunda unidad constitutiva; o,

5 el resto potenciador de la hidrofobicidad está covalentemente unido a la tercera unidad constitutiva; o,

el resto potenciador de la hidrofobicidad está compuesto de una cuarta unidad constitutiva del segundo bloque; o

cualquier combinación de los anteriores; y

10

el segundo bloque es sustancialmente neutro en la carga total.

[0008] En diferentes realizaciones, la primera unidad constitutiva es catiónica a pH fisiológico normal (es decir, aproximadamente pH fisiológico), es aniónica a pH fisiológico normal, es neutra a pH fisiológico normal, o es ión híbrido a pH fisiológico normal. En algunas realizaciones el primer bloque del copolímero es policatiónico a pH fisiológico normal, es polianiónico a pH fisiológico normal, es neutro a pH fisiológico normal o es un polión híbrido a pH fisiológico normal. En realizaciones adicionales, el primer bloque del copolímero tiene sustancialmente las mismas propiedades iónicas a pH endosómico así como a pH fisiológico normal, p. ej., es policatiónico a pH endosómico, es polianiónico a pH endosómico, es neutro a pH endosómico o es polión híbrido a pH endosómico.

20

[0009] En una realización de esta invención, la primera unidad constitutiva comprende una especie de nitrógeno catiónica (es decir una especie de nitrógeno que es catiónica a pH fisiológico normal). En una realización de esta invención, la especie de nitrógeno catiónica es una especie amonio. En una realización de esta invención, la segunda unidad constitutiva es la misma que la primera unidad constitutiva. En una realización de esta invención, la especie aniónica comprende un anión ácido carboxílico. En una realización de esta invención, el primer bloque comprende además una unidad constitutiva de carga neutra intercalada aleatoriamente entre las primeras unidades constitutivas. En una realización de esta invención, el primer y/o segundo bloque comprende al menos un grupo reactivo o que se puede modificar. En una realización de esta invención, si está presente, la cuarta unidad constitutiva comprende de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% en peso del segundo bloque.

30

[0010] En algunas realizaciones, el primer bloque de polímero tiene un tamaño de aproximadamente 10.000 daltons, o de aproximadamente 2.000 daltons a aproximadamente 30.000 daltons, o de aproximadamente 8.500 daltons a aproximadamente 13.000 daltons. En algunas realizaciones, el primer bloque de polímero tiene una carga neta positiva similar en valor absoluto a la carga neta negativa en la molécula de ARNip que se va a suministrar.

35

[0011] En algunas realizaciones, el segundo bloque de polímero tiene un peso molecular aproximadamente igual al primer bloque de polímero, o aproximadamente 0,2-5 veces, o aproximadamente 1-3 veces el tamaño del primer bloque de polímero, y en las realizaciones más preferidas, el segundo bloque de polímero tiene un tamaño de aproximadamente 2-3 (de dos a tres) veces el del primer bloque de polímero.

40

[0012] En algunas realizaciones, el bloque cargado hidrófilo forma complejo con (usado de forma intercambiable en el presente documento con "está asociado con" o "está unido a", p. ej., por uno o más enlaces covalentes, una o más interacciones iónicas, una combinación de los mismos, o similares) al menos un nucleótido, incluyendo un polinucleótido, p. ej., un ARNip.

45

[0013] En una realización de esta invención, el bloque de polinucleótido está unido a uno de los bloques de polímero por un enlace covalente opcionalmente escindible. El ácido polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y análogos naturales y sintéticos de los mismos. En una realización de esta invención, el polinucleótido es de sentido contrario. En una realización de esta invención, el polinucleótido es ARN, opcionalmente el ARN se selecciona del grupo que consiste en ARNm, ARN asociado a Piwi, miARN y ARNip. En un aspecto de esta invención el ARN es ARNip.

50

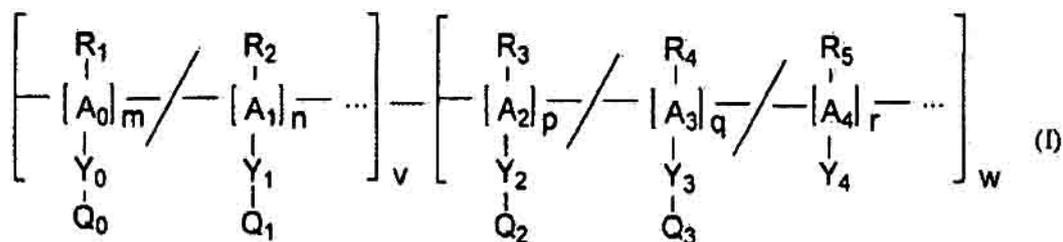
[0014] También se proporciona en el presente documento cuando cada una de las unidades constitutivas deriva independientemente de un monómero etilénico y la síntesis del copolímero comprende polimerización viva.

55

[0015] En una realización de esta invención, el monómero etilénico es un monómero acrílico.

[0016] En algunas realizaciones del presente documento se proporciona un copolímero de dibloques, que tiene la fórmula química I:

60



[0017] En algunas realizaciones:

5 A_0, A_1, A_2, A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-C-$, $-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$; en los que,

a es 1-4;

b es 2-4;

10

Y_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo(1C-10C), $C(O)NR_6$ (1C-10C) y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

15 Y_0, Y_1 y Y_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)-, $-OC(O)$ -alquilo(1C-10C)-, $-O$ -alquilo(2C-10C)- y $-S$ -alquilo(2C-10C)-, $-C(O)NR_6$ -alquilo(2C-10C)-;

Y_3 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C) y arilo (6C-10C); en los que

20

los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_1 - R_5 y Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

25 cada R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-CN$, alquilo, alquililo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

30 Q_0 es un resto seleccionado del grupo que consiste en restos que son hidrófilos a pH fisiológico y tienen al menos parcialmente carga positiva a pH fisiológico (p. ej., amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); tienen al menos parcialmente carga negativa a pH fisiológico pero sufren protonación a pH más bajo (p. ej., carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); son sustancialmente neutros (o no cargados) a pH fisiológico (p. ej., hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares); son al menos parcialmente iones híbridos a pH fisiológico (p. ej., un resto monomérico que comprende un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico); restos que se pueden conjugar o funcionalizar (p. ej. restos que comprenden un

35 grupo reactivo, p. ej., azida, alquino, éster de succinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de p-nitrofenilo, disulfuro de piridilo, o similares); o hidrógeno;

40 Q_1 es un resto que es hidrófilo a pH fisiológico, y tiene al menos parcialmente carga positiva a pH fisiológico (p. ej., amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); tiene al menos parcialmente carga negativa a pH fisiológico pero sufre protonación a pH más bajo (p. ej., carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); es sustancialmente neutro a pH fisiológico (p. ej., hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares); o es al menos parcialmente ion híbrido a pH fisiológico (p. ej., un resto monomérico que comprende un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico);

45 Q_2 es un resto que tiene carga positiva a pH fisiológico, incluyendo, pero sin limitar, amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo, y piridilo;

Q_3 es un resto que tiene carga negativa a pH fisiológico, pero sufre protonación a pH más bajo, incluyendo, pero sin limitar, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato y fosfato;

50

m es de 0 a menos de 1,0 (p. ej., de 0 a aproximadamente 0,49);

n es mayor que 0 hasta 1,0 (p. ej., de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0); en el que

$$m + n = 1$$

p es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (p. ej., de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5);

5 q es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (p. ej., de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5); en el que:

r es de 0 a aproximadamente 0,8 (p. ej., de 0 a aproximadamente 0,6); en el que

10
$$p + q + r = 1$$

v es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 kDa; y,

w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa.

15

[0018] En una realización específica, v es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa. En realizaciones específicas adicionales o alternativas, w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa.

[0019] En algunas realizaciones, el número o la relación de restos monoméricos representado por p y q, están dentro de aproximadamente 30% el uno del otro, aproximadamente 20% el uno del otro, aproximadamente 10% el uno del otro, o similar. En realizaciones específicas, p es sustancialmente igual que q. En algunas realizaciones, al menos parcialmente con carga incluye más que una cantidad en trazas de la especie con carga, incluyendo, p. ej., al menos 20% de los restos tienen carga, al menos 30% de los restos tienen carga, al menos 40% de los restos tienen carga, al menos 50% de los restos tienen carga, al menos 60% de los restos tienen carga, al menos 70% de los restos tienen carga, o similares.

25

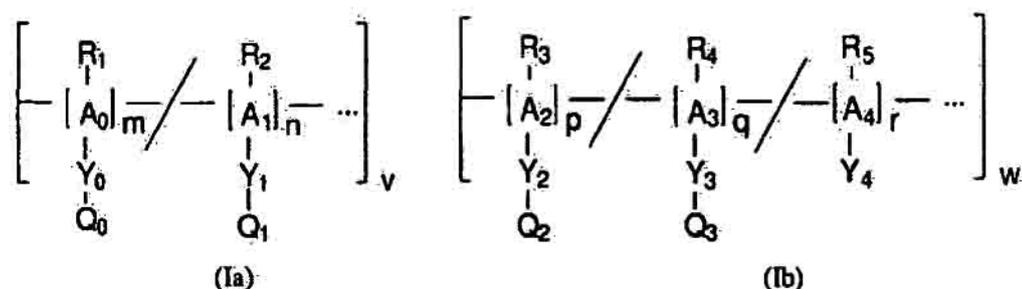
[0020] En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y sustancialmente neutro (o no cargado) a pH fisiológico. Es decir, a pH fisiológico cualquier especie cargable en Q₁ está predominantemente en forma neutra. En algunas realizaciones, sustancialmente no cargado incluye, menos de 5% tienen carga, menos de 3% tienen carga, menos de 1% tienen carga, o similar. En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente aniónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y uno de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico, y el otro de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y es sustancialmente neutro a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y uno de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente aniónico a pH fisiológico, y el otro de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y es sustancialmente neutro a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico, y Q₀ es un resto que se puede conjugar o funcionalizar. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y Q₁ es un resto que es hidrófilo y sustancialmente neutro a pH fisiológico, y Q₀ es un resto que se puede conjugar o funcionalizar.

30

35

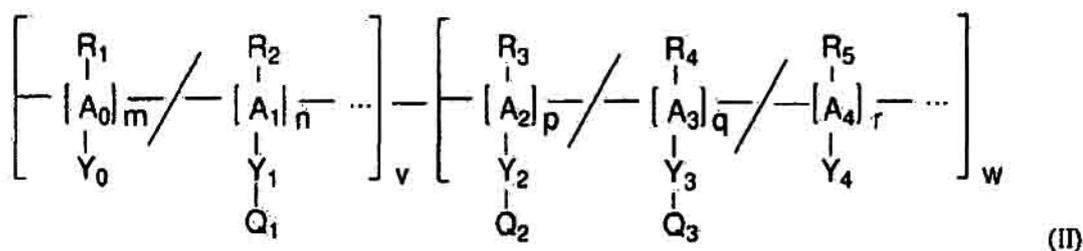
40

[0021] En algunas realizaciones del presente documento, se proporciona un copolímero que tiene al menos dos bloques, teniendo el primer bloque la fórmula química Ia, y teniendo el segundo bloque la fórmula química Ib, en las que cada uno de los términos descritos en las mismas son como se han descrito antes:



45

[0022] También se proporciona en el presente documento un compuesto de fórmula II:



[0023] En algunas realizaciones:

5 A_0 , A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$; en los que,

a es 1-4;
b es 2-4;

10

Y_0 e Y_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo(1C-10C), $C(O)NR_6$ (1C-10C) y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

15 Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)-, $-OC(O)$ -alquilo(1C-10C)-, $-O$ -alquilo(2C-10C)- y $-S$ -alquilo(2C-10C)-, $-C(O)NR_6$ -alquilo(2C-10C)-;

Y_3 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C) y arilo (6C-10C); en los que

20

los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_1 - R_5 y Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

25 cada R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-CN$, alquilo, alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

Q_1 y Q_2 son restos que tienen carga positiva a pH fisiológico, incluyendo pero sin limitar, amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo y piridilo;

30

Q_3 es un resto que tiene carga negativa a pH fisiológico, pero sufre protonación a pH más bajo, incluyendo, pero sin limitar, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato y fosfato;

m es de 0 a aproximadamente 0,49;

35

n es de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0; en el que

$$m + n = 1$$

40 p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en el que:

p es sustancialmente el mismo que q;

45

r es de 0 a aproximadamente 0,6; en el que

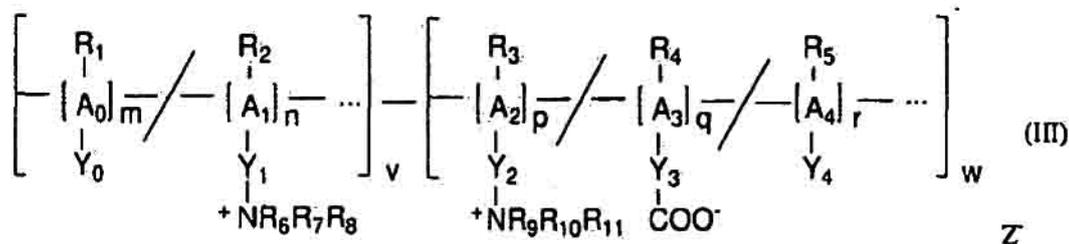
$$p + q + r = 1$$

50 v es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

w es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

[0024] También se proporciona en el presente documento un copolímero de dibloques, que tiene (a pH fisiológico

normal) la fórmula química III:



5 [0025] En algunas realizaciones:

A_0, A_1, A_2, A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$; en los que,

10 a es 1-4;
b es 2-4;

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ y R_{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-5C), cicloalquilo (3C-6C) y fenilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

Y_0 e Y_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo(1C-10C) y fenilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

20 Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)-, $-OC(O)$ -alquilo(1C-10C)-, $-O$ -alquilo(2C-10C)- y $-S$ -alquilo(2C-10C)-;

25 Y_3 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-5C) y fenilo; en los que los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_7 - R_{11} e Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

30 Z es un contraión fisiológicamente aceptable,

m es de 0 a aproximadamente 0,49;

n es de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0; en los que

35 $m + n = 1$

p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en los que:

40 p es sustancialmente el mismo que q;

r es de 0 a aproximadamente 0,6; en los que

45 $p + q + r = 1$

v es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

w es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

50 [0026] En una realización de esta invención,

A_1 es $-C-C-$
 Y_1 es $-C(O)OCH_2CH_2-$;

R₆ es hidrógeno;
R₇ y R₈ son cada uno -CH₃; y,
R₂ es -CH₃.

5 **[0027]** En una realización de esta invención,

A₂ es -C-C-
Y₂ es -C(O)OCH₂CH₂-;
R₉ es hidrógeno;

10 R₁₀ y R₁₁ son cada uno -CH₃; y,
R₃ es -CH₃.

[0028] En una realización de esta invención,

15 A₃ es -C-C-
R₃ es -CH₃CH₂CH₂-;
Y₃ es un enlace covalente; y
Z⁻ es un anión fisiológicamente aceptable (p. ej., polición o pluralidad de cationes).

20 **[0029]** En algunas realizaciones:

A₃ es -C-C-
R₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y -CH₃; y
Y₄ es -C(O)O(CH₂)₃CH₃.

25

[0030] En algunas realizaciones:

A_a es C-C-
R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (1C-3C); y

30 Y₀ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)O-alquilo(1C-3C).

[0031] En algunas realizaciones, m es 0. En determinadas realizaciones, r es 0. En algunas realizaciones, m y r son ambos 0.

35 **[0032]** La memoria descriptiva describe un procedimiento de suministro de un polinucleótido en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un complejo de polímero:polinucleótido del presente documento. En descripciones específicas, el complejo de polímero:polinucleótido está unido de una forma adecuada que incluye, a modo de ejemplo no limitante, interacciones iónicas y no iónicas, tales como uno o más enlaces covalentes, combinaciones de los mismos, o similares. En una descripción específica, se proporciona en el presente documento,
40 un procedimiento para suministrar un polinucleótido a una célula, que comprende poner en contacto la célula con un conjugado covalente del polímero y polinucleótido.

[0033] El polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y análogos naturales y sintéticos de los mismos.

45

[0034] El ADN, ARN o análogos naturales o sintéticos de los mismos, son de sentido contrario. En la descripción, el polinucleótido es ARN, opcionalmente el ARN es ARNip. En una descripción, el ARNip se suministra a una célula in vivo. El polímero de esta invención está unido o forma complejo con un resto que dirige, opcionalmente el resto que dirige está unido covalentemente al extremo α del copolímero (p. ej., copolímero de dibloques), el resto que
50 dirige está unido covalentemente al extremo ω del copolímero, o está unido covalentemente a un grupo colgante del copolímero (p. ej., copolímero de dibloques). En una descripción, el resto que dirige se selecciona, pero sin limitar, de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, moléculas de tipo anticuerpo, péptidos, péptidos cíclicos, y moléculas pequeñas.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0035] Las características nuevas de la invención se exponen en particular en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se usan los principios de la
60 invención, y los dibujos que acompañan, de los cuales:

[0036] La Figura 1 es un resumen ilustrativo de diferentes polímeros descritos en el presente documento

- 5 [0037] La Figura 2 es una síntesis ilustrativa de [PEGMAw]-[B-P-D]
- [0038] La Figura 3 es una caracterización ilustrativa de P7-PEGMA100-40 kDa
- 10 [0039] La Figura 4 es una descripción ilustrativa de la composición y propiedades de copolímeros PEGMA-DMAEMA
- [0040] La Figura 5 es una síntesis ilustrativa de [PEGMAw-MAA(NHS)]-[B-P-D]
- 10 [0041] La Figura 6 es una copolimerización por RAFT ilustrativa de PEGMA y MAA-NHS
- [0042] La Figura 7 es una copolimerización por RAFT ilustrativa de DMAEMA y MAA-NHS
- 15 [0043] La Figura 8 es una síntesis ilustrativa de PDSMA
- [0044] La Figura 9 es una síntesis ilustrativa del copolímero HPMA-PDSMA para la conjugación con ARNip
- 20 [0045] La Figura 10 ilustra la hemólisis de (A) polímeros y (B) construcciones de polímero/ARNip
- [0046] La Figura 11 ilustra la internalización en células HeLa de ARNip y complejos de polímero/ARNip marcados con FAM
- 25 [0047] La Figura 12 ilustra la citotoxicidad de HeLa no específica (A) y la inactivación de GAPDH (B) en función del soporte polimérico de ARNip
- [0048] La Figura 13 ilustra la inactivación de GAPDH en células HeLa
- 30 [0049] La Figura 14 ilustra el diseño de polímero para Poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]
- [0050] La Figura 15 ilustra la síntesis de disulfuro de piridilo-CTA
- [0051] La Figura 16 ilustra la reacción del grupo terminal del polímero disulfuro de piridilo con la cisteína peptídica
- 35 [0052] La Figura 17 ilustra un gel de SDS PAGE para la caracterización de conjugados de péptido-polímero
- [0053] La Figura 18 ilustra un ensayo de alteración de membrana usado para medir la capacidad del polímero para producir la alteración dependiente de pH de las membranas de bicapa lipídica
- 40 [0054] La Figura 19 ilustra la localización intracelular del péptido después de conjugación con el polímero
- [0055] La Figura 20 ilustra que conjugados carecían del bloque sensible al pH, eran similares a ambos grupos de control y no producían toxicidad significativa
- 45 [0056] La Figura 21 ilustra la bioactividad de conjugados peptídicos

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Polímero

- 50 [0057] En algunas realizaciones proporcionadas, la presente invención proporciona polímeros soporte y construcciones de polímero:polinucleótido. En algunos casos, estos polímeros y construcciones de polímero:polinucleótido satisfacen la necesidad de un sistema fuerte y seguro para suministrar polinucleótidos terapéuticos en las células.
- 55 [0058] En realizaciones específicas de los polímeros descritos en el presente documento, cada especie cargable está presente en una unidad constitutiva diferente. En algunas realizaciones, una primera unidad constitutiva comprende la primera especie cargable. En realizaciones adicionales o alternativas, una segunda unidad constitutiva comprende la segunda especie cargable. En realizaciones adicionales o alternativas, una tercera unidad constitutiva
- 60 [0059] Algunas unidades constitutivas de esta invención, se indica que son catiónicas o aniónicas a pH fisiológico normal. Por lo tanto, en algunos casos, a pH fisiológico normal, las especies tienen un pK_a que da como resultado

que sean protonadas (catiónicas, con carga positiva) o desprotonadas (aniónicas, con carga negativa) en el mismo. Las especies catiónicas actualmente preferidas a pH fisiológico son especies de nitrógeno tales como amonio, $-NRR'R''$, guanidinio ($-NRC(=NR'H)^+NR''R'''$, ignorando las formas canónicas que conocen los expertos en la materia), en las que los grupos R son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo, o dos grupos R unidos al mismo átomo o átomos adyacentes de nitrógeno, también pueden estar unidos entre sí para formar una especie heterocíclica tal como pirrol, imidazol, indol y similares. Los restos monoméricos o unidades constitutivas descritas en el presente documento como catiónicas a pH fisiológico normal comprenden una especie cargada o cargable en un catión, incluyendo una especie catiónica desprotonable.

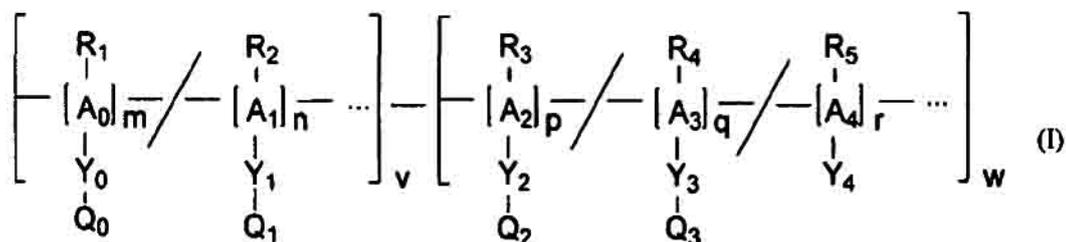
10 **[0060]** En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, las unidades constitutivas que son catiónicas o tienen carga positiva a pH fisiológico (incluyendo, p. ej., algunas unidades constitutivas hidrófilas) descritas en el presente documento, comprenden uno o más grupos amino, grupos alquilamino, grupos guanidina, grupos imidazolilo, grupos piridilo o similares, o las formas protonadas, alquiladas o cargadas de otra forma de los mismos. En algunas realizaciones, las unidades constitutivas que son catiónicas a pH fisiológico normal que se usan en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, restos monoméricos de metacrilatos de dialquilaminoalquilo (p. ej., DMAEMA). En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, las unidades constitutivas que son aniónicas o tienen carga negativa a pH fisiológico (incluyendo, p. ej., algunas unidades constitutivas hidrófilas) descritas en el presente documento, comprenden uno o más grupos ácido o bases conjugadas de los mismos, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, carboxilato, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato o similares. En algunas realizaciones, las unidades constitutivas que son aniónicas o tienen carga negativa a pH fisiológico normal que se usan en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, restos monoméricos de ácido acrílico, ácido alquil-acrílico (p. ej., ácido metilacrílico, ácido etilacrílico, ácido propilacrílico, etc.) o similares. En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, las unidades constitutivas hidrófilas que son neutras a pH fisiológico comprenden uno o más grupos hidrófilos, p. ej., hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol o similares. En algunas realizaciones, las unidades constitutivas hidrófilas que son neutras a pH fisiológico normal que se usan en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, restos monoméricos de ácido acrílico PEGilado, ácido metacrílico PEGilado, ácido hidroxialquilacrílico, ácido hidroxialquilacacrílico (p. ej., HPMA), o similares. En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, las unidades constitutivas hidrófilas que son iones híbridos a pH fisiológico comprenden un grupo aniónico o con carga negativa a pH fisiológico y un grupo catiónico o con carga positiva a pH fisiológico. En algunas realizaciones, las unidades constitutivas hidrófilas que son iones híbridos a pH fisiológico normal que se usan en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, restos monoméricos que comprenden un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico, tal como se expone en el documento US 7.300.990.

35 **[0061]** En algunas realizaciones, los polímeros proporcionados en el presente documento comprenden además una o más unidades constitutivas que comprenden una cadena lateral que se puede conjugar o funcionalizar (p. ej., un grupo colgante de un resto monomérico). En algunas realizaciones, una cadena lateral que se puede conjugar o funcionalizar, es un grupo que lleva uno o más grupos reactivos que se pueden usar para la introducción después de polimerización de grupos funcionales adicionales mediante procedimientos químicos conocidos en la materia, por ejemplo la química "click" (para ejemplos de reacciones "click" véase Wu, P.; Fokin, V. V. *Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications*. *Aldrichim. Acta*, 2007, 40, 7-17). En algunas realizaciones, las cadenas laterales que se pueden conjugar o funcionalizar proporcionadas en el presente documento comprenden uno o más de cualquier grupo activado adecuado, tal como, pero sin limitar, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), éster de HOBt (1-hidroxibenzotriazol), éster de p-nitrofenilo, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, grupo disulfuro de piridilo o similares.

[0062] En algunas realizaciones, las unidades constitutivas que son aniónicas a pH fisiológico normal comprenden ácidos carboxílicos tales como, pero sin limitar, restos monoméricos de ácido 2-propilacrílico (es decir, la unidad constitutiva derivada del mismo, ácido 2-propilpropiónico, $-CH_2C((CH_2)_2CH_3)(COOH)-(PAA)$), aunque también está contemplado en esta invención cualquier ácido orgánico o inorgánico que pueda estar presente como una especie protegida, p. ej., un éster o como el ácido libre, en el procedimiento de polimerización seleccionado. Los restos monoméricos aniónicos o unidades constitutivas descritas en el presente documento comprenden una especie cargada o cargable en un anión, incluyendo una especie aniónica protonable. En algunos casos, los restos monoméricos aniónicos pueden ser aniónicos a pH neutro 7,0.

55 **[0063]** También se pueden usar monómeros tales como anhídrido maleico (Scott M. Henry, Mohamed E. H. El-Sayed, Christopher M. Pirie, Allan S. Hoffman, y Patrick S. Stayton "pH-Responsive Poly(styrene-alt-maleic anhydride) Alkylamide Copolymers for Intracellular Drug Delivery" *Biomacromolecules* 7:2407-2414, 2006) para introducir unidades con carga negativa (p. ej., la tercera unidad constitutiva) en el segundo bloque. En dichas realizaciones, la unidad constitutiva con carga negativa es un resto monomérico de anhídrido maleico.

[0064] Una realización de esta invención es un polímero que tiene la siguiente estructura general de fórmula I:



[0065] En algunas realizaciones:

5 A_0, A_1, A_2, A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-$, $-C-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$; en los que,

a es 1-4;

b es 2-4;

10

Y_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo(1C-10C)-, $C(O)NR_6$ (1C-10C), heteroarilo (4C-10C) y arilo (6C-10C), cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

15 Y_0, Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)-, $-OC(O)$ -alquilo(1C-10C)-, $-O$ -alquilo(2C-10C)- y $-S$ -alquilo(2C-10C)-, $-C(O)NR_6$ -alquilo(2C-10C)-, heteroarilo (4C-10C) y arilo (6C-10C);

Y_3 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C), heteroarilo (4C-10C) y arilo (6C-10C); en los que

los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_1 - R_5 e Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

25 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-CN$, alquilo, alquililo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

30 Q_0 es un resto seleccionado del grupo que consiste en restos que son hidrófilos a pH fisiológico y tienen al menos parcialmente carga positiva a pH fisiológico (p. ej., amino, alquilamino, amonio, alquilamónio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); tienen al menos parcialmente carga negativa a pH fisiológico pero sufren protonación a pH más bajo (p. ej., carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); son sustancialmente neutros (o no cargados) a pH fisiológico (p. ej., hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares); al menos parcialmente iones híbridos a pH fisiológico (p. ej., un resto monomérico que comprende un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico); restos que se pueden conjugar o funcionalizar (p. ej. restos que comprenden un grupo reactivo, p. ej., azida, alquino, éster de succinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de p-nitrofenilo, disulfuro de piridilo, o similares); o hidrógeno;

40 Q_1 es un resto que es hidrófilo a pH fisiológico, y tiene al menos parcialmente carga positiva a pH fisiológico (p. ej., amino, alquilamino, amonio, alquilamónio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); tiene al menos parcialmente carga negativa a pH fisiológico pero sufre protonación a pH más bajo (p. ej., carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); es sustancialmente neutro a pH fisiológico (p. ej., hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares); o es al menos parcialmente ión híbrido a pH fisiológico (p. ej., que comprenden un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico);

45

Q_2 es un resto que tiene carga positiva a pH fisiológico, incluyendo, pero sin limitar, amino, alquilamino, amonio, alquilamónio, guanidina, imidazolilo y piridilo;

50 Q_3 es un resto que tiene carga negativa a pH fisiológico, pero sufre protonación a pH más bajo, incluyendo, pero sin limitar, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato y fosfato;

m es de aproximadamente 0 a menos de 1,0 (p. ej., de 0 a aproximadamente 0,49);

n es mayor que 0 hasta 1,0 (p. ej., de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0); en el que

$$m + n = 1$$

p es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (p. ej., de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5);

q es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (p. ej., de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5); en el que:

r es de 0 a aproximadamente 0,8 (p. ej., de 0 a aproximadamente 0,6); en el que

$$p + q + r = 1$$

v es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

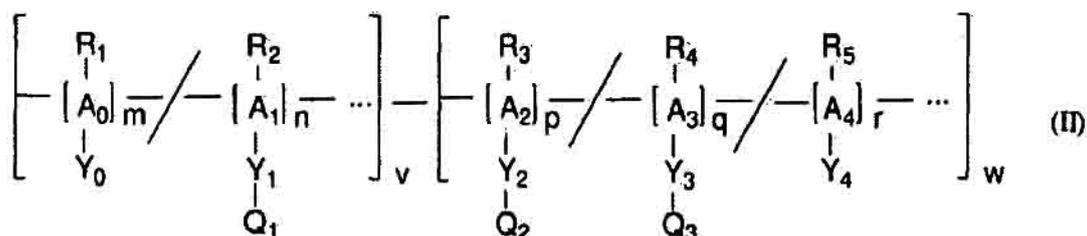
w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

[0066] En algunas realizaciones, el número o la relación de restos monoméricos representados por p y q, están dentro de aproximadamente 30% el uno del otro, aproximadamente 20% el uno del otro, aproximadamente 10% el uno del otro, o similar. En realizaciones específicas, p es sustancialmente igual que q. En algunas realizaciones, al menos parcialmente cargado incluye en general más que una cantidad en trazas de la especie cargada, incluyendo, p. ej., al menos 20% de los restos tienen carga, al menos 30% de los restos tienen carga, al menos 40% de los restos tienen carga, al menos 50% de los restos tienen carga, al menos 60% de los restos tienen carga, al menos 70% de los restos tienen carga, o similares.

[0067] En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y sustancialmente neutro (o no cargado) a pH fisiológico. En algunas realizaciones, sustancialmente no cargado incluye, p. ej., menos de 5% tienen carga, menos de 3% tienen carga, menos de 1% tienen carga, o similar. En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es 0 y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente aniónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y uno de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico, y el otro de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y es sustancialmente neutro a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y uno de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente aniónico a pH fisiológico, y el otro de Q₀ o Q₁ es un resto que es hidrófilo y es sustancialmente neutro a pH fisiológico. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y Q₁ es un resto que es hidrófilo y al menos parcialmente catiónico a pH fisiológico, y Q₀ es un resto que se puede conjugar o funcionalizar. En algunas realizaciones, m es >0 y n es >0, y Q₁ es un resto que es hidrófilo y sustancialmente neutro a pH fisiológico, y Q₀ es un resto que se puede conjugar o funcionalizar.

[0068] En algunas realizaciones, el grupo con carga positiva o al menos parcialmente con carga positiva a pH fisiológico es un grupo -NR'R", en el que R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o heteroalquilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos halógeno, amino, hidroxilo, y/o comprende uno o más enlaces insaturados; en algunas realizaciones, R' y R" se consideran juntos para formar un heteroarilo o heterociclo alicíclico sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, los grupos descritos en el presente documento como con carga positiva o al menos parcialmente con carga positiva a pH fisiológico pueden incluir, a modo de ejemplo no limitante, amino, alquilamino, dialquilamino, amino cíclico (p. ej., piperidina o piperidina N-alquilada), imino alicíclico (p. ej., dihidropiridinilo, 2,3,4,5-tetrahidropiridinilo, o similares) heteroaril-imino (p. ej., piridinilo), o similares. En algunas realizaciones, los grupos descritos en el presente documento como con carga negativa o al menos parcialmente con carga negativa a pH fisiológico, pero que sufren protonación a pH más bajo, son tales como, a modo de ejemplo no limitante, ácido carboxílico (COOH), sulfonamida, ácido borónico, ácido sulfónico, ácido sulfónico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fosfónico, ácido fosforoso, ácido carbónico, la base conjugada desprotonada de los mismos, o similares.

[0069] También se proporciona en el presente documento un compuesto de fórmula II:



[0070] En algunas realizaciones:

A_0 , A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$; en los

5 que,

a es 1-4;

b es 2-4;

10 Y_0 e Y_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo(1C-10C), $C(O)NR_6$ (1C-10C) y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)-, $-OC(O)$ -alquilo(1C-10C)-, $-O$ -alquilo(2C-10C)- y $-S$ -alquilo(2C-10C)-, $-C(O)NR_6$ -alquilo(2C-10C)-;

Y_3 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C) y arilo (6C-10C); en los que

20 los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_1 - R_5 e Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-CN$, alquilo, alquililo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar

25 opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

Q_1 y Q_2 son restos que tienen carga positiva a pH fisiológico, incluyendo pero sin limitar, amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo y piridilo;

30 Q_3 es un resto que tiene carga negativa a pH fisiológico, pero sufre protonación a pH más bajo, incluyendo, pero sin limitar, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato y fosfato;

m es de 0 a aproximadamente 0,49;

35 n es de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0; en los que

$$m + n = 1$$

p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

40

q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en los que:

p es sustancialmente el mismo que q;

45 r es de 0 a aproximadamente 0,6; en los que

$$p + q + r = 1$$

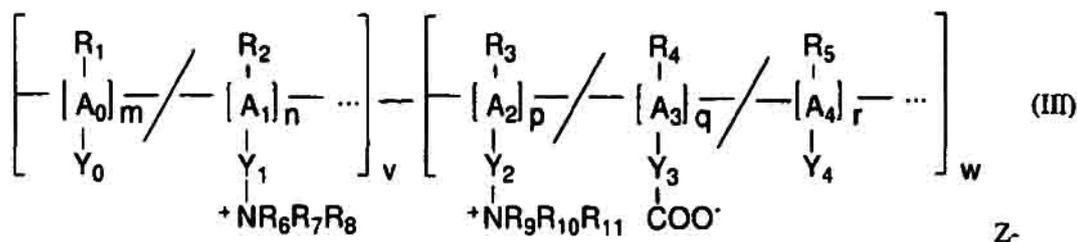
v es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

50

w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

[0071] En algunas realizaciones, el copolímero de bloques es un copolímero de dibloques, que tiene la fórmula química (a pH fisiológico normal o aproximadamente neutro) fórmula III:

55



[0072] En algunas realizaciones, A_0 , A_1 , A_2 , A_3 y A_4 , sustituidos como se ha indicado, comprenden las unidades constitutivas (usado en el presente documento de forma intercambiable con "unidades monoméricas" y "restos monoméricos") del polímero de fórmula III. En realizaciones específicas, las unidades monoméricas que constituyen los grupos A de la fórmula III son compatibles con la polimerización en condiciones adecuadas. En algunos casos, una cadena principal etilénica o unidad constitutiva, polímero $-(C-C)_m-$, en la que cada C está disustituido con H y/o cualquier otro grupo adecuado, se polimeriza usando monómeros que contienen un doble enlace carbono-carbono, $>C=C<$. En algunas realizaciones, cada grupo A (p. ej., cada uno de A_0 , A_1 , A_2 , A_3 y A_4) puede ser (es decir, se selecciona independientemente de) $-C-C-$ (es decir, una unidad monomérica etilénica o cadena principal de polímero), $-C(O)(C)_aC(O)O-$ (es decir, una unidad monomérica de polianhídrido o cadena principal de polímero), $-O(C)_aC(O)-$ (es decir, una unidad monomérica de poliéster o cadena principal de polímero), $-O(C)_bO-$ (es decir, una unidad monomérica de polialquilenglicol o cadena principal de polímero) o similares (en los que cada C está disustituido con H y/o cualquier otro grupo adecuado como se describe en el presente documento, incluyendo R_{12} y/o R_{13} como se ha descrito antes). En realizaciones específicas, el término "a" es un número entero de 1 a 4, y "b" es un número entero de 2 a 4. En algunos casos, cada grupo "Y" y "R" unido a la cadena principal de fórmula III (es decir, uno cualquiera de Y_0 , Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5) está unido a cualquier "C" (incluyendo cualquier $(C)_a$ o $(C)_b$) de la unidad monomérica específica. En realizaciones específicas, tanto Y como R de una unidad monomérica específica están unidos al mismo "C". En algunas realizaciones específicas, tanto Y como R de una unidad monomérica específica están unidos al mismo "C", siendo el "C" el alfa al grupo carbonilo de la unidad monomérica, si están presentes.

[0073] En realizaciones específicas, R_1 - R_{11} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo (p. ej., alquilo 1C-5C), cicloalquilo (p. ej., cicloalquilo 3C-6C) o fenilo, en las que cualquiera de R_1 - R_{11} está opcionalmente sustituido con uno o más de flúor, cicloalquilo o fenilo, que pueden estar además sustituidos con uno o más grupos alquilo.

[0074] En algunas realizaciones específicas, Y_0 e Y_4 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo (p. ej., alquilo 1C-10C), cicloalquilo (p. ej., cicloalquilo 3C-6C), O-alquilo (p. ej., O-alquilo(2C-10C)), $-C(O)O$ -alquilo (p. ej., $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C)), o fenilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor.

[0075] En algunas realizaciones, Y_1 e Y_2 se seleccionan independientemente de un enlace covalente, alquilo, preferiblemente en este momento un alquilo (1C-10C), $-C(O)O$ -alquilo, preferiblemente en este momento $-C(O)O$ -alquilo(2C-10C), $-OC(O)$ -alquilo, preferiblemente en este momento $-OC(O)$ -alquilo(2C-10C), O-alquilo, preferiblemente en este momento $-O$ -alquilo(2C-10C) y $-S$ -alquilo, preferiblemente en este momento $-S$ -alquilo(2C-10C). En algunas realizaciones, Y_3 se selecciona de un enlace covalente, alquilo, preferiblemente en este momento alquilo (1C-5C) y fenilo.

[0076] En algunas realizaciones, Z' está presente o ausente. En algunas realizaciones, en las que R_1 y/o R_4 es hidrógeno, Z' es OH . En algunas realizaciones, Z' es un contraión (p. ej., uno o más contraiones), preferiblemente un contraión biocompatible, tal como, a modo de ejemplo no limitante, cloruro, fosfato inorgánico u orgánico, sulfato, sulfonato, acetato, propionato, butirato, valerato, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmato, estearato, palmitolato, oleato, linolato, araquidato, gadoleato, vaccinato, lactato, glicolato, salicilato, desamionfenilalanina, desaminoserina, desaminotreonina, ϵ -hidroxicaproato, 3-hidroxiobutirato, 4-hidroxiobutirato o 3-hidroxi valerato. En algunas realizaciones, cuando cada Y, R y flúor opcional está covalentemente unido a un carbono de la cadena principal seleccionada, cualquier carbono que no está totalmente sustituido está completado con el número adecuado de átomos de hidrógeno. Los números m, n, p, q y r representan la fracción molar de cada unidad constitutiva en su bloque y v y w proporcionan el peso molecular de cada bloque.

[0077] En algunas realizaciones,

A_0 , A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se seleccionan del grupo que consiste en $-C-$, $-C-C-$, $-C(O)(CR_{12}R_{13})_aC(O)O-$, $-O(CR_{12}R_{13})_aC(O)-$ y $-O(CR_{12}R_{13})_bO-$; en los que,

a es 1-4;
b es 2-4;

5 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-5C), cicloalquilo (3C-6C), arilo (5C-10C), heteroarilo (4C-10C), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

Y₀ e Y₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), -C(O)O-alquilo(1C-10C) y fenilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, -C(O)O-alquilo(2C-10C)-, -OC(O)-alquilo(1C-10C)-, -O-alquilo(2C-10C)- y -S-alquilo(2C-10C)-;

15 Y₃ se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-5C) y fenilo;

en los que los átomos de carbono tetravalentes de A₁-A₄ que no están completamente sustituidos con R₁-R₅ e Y₀-Y₄ están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

20 Z es uno o más contraiones fisiológicamente aceptables,

m es de 0 a aproximadamente 0,49;

25 n es de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0; en los que

$$m + n = 1$$

p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

30 q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en los que:

p es sustancialmente el mismo que q;

35 r es de 0 a aproximadamente 0,6; en los que

$$p + q + r = 1$$

v es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

40 w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

[0078] En una realización específica,

45 A₀, A₁, A₂, A₃ y A₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C-C-, -C(O)(C)_aC(O)O-, -O(C)_aC(O)- y -O(C)_bO-; en los que,

a es 1-4;
b es 2-4;

50 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-5C), cicloalquilo (3C-6C) y fenilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

55 Y₀ e Y₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), -C(O)O-alquilo(1C-10C) y fenilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

60 Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, -C(O)O-alquilo(2C-10C)-, -OC(O)-alquilo(1C-10C)-, -O-alquilo(2C-10C)- y -S-alquilo(2C-10C)-;

Y₃ se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-5C) y fenilo;

en los que los átomos de carbono tetravalentes de A_1 - A_4 que no están completamente sustituidos con R_1 - R_5 e Y_0 - Y_4 están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

Z es un contraión fisiológicamente aceptable,

5

m es de 0 a aproximadamente 0,49;

n es de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0; en el que

10

$$m + n = 1$$

p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en los que:

15

p es sustancialmente el mismo que q;

r es de 0 a aproximadamente 0,6; en los que

20

$$p + q + r = 1$$

v es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

w es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa.

25

[0079] En algunas realizaciones,

A_1 es -C-C-

30 Y_1 es -C(O)OCH₂CH₂-;

R_6 es hidrógeno;

R_7 y R_8 son cada uno -CH₃; y,

R_2 es -CH₃.

35 **[0080]** En algunas realizaciones,

A_2 es -C-C-

Y_2 es -C(O)OCH₂CH₂-;

R_9 es hidrógeno;

40 R_{10} y R_{11} son cada uno -CH₃; y,

R_3 es -CH₃.

[0081] En algunas realizaciones,

45 A_3 es -C-C-

R_4 es -CH₃CH₂CH₂-;

Y_3 es un enlace covalente;

y Z es un anión fisiológicamente aceptable.

50 **[0082]** En algunas realizaciones:

A_4 es -C-C-

R_5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y -CH₃; y

Y_4 es -C(O)O(CH₂)₃CH₃.

55

[0083] En algunas realizaciones:

A_0 es C-C-

R_1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (1C-3C); y

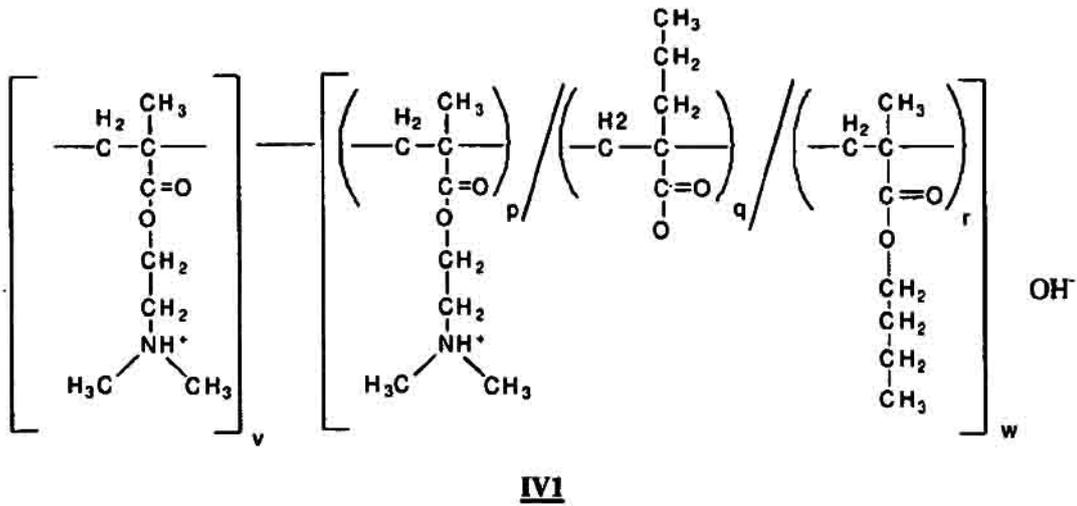
60 Y_0 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)O-alquilo(1C-3C).

[0084] En algunas realizaciones, m es 0.

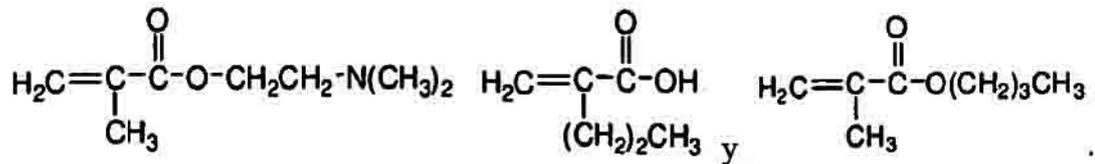
[0085] En algunas realizaciones, r es 0.

[0086] En algunas realizaciones, m y r son ambos 0.

5 [0087] En algunas realizaciones se proporciona un polímero de ejemplo, pero no limitante, de esta invención:

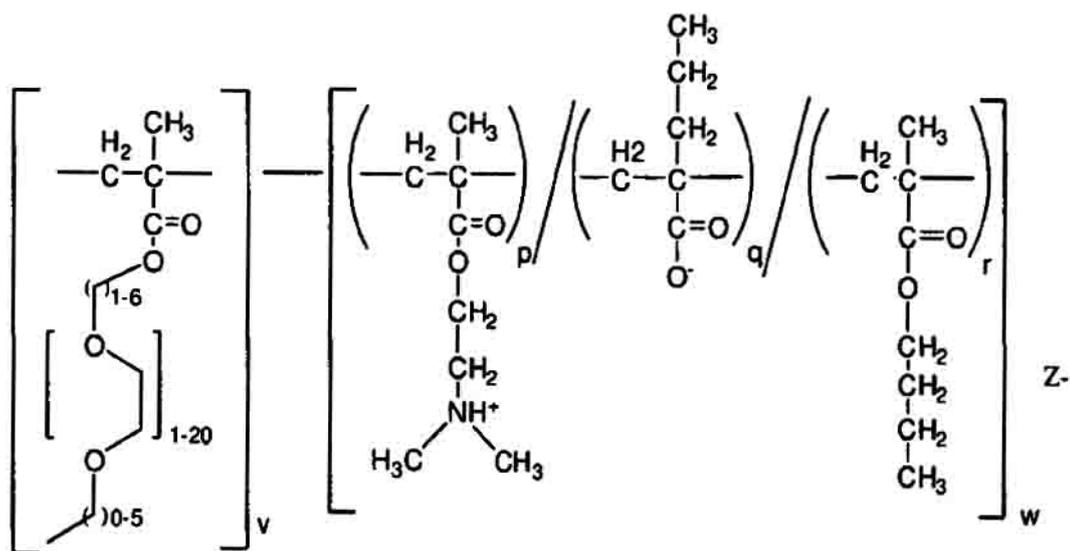


10 [0088] En algunos casos, las unidades constitutivas del compuesto 1 se muestran dentro del corchete a la izquierda y el paréntesis a la derecha y derivan de los monómeros:



15 [0089] Las letras p, q y r representan la fracción molar de cada unidad constitutiva dentro de su bloque. Las letras v y w representan el peso molecular (medio numérico) de cada bloque en el copolímero de dibloques.

[0090] En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto proporcionado en el presente documento que es un compuesto que tiene la estructura:

**IV2**

[0091] Como se ha discutido antes, las letras p, q y r representan la fracción molar de cada unidad constitutiva dentro de su bloque. Las letras v y w representan el peso molecular (medio numérico) de cada bloque en el copolímero de dibloques.

[0092] En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento los siguientes polímeros:

- [DMAEMA]_v-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV3**
 10 [PEGMA]_v-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV4**
 [PEGMA]_m-/DMAEMA_n]-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV5**
 [PEGMA]_m-/MAA(NHS)_n]-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV6**
 [DMAEMA]_m-/MAA(NHS)_n]-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV7**
 [HPMA]_m-/PDSM_n]-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV8**
 15 [PEGMA]_m-/PDSM_n]-[B_p-/P_q-/D_r]_w **IV9**

[0093] En algunas realizaciones, B es un resto metacrilato de butilo; P es un resto ácido propilacrílico; D y DMAEMA son restos de metacrilato de dimetilaminoetilo; PEGMA es un resto de metacrilato de polietilenglicol (p. ej., con 1-20 unidades de óxido de etileno, como se ilustra en el compuesto IV-2, o 4-5 unidades de óxido de etileno, o 7-8 unidades de óxido de etileno); MAA(NHS) es un resto de N-hidroxisuccinimida del ácido metacrílico; HPMA es un resto de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida; y PDSM es un resto de metacrilato-disulfuro de piridilo. En algunas realizaciones, los términos m, n, p, q, r, w y v son como se describen en el presente documento. En realizaciones específicas, w es de aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 5 veces v, o de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 5 veces v.

25

[0094] Los polímeros **IV1-IV9** son ejemplos de polímeros proporcionados en el presente documento, que comprenden una variedad de unidades constitutivas que componen el primer bloque de polímero. Además, los polímeros expuestos en las figuras y la tabla, así como los polímeros estructuralmente relacionados (tales como variaciones en PM y/o relaciones de restos monoméricos) se proporcionan específicamente para el presente documento. En algunas realizaciones, la unidad o unidades constitutivas del primer bloque se varían o se tratan químicamente con el fin de crear polímeros en los que el primer bloque es o comprende una unidad constitutiva que es neutra (p. ej., PEGMA), catiónica (p. ej., DMAEMA), aniónica (p. ej., PEGMA-NHS, en el que la NHS se hidroliza al ácido o ácido acrílico), anfóptica (p. ej., DMAEMA-NHS, en el que la NHS se hidroliza al ácido), o ion híbrido (por ejemplo, poli[fosfato de 2-metacrilatoiloxi-2'-trimetilamonioetilo]). En algunas realizaciones, los polímeros que comprenden el grupo funcional disulfuro de piridilo en el primer bloque, p. ej., [PEGMA-PDSM]-[B-P-D], se pueden hacer reaccionar y se hacen reaccionar opcionalmente con un ARNip tiolado para formar un conjugado de polímero-ARNip.

[0095] En algunas realizaciones, los polímeros de esta invención son "copolímeros de dibloques". El término "copolímero" significa que el polímero es el resultado de la polimerización de dos o más monómeros diferentes. En algunos casos, un copolímero de "bloques" se refiere a una estructura en la que se unen entre sí diferentes

40

subcombinaciones de unidades constitutivas. En algunos casos, un "bloque" se refiere a un segmento o porción de un polímero que tiene unas características particulares (p. ej., un segmento hidrófilo o un segmento hidrófobo de un copolímero de gradiente). En algunos casos, un copolímero de dibloques comprende solo dos bloques; una generalización esquemática de dicho polímero sería como: $[A_a B_b C_c \dots]_m - [X_x Y_y Z_z \dots]_n$, en el que cada letra indica una unidad constitutiva, cada subíndice de una unidad constitutiva representa la fracción molar de esa unidad en el bloque particular, los tres puntos indican que puede haber más (pero, por supuesto, también puede haber menos) unidades constitutivas en cada bloque, y m y n indican el peso molecular de cada bloque en el copolímero de dibloques. Como se sugiere en el esquema, el número y la naturaleza de cada unidad constitutiva se controla por separado para cada bloque. Se entenderá que el esquema no pretende y no se debe considerar que se deduce ninguna relación en absoluto entre el número de unidades constitutivas o el número de diferentes tipos de unidades constitutivas en cada uno de los bloques. Ni tampoco se pretende que describa el esquema ninguna disposición particular de las unidades constitutivas dentro de un bloque particular. Es decir, en cada bloque, las unidades constitutivas se pueden disponer de una forma puramente aleatoria, una configuración aleatoria alternante, una alternante regular, una de bloques regular o una de bloques aleatoria, salvo que se exponga expresamente otra cosa. Una configuración puramente aleatoria sería, por ejemplo: x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z... o y-z-x-y-z-y-z-x-x... Una configuración aleatoria alternante sería: x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z..., y una configuración alternante regular sería: x-y-z-x-y-z-x-y-z... Una configuración de bloques regular tiene la siguiente configuración general: ...x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x..., mientras que una configuración de bloques aleatoria tiene la configuración general: ...x-x-x-z-z-z-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z... En ninguno de los ejemplos genéricos precedentes hay una yuxtaposición particular de unidades o bloques constitutivos individuales o el número de unidades constitutivas en un bloque o el número de bloques indica ni debe considerarse de ninguna manera que afecte o limite a la estructura real de los copolímeros de dibloques de esta invención.

[0096] Se entiende además que los paréntesis que encierran las unidades constitutivas no significan y no debe considerarse que signifique que las propias unidades constitutivas forman bloques. Es decir, las unidades constitutivas dentro de los corchetes pueden combinarse de cualquier manera con las otras unidades constitutivas dentro del bloque, es decir, configuraciones puramente aleatoria, aleatoria alternante, alternante regular, de bloques regular o de bloques aleatoria. Por lo tanto, en el copolímero de dibloques 1, p, q y r representan la fracción molar de esa unidad constitutiva en el bloque y no se pretende, y no debe considerarse, que indica o sugiere que las unidades constitutivas dentro de los corchetes comprenden un bloque dentro de un bloque.

[0097] Por lo tanto, cuando se expone en el presente documento que una unidad constitutiva de carga neutra puede estar "intercalada de forma aleatoria" entre las primeras unidades constitutivas del primer bloque de un copolímero de dibloques de esta invención, significa que el primer bloque tendría una estructura genéricamente semejante a la descrita antes para una configuración puramente aleatoria.

[0098] En algunas realizaciones, la solubilidad de cualquiera de los copolímeros de bloques descritos en el presente documento en disolución o medio acuoso a aproximadamente pH neutro es mayor de 1 mg/ml, mayor de 5 mg/ml, mayor de 10 mg/ml, mayor de 25 mg/ml, mayor de 50 mg/ml, mayor de 100 mg/ml y mayor de 500 mg/ml. En algunas realizaciones, en particular para los polímeros de dibloques que tienen un primer bloque hidrófilo (p. ej., uno hidrófilo catiónico), las tres especies presentes en el bloque hidrófobo (aniónico, catiónico e hidrófobo) están presentes como un bloque del copolímero aleatorio, o de lo contrario están presentes en una secuencia intercalada de modo que el bloque es de carga neta aproximadamente neutra a lo largo de su longitud. En algunos casos, esta orientación proporciona mayor solubilidad del copolímero de bloques.

[0099] En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento los copolímeros de dibloques expuestos en la tabla 1; en algunos casos, dichos polímeros se usan como agentes de formación de complejos con polinucleótidos y soportes. Se entiende que las características de los copolímeros de dibloques descritos en la tabla 1 y en otra parte en el presente documento, serán traducibles a otros copolímeros de dibloques del presente documento de modo que, basándose en las descripciones del presente documento, los expertos en la materia serán capaces de preparar dichos copolímeros, que, por lo tanto, estarán dentro del alcance de esta invención.

[0100] Este primer bloque de copolímeros de dibloques de ejemplo está compuesto de restos monoméricos de metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), que se une y condensa eficazmente con ácidos nucleicos a pH fisiológico. El segundo bloque de un polímero de ejemplo descrito en el presente documento contiene restos monoméricos de DMAEMA como una unidad constitutiva catiónica; restos monoméricos de ácido propilacrilico (PAA) como una unidad constitutiva aniónica y, debido al sustituyente propilo hidrófobo, un contribuyente al resto potenciador de la hidrofobicidad; y restos monoméricos de metilacrilato de butilo (BMA) como una unidad constitutiva separada, que constituye o comprende un resto potenciador de la hidrofobicidad. En algunos casos, el segundo bloque permite el escape endosómico del ácido nucleico unido por un cambio conformacional inducido por el pH que, en algunos casos, produce la desestabilización de la membrana. En algunos casos, en condiciones fisiológicas, el segundo bloque o bloque central hidrófobo tiene tanto restos positivos (p. ej. DMAEMA protonado) como negativos (p. ej., PAA desprotonado) en cantidades similares, dando como resultado una neutralidad de carga

aproximada y estabilización de carga del centro por la formación de pares iónicos. En algunos casos, tras la absorción de una composición de polímero-ácido nucleico descrita en el presente documento en los compartimentos endosómicos de la célula, el pH menor del entorno endosómico hace que los restos aniónicos de la tercera unidad constitutiva (p. ej., grupos carboxilato) se conviertan en protonados y por lo tanto alteren la membrana. En algunos 5 casos, la protonación o neutralización de algunos o todos los restos aniónicos produce la neutralización de carga de los restos ácidos de PAA y, en determinados casos, un cambio conformacional en el polímero a una forma hidrófoba desestabilizadora de la membrana.

Tabla 1. Pesos moleculares, polidispersidades y composiciones de monómeros para el macroCTA poli(DMAEMA), los copolímeros de dibloques resultantes y su nomenclatura correspondiente.

Polímero	M _n ^a 1 ^{er} bloque (g/mol)	M _n ^a 2 ^o bloque (g/mol)	PDI ^a	% Teórico de BMA 2 ^o bloque	% Teórico de PAA 2 ^o bloque	% Teórico de DMAEMA 2 ^o bloque	% Experimental de BMA 2 ^o bloque	% Experimental de PAA 2 ^o bloque	% Experimental de DMAEMA 2 ^o bloque
mCTA	9100	-	1,16	-	-	-	-	-	-
P1	9100	6900	1,58	0	50	50	-	47	53
P2	9100	8900	1,56	5	47,5	47,5	1	48	51
P3	9100	8300	1,54	10	45	45	12	40	48
P4	9100	9300	1,46	15	42,5	42,5	19	44	37
P5	9100	10100	1,51	20	40	40	24	40	36
P6	9100	10000	1,48	30	35	35	27	37	36
P7	9100	11300	1,45	40	30	30	48	29	23

^aDeterminado por columnas de SEC Tosoh TSK-GEL R-3000 y R-4000 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) conectadas en serie a Viscotek GPCmax VE2001 y refractómetro VE3580 (Viscotek, Houston, TX). Se usó DMF de calidad para HPLC que contiene 0,1% en peso de LiBr como fase móvil. Los pesos moleculares de los copolímeros sintetizados se determinaron usando una serie de referencias de poli(metacrilato de metilo).

^bDeterminado por espectroscopia de RMN ¹H (3% en peso en CDCl₃; Bruker DRX 499)

[0101] El poli(DMAEMA) y otras entidades poliméricas usadas en el presente documento (p. ej., copolímeros o bloques de copolímeros de BMA, DMAEMA y PAA) se preparan de una forma adecuada. En un caso, el poli(DMAEMA) se preparó por polimerización del DMAEMA en presencia del CTA de RAFT, ECT, y un iniciador de radicales. En algunos casos, se usó un bloque, poli(DMAEM) (9.100 g/mol; DP 58), para preparar una serie de copolímeros de dibloques en la que el contenido de BMA se aumentó y se mantuvieron cantidades equimolares de DMAEMA y PAA. Las características de los polímeros resultantes se muestran en la tabla 1. Se observaron tamaños de bloques similares para los siete dibloques dando los polímeros un peso molecular total de aproximadamente 20.000 g/mol. En algunas realizaciones, se eligen pesos moleculares menores. En algunos casos, los polímeros de peso molecular menor minimizan la toxicidad del polímero y permiten la eliminación renal de los polímeros con el fin de asegurar que sea trasladable a ensayos in vivo. También se muestran en la tabla 1 las composiciones de monómeros del segundo bloque obtenidas teórica y experimentalmente. Cada polímero listado es un ejemplo de una clase de polímeros relacionados. Por ejemplo, los polímeros de la clase P7 tienen varias versiones, una de las cuales se caracteriza en la tabla 1. Aunque todos los polímeros están relativamente cerca de la composición teórica, se observa alguna desviación en todos los casos y es probable que se deba a diferencias en las relaciones de reactividad de los monómeros.

[0102] Alternativamente, la orientación de los bloques en el polímero de dibloques se invierte, de modo que el extremo ω del polímero es el bloque hidrófilo. En varias realizaciones, esto se logra de cualquier forma adecuada, incluyendo una serie de modos sintéticos. Por ejemplo, la síntesis de los copolímeros de bloques de la presente invención empieza con la preparación del bloque hidrófobo PAA/BMA/DMAEMA, y el bloque cargado, hidrófilo, se añade en la segunda etapa sintética sometiendo el macroCTA PAA/BMA/DMAEMA resultante a una segunda etapa de polimerización por RAFT. Procedimientos alternativos incluyen reducir el macroCTA PAA/BMA/DMAEMA para formar un extremo de tiol y después unir de forma covalente un polímero cargado, hidrófilo previamente formado, al tiol formado. Este procedimiento sintético proporciona un procedimiento para introducir un grupo reactivo en el extremo ω del extremo hidrófilo de la cadena polimérica proporcionando así procedimientos alternativos a la conjugación química al polímero.

[0103] El copolímero de dibloques P7, un ejemplo de un polímero de la presente invención, consiste en dos bloques; uno es poli(DMAEMA), que es hidrófilo y está cargado a pH fisiológico, y el otro bloque es un copolímero aleatorio de unidades de monómero: unidades hidrófobas (BMA) e ionizadas/hidrófobas o ionizables/hidrófobas (PAA, DMAEMA).

Definiciones y realizaciones

[0104] Se entiende que, con relación a esta solicitud, el uso del singular incluye el plural y viceversa salvo que se exponga expresamente otra cosa. Es decir, "un/una" y "el/la" se refieren a uno o más de lo que modifique la palabra. Por ejemplo, "el polímero" o "un nucleótido" se pueden referir a un polímero o nucleótido o a una pluralidad de polímeros o nucleótidos. Por la misma razón, "polímeros" y "nucleótidos" se referirían a un polímero o un nucleótido así como a una pluralidad de polímeros o nucleótidos salvo que, de nuevo, se exponga expresamente o sea obvio por el contexto que no se pretende.

[0105] Como ejemplo específico no limitante de esta invención, el segundo bloque de un copolímero de dibloques de esta invención, que contiene tanto especie catiónica como aniónica a pH fisiológico normal, se describe como que es "sustancialmente neutra en la carga total" y sustancialmente hidrófoba. Sin embargo, experimentalmente es extremadamente difícil lograr la neutralidad exacta, y puede predominar la especie catiónica o la aniónica en alguna medida como se ilustra en la tabla 1. Sin embargo, un experto en la materia aceptará que un segundo bloque con un ligero exceso de una o la otra especie cargada todavía es "sustancialmente neutro".

[0106] Como se usa en el presente documento, un "polímero" se refiere a una molécula compuesta de una o más moléculas más pequeñas llamadas "monómeros". Un monómero puede reaccionar consigo mismo para crear un homopolímero o puede reaccionar con uno o más monómeros distintos para crear copolímeros. Se pueden hacer reaccionar grupos de monómeros para formar "prepolímeros", los cuales después se combinan para formar el polímero. Los monómeros comprenden las "unidades constitutivas" del polímero.

[0107] Una unidad constitutiva de "carga neutra" o "no cargada" se refiere a una en la que ningún átomo lleva una carga positiva o negativa completa a pH fisiológico, es decir, las moléculas dipolares todavía se consideran de "carga neutra" o "no cargadas". Un ejemplo no limitante de una unidad constitutiva de carga neutra sería la derivada del metacrilato de butilo, el monómero $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$.

[0108] Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo (solo carbono e hidrógeno), totalmente saturado (sin dobles ni triples enlaces), de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitar, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, butilo terciario, pentilo y hexilo. Como se usa en el presente documento, "alquilo" incluye grupos "alquilenos", que se refieren a grupos hidrocarburo totalmente saturados, lineales o ramificados, que tienen dos en lugar de una valencia abierta para la unión a otros grupos. Los ejemplos de grupos alquilenos incluyen, pero sin limitar, metileno, $-\text{CH}_2-$, etileno, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, propileno, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n-butileno, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, sec-butileno, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ y similares. Un grupo alquilo de esta invención puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor.

10

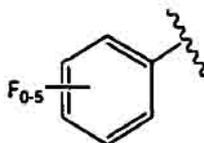
[0109] Como se usa en el presente documento, "de mC a nC" en el que m y n son números enteros, se refiere al número de átomos de carbono posibles en el grupo indicado. Es decir, el grupo puede contener de "m" a "n", inclusive, átomos de carbono. Un grupo alquilo de esta invención puede comprender de 1 a 10 átomos de carbono, es decir, m es 1 y n es 10. Por supuesto, un grupo alquilo particular puede estar más limitado. Por ejemplo, sin limitación, un grupo alquilo de esta invención puede consistir en 3 a 8 átomos de carbono, en cuyo caso se designará como un grupo alquilo (3C-8C). Los números son inclusivos e incorporan todas las estructuras de cadena lineal o ramificada que tienen el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, sin limitación, un grupo "alquilo C₁ a C₄" se refiere a todos los grupos alquilo que tienen de 1 a 4 carbonos, es decir, CH_3- , CH_3CH_2- , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ y $(\text{CH}_3)_3\text{CH}-$.

20

[0110] Como se usa en el presente documento, un grupo cicloalquilo se refiere a un grupo alquilo en el que los átomos de carbono de los extremos de la cadena de alquilo están unidos covalentemente entre sí. Los números "m" y "n" se refieren al número de átomos de carbono en el anillo formado. Así por ejemplo, un grupo cicloalquilo (3C-8C) se refiere a un anillo de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 miembros, es decir, ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano. Un grupo cicloalquilo de esta invención puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor y/o uno o más grupos alquilo.

25

[0111] Como se usa en el presente documento, "fenilo" se refiere sencillamente a un grupo



30

que, como se muestra, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor.

[0112] Como se usa en el presente documento, un "resto potenciador de la hidrofobicidad" se usa de forma intercambiable en el presente documento con una "especie hidrófoba" y se refiere a un sustituyente unido covalentemente a una unidad constitutiva de un copolímero de dibloques, llevando dichas unidades constitutivas dichos restos potenciadores de la hidrofobicidad, que dan como resultado que el copolímero de dibloques sea más alterador de la membrana o más desestabilizador de la membrana de otra forma, de lo que lo sería sin la adición del resto. Los ejemplos de dichos restos incluyen, sin limitación, grupos alquilo, grupos cicloalquilo y grupos fenilo, cualquiera de los cuales puede estar sustituido con uno o más átomos de flúor. En algunas realizaciones, un resto potenciador de la hidrofobicidad tiene un valor n de aproximadamente 1 o más. Un valor π de un compuesto es una medida de su valor hidrófilo-lipófilo relativo (véase, p. ej., Cates, L.A., "Calculation of Drug Solubilities by Pharmacy Students" *Am. J. Pharm. Educ.* 45:11-13 (1981)). Los restos monoméricos hidrófobos o unidades constitutivas descritas en el presente documento comprenden una o más especies hidrófobas. Además, los restos monoméricos hidrófilos comprenden una o más especies hidrófilas.

45

[0113] Con relación al polímero de ejemplo no limitante de esta invención IV₁ mostrado antes, dicho polímero se caracterizaría por ser "etilénico" en cuanto que las unidades constitutivas derivan de la reacción de un grupo funcional etileno, $-\text{C}=\text{C}-$ de cada uno de los monómeros. Los monómeros etilénicos particulares del ejemplo anterior se pueden describir además como que son "acrílicos" en cuanto que derivan todos del ácido acrílico $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{OH}$, siendo el primer monómero anterior el metacrilato de dimetilaminoetilo, siendo el segundo el ácido 2-propilacrilico y siendo el tercero el metacrilato de butilo.

50

[0114] Como se usa en el presente documento, "pH fisiológico normal" se refiere al pH de los fluidos

predominantes del cuerpo de un mamífero, tales como la sangre, suero, el citosol de las células normales, etc. Además, como se usa en el presente documento, "pH fisiológico normal", usado de forma intercambiable con "pH aproximadamente fisiológico" o "pH aproximadamente neutro" en general se refiere a un pH aproximadamente neutro (es decir, aproximadamente pH 7), incluyendo, p. ej., un pH que es de aproximadamente 7,2 a 5 aproximadamente 7,4. En casos específicos, un "pH fisiológico normal" se refiere a un pH que es aproximadamente neutro en un medio acuoso, tal como la sangre, suero o similar.

[0115] Como se usa en el presente documento, ARN se refiere a un polinucleótido que comprende los nucleótidos A, C, G o U y ADN se refiere a un polinucleótido que comprende dA, dC, dG y dT, indicando la "d" que el azúcar es desoxirribosa. 10

[0116] Como se usa en el presente documento, un "análogo de ADN natural" o un "análogo de ARN natural", es un polinucleótido en el que uno o más nucleótidos naturales se sustituyen por los nucleótidos naturales de un ADN o ARN particular, pero que todavía presenta la funcionalidad del ADN o ARN original. Esto incluye un nucleótido 15 natural en un entorno no natural, p. ej., un desoxirribonucleótido sustituido por un ribonucleótido en una molécula de ADN o un ribonucleótido sustituido por un desoxirribonucleótido en una molécula de ARN.

[0117] Como se usa en el presente documento, un "análogo de ADN sintético" o un "análogo de ARN sintético" se refiere a un polinucleótido compuesto de uno o más nucleótidos modificados. Un "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido no natural que comprende una base, azúcar y/o enlace fosfodiéster químicamente alterados. La alteración química puede implicar adición, eliminación o sustitución de átomos individuales de un nucleótido natural, o la adición, eliminación o sustitución de grupos funcionales enteros del nucleótido. Para los propósitos de esta invención, un nucleótido modificado puede comprender realmente una molécula que se parece poco a un nucleótido natural, si es que se parece, pero no obstante es capaz de ser incorporada en un polinucleótido que tiene la 20 estructura genérica descrita antes. Una propiedad de un análogo de ADN o ARN sintético que típicamente se mantiene, es que la molécula en general tiene carga negativa, como la tienen todos los polinucleótidos naturales, y por lo tanto puede formar complejo con un copolímero de dibloques de esta invención. 25

[0118] Sin estar limitado por la teoría no citada expresamente en las reivindicaciones, un polímero desestabilizador de la membrana puede producir un cambio (p. ej., un cambio de permeabilidad) directa o indirectamente en una estructura de membrana celular (p. ej., una membrana endosómica) para así permitir que un agente (p. ej., polinucleótido), asociado con o independiente de un polímero, pase a través de dicha estructura de membrana, por ejemplo, entre en una célula o salga de una vesícula celular (p. ej., un endosoma). Un polímero desestabilizador de la membrana puede ser (pero no es necesariamente) un polímero alterador de la membrana. Un polímero alterador de 30 de la membrana puede producir directa o indirectamente la lisis de una vesícula celular o la alteración de una membrana celular (p. ej., como se observa para una fracción sustancial de una población de membranas celulares). 35

[0119] En general, las propiedades de los polímeros desestabilizadores de la membrana o alteradoras de la membrana se pueden evaluar por diferentes medios. En un procedimiento no limitante, se puede observar un cambio en una estructura de la membrana celular mediante evaluación en ensayos que miden (directa o indirectamente) la liberación de un agente (p. ej., polinucleótido) de las membranas celulares (p. ej., membranas endosómicas), por ejemplo, determinando la presencia o ausencia de dicho agente, o una actividad de dicho agente, en un entorno externo a dicha membrana. Otro procedimiento no limitante implica medir la lisis de glóbulos rojos (hemólisis), p. ej., como un ensayo equivalente para una membrana celular de interés. Dichos ensayos se pueden 40 hacer a un solo valor de pH o a lo largo de un intervalo de valores de pH. 45

[0120] Se prefiere que un copolímero de dibloques proporcionado en el presente documento sea biocompatible. Como se usa en el presente documento, "biocompatible" se refiere a una propiedad de un polímero caracterizado porque su o sus productos de degradación in vivo no son dañinos o al menos son mínimamente y/o de forma 50 reparables dañinos para el tejido vivo; y/o al menos causan, mínimamente y de forma controlable, una reacción inmunológica en el tejido vivo. En relación con las sales, se prefiere en este momento que tanto la especie catiónica como la aniónica sean biocompatibles. Como se usa en el presente documento, "fisiológicamente aceptable" es intercambiable con biocompatible.

[0121] En algunos aspectos, las composiciones y/o los agentes descritos en el presente documento se usan como agentes terapéuticos in vivo. Por "in vivo" se entiende que se pretenden administrar a sujetos que necesiten dicha terapia. "Sujetos" se refiere a cualquier entidad viva que pueda beneficiarse del tratamiento usando los complejos de esta invención. Como se usa en el presente documento, "sujeto" y "paciente" se pueden usar de forma intercambiable. Un sujeto o paciente se refiere en particular a un mamífero tal como, sin limitación, gato, perro, 55

caballo, vaca, oveja, conejo, etc., y preferiblemente en este momento, un ser humano.

[0122] Como se usa en el presente documento, "agente terapéutico" se refiere a un complejo del presente documento que, cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que padece una enfermedad, tiene un efecto beneficioso terapéutico sobre la salud y el bienestar del sujeto. Un efecto beneficioso terapéutico sobre la salud y el bienestar del sujeto incluye, pero sin limitar: (1) curar la enfermedad; (2) ralentizar el avance de la enfermedad; (3) hacer que la enfermedad retroceda; o, (4) aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico también incluye cualquier complejo del presente documento que cuando se administra a un paciente, que se sabe o se sospecha que es particularmente susceptible a una enfermedad, en particular en este momento una enfermedad genética, tiene un efecto beneficioso profiláctico sobre la salud y el bienestar del paciente. Un efecto beneficioso profiláctico sobre la salud y el bienestar de un paciente incluye, pero sin limitar: (1) prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad en primer lugar; (2) mantener una enfermedad en un nivel retrocedido una vez que se ha alcanzado dicho nivel, mediante una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo; o (3) prevenir o retrasar la recaída de la enfermedad después de concluir un tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo. En algunos casos, un agente terapéutico es un polinucleótido terapéuticamente eficaz (p. ej., un polinucleótido de ARNi), un péptido terapéuticamente eficaz, un polipéptido terapéuticamente eficaz, o alguna otra biomolécula terapéuticamente eficaz. En realizaciones específicas, un polinucleótido de ARNi es un polinucleótido que puede mediar la inhibición de la expresión génica por un mecanismo del ARNi e incluye, pero sin limitar, ARN mensajero (ARNm), ARNip, microARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), ARN interferente asimétrico (ARNia), sustrato de Dicer y precursores de los mismos.

[0123] Como se usa en el presente documento, la "polimerización viva" se refiere a un procedimiento de síntesis de polímeros usando el concepto bien conocido de polimerización por adición, es decir, la polimerización en la que se añaden monómeros uno a uno a un sitio activo en la cadena de polímero en crecimiento, pero una en la que los sitios activos para continuar la adición de otro monómero nunca se eliminan completamente, salvo a propósito. Es decir, la cadena de polímero es prácticamente siempre capaz de más extensión por la adición de más monómero a la mezcla de reacción, salvo que el polímero se haya rematado, lo cual puede ser reversible para así permitir que la polimerización continúe o inactivarla, lo cual normalmente es permanente. Aunque se conocen numerosos géneros de polimerizaciones vivas, actualmente los tipos predominantes son polimerizaciones vivas aniónicas, catiónicas y radicalicas. De estas, en este momento la polimerización radicalica es de particular interés en relación con esta invención. La polimerización radicalica implica un iniciador de radicales libres que extrae uno de los electrones pi del doble enlace de un monómero etilénico dando como resultado un electrón desapareado reactivo en el carbono al otro extremo del doble enlace mencionado con respecto al que reacciona con el iniciador. El electrón desapareado reacciona entonces con el doble enlace de otro monómero creando un enlace sigma estable y otro radical libre, y así sucesivamente. Con iniciadores convencionales, la secuencia finalmente se detiene por una reacción de terminación, en general una reacción de combinación en la que los electrones desapareados de dos cadenas que se propagan se combinan para formar un enlace sigma estable o una desproporción en la que un radical en una cadena activa quita un átomo de hidrógeno de otra cadena activa o de una impureza en la mezcla de reacción, para producir una molécula estable no reactiva y una molécula que contiene un doble enlace. En una polimerización viva, la capacidad de las cadenas en crecimiento para entrar en una reacción de terminación se elimina limitando en la práctica la polimerización solo por la cantidad de monómero presente; es decir, la polimerización continúa hasta que se ha agotado el suministro de monómero. En este punto, la especie radical libre que queda se hace sustancialmente menos activa debido al remate del grupo terminal radical libre con entidades tales como, sin limitación, radicales nitroxilo, moléculas de halógeno, especies de oxígeno tales como peróxido y metales o simplemente por interacción con disolvente y similares. Sin embargo, si se añade más monómero a la disolución, se puede reanudar la reacción de polimerización excepto como se ha indicado antes.

Síntesis

[0124] Los polímeros descritos en el presente documento se pueden preparar de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, en algunas realizaciones se prefiere en particular en este momento que los polímeros de esta invención, aunque no están limitados de ninguna forma a especies etilénicas con respecto a dichos polímeros, se preparen por "polimerización viva".

[0125] Usando la polimerización viva, se pueden obtener polímeros de polidispersidad o diferencias en la longitud de la cadena muy pequeñas. La polidispersidad normalmente se mide dividiendo el peso molecular medio ponderado de las cadenas de polímero entre su peso molecular medio numérico. El peso molecular medio numérico es la suma de los pesos moleculares de las cadenas individuales dividido entre el número de cadenas. El peso molecular medio ponderado es proporcional al cuadrado del peso molecular dividido entre el número de moléculas

de este peso molecular. Puesto que el peso molecular medio ponderado es siempre mayor que el peso molecular medio numérico, la polidispersidad es siempre mayor o igual a 1. A medida que los números se aproximan más y más a ser el mismo, es decir, la polidispersidad se acerca al valor de 1, el polímero se acerca más a ser monodisperso, en el que cada cadena tiene exactamente el mismo número de unidades constitutivas. Los valores de polidispersidad que se acercan a 1 se pueden conseguir usando la polimerización viva radicalica. Los procedimientos para determinar la polidispersidad tales como, sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño molecular, dispersión dinámica de luz, cromatografía con ionización/desorción por láser asistida por matriz y cromatografía de masas por electropulverización, son bien conocidos en la materia y no se describirán con más detalle en el presente documento.

10

[0126] La transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible o RAFT es una técnica de polimerización viva actualmente preferida para usar en la síntesis del polímero de cadena principal etilénica de esta invención. La RAFT es bien conocida para los expertos en la materia y se describirá solo brevemente en el presente documento. La RAFT comprende un procedimiento de transferencia de cadena degenerativa por radicales libres. La mayoría de los procedimientos de RAFT usan compuestos de tiocarbonyl tales como, sin limitación, ditiocésteres, ditiocarbamatos, tritiocarbonatos y xantatos para mediar la polimerización por un mecanismo de transferencia de cadena reversible. La reacción de un radical polimérico con el grupo C=S de cualquiera de los compuestos precedentes conduce a la formación de radicales intermedios estabilizados. Estos radicales intermedios estabilizados no sufren las reacciones de terminación típicas de la polimerización radicalica estándar sino que, en su lugar, reintroducen un radical capaz de reiniciación o propagación con monómero, volviendo a formar el enlace C=S en el procedimiento. Este ciclo de adición al enlace C=S seguido de fragmentación del radical resultante continua hasta que se han consumido todos los monómeros o se inactiva la reacción. La baja concentración de radicales activos en cualquier momento particular limita las reacciones de terminación normales. En otras realizaciones, los polímeros se sintetizan por diseño macromolecular por transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible de xantatos (MADIX) (Direct Synthesis of Double Hydrophilic Statistical Di- and Triblock Copolymers Comprised of Acrylamide and Acrylic Acid Units via the MADIX Process", Daniel Taton, y col., *Macromolecular Rapid Communications*, 22, No. 18, 1497-1503 (2001)).

Polímero: construcciones de biomoléculas

30

[0127] En algunas realizaciones del presente documento se proporcionan construcciones de polímero:polinucleótido, u otras construcciones incluyendo, p. ej., construcciones de polímero:péptido, construcciones de polímero:polipéptido, u otros tipos de construcciones de polímero:biomolécula. En algunas realizaciones, se asocian uno o más polinucleótidos (p. ej., ARNip) con cualquier polímero descrito en el presente documento. En diferentes realizaciones, se conjugan polinucleótidos, péptidos, polipéptidos u otras biomoléculas con el polímero de cualquier forma adecuada (p. ej., por interacciones covalentes y/o no covalentes), y dicha conjugación es en cualquier posición adecuada, p. ej., en el extremo alfa del polímero, el extremo omega del polímero, el extremo hidrófilo del polímero, el extremo hidrófobo del polímero, o en un grupo colgante unido a una cadena lateral del monómero del polímero.

40

[0128] Como se usa en el presente documento, un polinucleótido se refiere a un miembro del género de moléculas de polímero orgánicas compuestas de una cadena lineal de monómeros nucleótidos unidos covalentemente en una cadena, que son bien conocidas en la materia. Brevemente, un nucleótido comprende un nucleósido que está unido a un solo grupo fosfato (o, por convenio, cuando se refiere a su incorporación a un polinucleótido, una forma abreviada para un trifosfato de nucleósido, que es la especie que realmente da la polimerización en presencia de una polimerasa). Un nucleósido, a su vez, comprende una base unida a un resto de azúcar. Para los polinucleótidos naturales, es decir, los polinucleótidos producidos por entidades vivas no modificadas, el resto de azúcar es ribosa, que da lugar a los ácidos ribonucleicos o ARN, o desoxirribosa, que da lugar a los ácidos desoxirribonucleicos o ADN. Las bases naturales son adenina (A), guanina (G) o su sustituto natural inosina (I), citosina (C) o timina (T) o su sustituto natural uracilo (U). Un polinucleótido comprende entonces una pluralidad de nucleósidos conectados por un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-hidroxilo del resto de azúcar de un nucleósido y el 5'-hidroxilo del resto de azúcar de un segundo nucleósido que a su vez está unido por su 3'-hidroxilo al 5'- de otro nucleósido más y así sucesivamente.

55

[0129] Un ADN o un ARN puede ser de sentido directo o sentido contrario. El ADN es bicatenario, siendo una cadena la cadena de sentido directo y siendo la otra su complementaria o cadena de sentido contrario. La cadena de sentido directo se caracteriza por el hecho de que una versión de ARN de la misma secuencia se puede traducir en una proteína. La cadena de sentido contrario no puede participar en la misma secuencia. La consecuencia de esto es que la producción de proteína por un ADN particular o su ARN mensajero se puede interrumpir introduciendo un

polinucleótido complementario o de sentido contrario en la etapa adecuada de la producción de proteína.

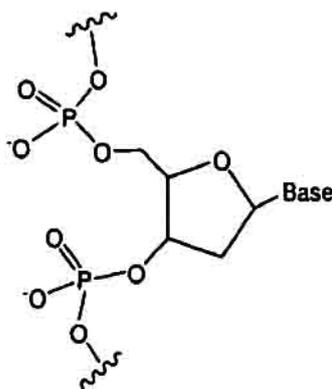
[0130] Brevemente, la producción de proteína se produce en dos fases, transcripción y traducción. En la transcripción se usa el ADN como molde para crear el ARN mensajero o ARNm. En la fase de traducción, el ARNm
5 viaja a una región de la célula en la que comunica el mensaje genético proporcionado por el ADN al ribosoma, que es la maquinaria celular que realmente ensambla la proteína codificada por el ADN. Un polinucleótido de sentido contrario, que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la de un ARNm puede unirse o hibridar con el ARNm y posteriormente el ARNm hibridado es degradado por uno o más mecanismos bioquímicos, previniendo de esta forma que las instrucciones del ARNm lleguen al ribosoma. Actualmente se prefiere que un
10 polinucleótido sea un ARN.

[0131] El ARN puede ser ARNm de sentido directo o de sentido contrario, micro o miARN o ARN interferente pequeño, ARNip. El ARNm se ha discutido antes. Los miARN son moléculas de ARN monocatenarias de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Su función es regular la expresión de genes. Los miARN son
15 codificados por genes que son transcritos del ADN pero no son traducidos en proteína. En su lugar, son procesados desde transcritos primarios conocidos como pri-miARN a estructuras de tallo-bucle cortas llamadas pre-miARN y finalmente a miARN funcional. Los miARN funcionales son parcialmente complementarios a uno o más ARN. Como tales actúan como los polinucleótidos de sentido contrario discutidos antes y previenen que las instrucciones de los ARNm lleguen al ribosoma. Por lo tanto son capaces de regular por disminución la expresión de genes.

[0132] Mientras que los miARN son transcritos desde el propio genoma, los ARNip, ARN interferentes pequeños o interferentes cortos, no lo son. Los ARNip desde su descubrimiento en 1999, se han convertido en uno de los polinucleótidos más estudiados en el arsenal de los biólogos moleculares y actualmente se considera un candidato principal para la siguiente generación de fármacos, puesto que potencialmente son capaces de silenciar la expresión
25 de casi cualquier gen. Para los propósitos de esta invención, cualquier ARNip actualmente conocido o que se pueda conocer en el futuro, se puede usar para formar complejos de esta invención, con los copolímeros de dibloques del presente documento y de esta forma puede ser transportado al interior de las células vivas para propósitos, sin limitación, terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Inicialmente se pensó que los ARNip añadidos de forma exógena tenían que ser de una longitud específica (21-23 pb) con extremos salientes de 2 bases muy específicos
30 para ser activos como ARNip, pero ahora está claro que los ARN de extremos romos más largos o más cortos, así como los de 27+pb son igualmente eficaces en la silenciamiento de genes en células de mamíferos. Los ARNip más cortos se pueden cargar directamente en el complejo silenciador inducido por el ARN (RISC), mientras que los ARN bicatenarios más largos pueden ser escindidos por la endonucleasa del multidominio citoplasmático Dicer, en ARNip más cortos en el citoplasma. En resumen, el ARN bicatenario largo entra en el citoplasma de una célula. El ARN bicatenario largo es procesado en ARNip de 20 a 25 nucleótidos por una enzima de tipo RNasa III llamada Dicer. Después, el ARNip es ensamblado en los complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejo silenciador inducido por ARN o RISC. Después de integración en el RISC, la cadena de sentido directo del ARNip bicatenario es desenrolla y/o escinde dando la cadena de ARNip de sentido contrario que guía al RISC a una molécula de ARNm complementaria. El ARNip entonces se une al ARNm complementario y una vez unido, el RISC
40 escinde el ARNm diana, silenciando eficazmente el gen asociado con este ARN. Otro subgénero de polinucleótidos que pueden formar complejos con copolímeros de dibloques de esta invención y de esta forma ser transportados a células vivas son los llamados polinucleótidos de "ácido nucleico bloqueado" o LNA. Los polinucleótidos de ácido nucleico bloqueado se pueden preparar por una serie de mecanismos, uno de los cuales es la formación de un enlace metileno del 2'-oxígeno al 4'-carbono en el resto de azúcar de un nucleósido; sin embargo, el uso de cualquier polinucleótido de ácido nucleico bloqueado está dentro del alcance de la invención. Una característica de los LNA es su estabilidad térmica potenciada cuando hibridan con ADN o ARN complementarios comparado con dúplex de ADN:ADN o ADN:ARN no modificados, así como su reconocimiento de ácido nucleico potenciado. Estas propiedades hacen que los polinucleótidos LNA sean potencialmente útiles en un huésped de aplicación molecular. Por ejemplo, una comparación de una construcción de LNA-ADN-LNA con ARNip, fosforotioato y construcciones de
50 2'-O-metil-ARN-ADN contra la expresión del receptor vainilloide de subtipo 1 (VR1) en células Cos-7, puso de manifiesto que mientras que los ARNip eran los agentes de sentido contrario más potentes contra la expresión de VR1, la construcción de LNA-ADN-LNA era 175 y 550 veces más potente en la supresión de VR1 que oligonucleótidos 2'-O-metilo y fosforotioato de igual secuencia. Grunweller, A., y col., 2003, *NAR*, 31:2185-3193.

[0133] Un aspecto de esta invención es un polinucleótido o una pluralidad de polinucleótidos que están unidos o asociados (p. ej., de una forma covalente y/o no covalente, incluyendo interacciones iónicas, interacciones de enlaces de hidrógeno y/o interacciones de van der Waals) con cualquier polímero descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la asociación entre el polímero y el polinucleótido se logra con enlaces covalentes, interacciones no covalentes o combinaciones de los mismos. En realizaciones específicas, se usan

asociaciones no covalentes del polímero (p. ej., del primer bloque del mismo) con el polinucleótido. Las interacciones no covalentes incluyen, sin limitación, interacciones iónicas, enlace de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, pero para el propósito de la presente invención, la interacción no covalente comprende interacciones iónicas. La interacción iónica surge entre la unidad constitutiva catiónica de un polímero (p. ej., del primer bloque del mismo) y el



[0134] La asociación no covalente se puede lograr por varios procedimientos adicionales. Los polinucleótidos y/o el polímero se pueden modificar con restos químicos que los lleva a tener una afinidad entre sí, tal como un enlace, ácido arilborónico-ácido salicilhidroxámico, cremallera de leucina u otros restos peptídicos, interacciones iónicas entre cargas positivas y negativas en el polímero y polinucleótido, u otros tipos de enlaces de afinidad química no covalentes. Además, un polinucleótido bicatenario puede formar complejo con un polímero de la presente invención, formando un polímero con una unión al surco menor o un agente intercalante unido covalentemente al polímero.

[0135] En algunas realizaciones, el polinucleótido se puede conjugar químicamente al polímero por cualquier técnica de conjugación química estándar. El enlace covalente entre el polímero y el polinucleótido puede ser no escindible o se pueden usar enlaces escindibles. Los enlaces escindibles particularmente preferidos son enlaces disulfuro que se disocian en el entorno reducido del citoplasma. La asociación covalente se logra por métodos de conjugación química, incluyendo, pero sin limitar, conectores de amina-carboxilo, conectores de amina-sulfhidrilo, conectores de amina-hidrato de carbono, conectores de amina-hidroxilo, conectores de amina-amina, conectores de carboxilo-sulfhidrilo, conectores de carboxilo-hidrato de carbono, conectores de carboxilo-hidroxilo, conectores de carboxilo-carboxilo, conectores sulfhidrilo-hidrato de carbono, conectores de sulfhidrilo-hidroxilo, conectores de sulfhidrilo-sulfhidrilo, conectores de hidrato de carbono-hidroxilo, conectores de hidrato de carbono-hidrato de carbono y conectores de hidroxilo-hidroxilo. La conjugación también se puede realizar con enlaces sensibles al pH y conectores, incluyendo, pero sin limitar, enlaces hidrazona y de acetal. Hay establecida en la materia una gran variedad de procedimientos químicos de conjugación (véase, por ejemplo, *Bioconjugation*, Aslam y Dent, Eds, Macmillan, 1998 y capítulos de los mismos). Los polinucleótidos se pueden conjugar a los extremos alfa u omega del polímero, o a los grupos colgantes de los monómeros del polímero.

[0136] Una serie de polímeros y sus respectivas partículas condensadas a ARNip se caracterizan por el tamaño y la carga superficial, y los datos resultantes se muestran en la tabla 2.

[0137] En algunos casos, los polímeros aparecen uniméricos (<10 nm) en disolución. Los complejos formados a partir de polímeros y ARNip con una relación de cargas teórica de 4:1 tienen tamaños en el intervalo de 85-236 nm. Parecía que no había una tendencia definitiva de los tamaños de los complejos con respecto al contenido de BMA. Sin embargo, el polímero P7 con un contenido de 48% de BMA en el bloque endosomolítico presentaba el menor tamaño de partículas de 85 nm \pm 0,20. El resto de las partículas tienen tamaños de 144 a 236 nm, donde las partículas de mayor tamaño se forman a partir del polímero 6 que tenía un contenido de BMA de 27% en el bloque endosomolítico. Las partículas de polímero P7/ARNip se examinaron además con relaciones de cargas en el intervalo de 1:1 a 8:1, y los datos se muestran en la tabla 3. Los tamaños de las partículas de polímero/ARNip disminuyen notablemente cuando aumentan las relaciones de cargas con valores de 643 nm \pm 0,09 a 1:1 a 54 nm \pm 0,27 a 8:1.

TABLA 2: Mediciones de tamaño y potencial ξ de partículas formuladas con ARNip con una relación de cargas

teórica de 4:1 en función de la composición de metacrilato de butilo.

Polímero nº	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Error típico
P1	166	0,14	1,1	1,32
P2	189	0,09	0,13	0,69
P3	197	0,06	0,47	0,59
P4	144	0,11	0,41	1,2
P5	193	0,32	0,52	0,77
P6	236	0,06	0,67	0,95
P7	85	0,20	0,18	1,0

TABLA 3: Mediciones de tamaño y potencial ξ de partículas formuladas con el polímero 7, la composición con el 5 mayor contenido de butilo, y ARNip en función de la relación de cargas.

Relación de cargas teórica (+/-)	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Error típico
1:1	643	0,09	0,27	1,1
2:1	530	0,16	0,99	0,91
4:1	85	0,2	0,18	1,01
8:1	54	0,27	0,41	0,81

[0138] En algunos casos, se encuentra que la carga superficial de los complejos de ARNip/polímero, basado en las mediciones de potencial ξ , es similar y ligeramente positiva para todos los polímeros (-0,5 mV con un intervalo de 10 0,13-1,1 mV). Además, los complejos formados con +/- de 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1 usando el polímero 7, no mostraron diferencias en las cargas superficiales, otra vez con valores ligeramente positivos (0,18-0,99 mV) sin una tendencia con respecto a la relación de cargas. En algunos casos, con relaciones de cargas 1:1, se espera que las partículas tengan carga superficial muy pequeña, ya que las cargas del PAA y DMAEMA en el segundo bloque se 15 contrarrestan entre sí. Al aumentar la relación de cargas a 2:1, 4:1 y 8:1, se esperaría ver aumentos en la carga superficial positiva, pero, curiosamente, esto no se observó. En algunos casos, con aumentos crecientes de polímero, las partículas cambian la morfología, quedando más estrechamente empaquetadas. Con relaciones de cargas crecientes, es posible que la carga superficial no se afecte debido al apantallamiento eficaz de las cargas positivas del DMAEMA, ya que muchas cadenas de polímero y ARNip quedan empaquetadas dentro del centro de las partículas.

[0139] En algunas realizaciones, las alteraciones del tamaño de partículas y la carga superficial pueden ser 20 criterios de diseño relevantes en relación con la absorción de complejo por una célula. Las nanopartículas que llevan una carga superficial positiva facilitan la absorción por interacciones electrostáticas con membranas celulares con carga negativa.

[0140] Se evaluaron tanto en el polímero como en los complejos de ARNip/polímero su capacidad para inducir la 25 hemólisis de glóbulos rojos a valores de pH relevantes para la ruta de tráfico endosómico/lisosómico. No se produce una hemólisis significativa para polímeros 1-3. Sin embargo, la actividad hemolítica dependiente del pH relevante era evidente con el polímero 4, y se encontró una sensibilidad potenciada cuando aumentó el contenido de BMA del 30 bloque endosomolítico. El polímero 7 presentaba la mayor hemólisis dependiente del pH, esencialmente sin actividad a pH = 7,4, aproximadamente 25% de hemólisis a pH = 6,6 y 85% de hemólisis a pH = 5,8. Se evaluó posteriormente la actividad hemolítica de los polímeros 5-7 en su forma de complejo con ARNip. Se encontró que los complejos formados con los polímeros 5-7 con todas las relaciones de cargas ensayadas eran hemolíticos de una 35 forma dependiente del pH importante. Además, la hemólisis presentada por los complejos aumentó cuando se comparó con el polímero libre y era mayor con una relación de cargas de 4:1 frente a 1:1. El polímero 7 mostró la mayor actividad hemolítica con una relación de cargas 4:1, esencialmente sin hemólisis a pH 7,4, 60% de hemólisis a pH = 6,8 y 100% de hemólisis a pH 5,8. Estos datos sugieren que la actividad hemolítica sensible al pH de estos 40 polímeros está ligada a la incorporación del resto potenciador de la hidrofobicidad, el metacrilato de butilo. Este descubrimiento corrobora los informes previos de polímeros desestabilizadores de membrana, sensibles al pH, que han usado la incorporación de restos hidrófobos tales como alquilaminas o grupos aromáticos para potenciar la transición hidrófoba dependiente del pH de los polímeros funcionalizados con carboxilato.

Alteración de la membrana y/o desestabilización de la membrana

45 **[0141]** En algunas realizaciones, un polímero o construcción de polímero:polinucleótido (es decir, que comprende

cualquier polímero descrito en el presente documento asociado con uno o más polinucleótidos) es un polímero alterador o desestabilizador de la membrana celular (es decir, que desestabiliza o altera una membrana celular). La membrana celular es, a modo de ejemplo no limitante, una membrana extracelular, una membrana intracelular, una vesícula, un orgánulo, un endosoma, un liposoma o un glóbulo rojo. Cuando se administra a una célula, el polímero o polímero:polinucleótido alterador de la membrana se suministra a la célula. En algunas realizaciones, el ARNip es un polinucleótido preferido para la asociación con un polímero de esta invención y posterior endocitosis con el polímero en el interior de las células vivas.

10 **[0142]** La endocitosis es el procedimiento por el que una sustancia (por ejemplo, un polímero o ácido nucleico de la presente invención) logra entrar en una célula sin tener que atravesar la membrana plasmática. La sustancia es envuelta por una parte de la membrana celular que después se estrangula formando una vesícula intracelular. Una vez que se ha producido la endocitosis de la sustancia y el endosoma se ha acidificado, la composición química del polímero se altera porque el pK_a del polímero se selecciona de modo que, al pH dentro de un endosoma maduro, aproximadamente 5-6,5, el equilibrio entre las formas no ionizada y la ionizada de las unidades ácidas, es decir, las 15 unidades constitutivas aniónicas de un polímero de esta invención, se desplaza a la forma no ionizada. A diferencia con la forma ionizada del polímero, que es relativamente hidrófila, la forma no ionizada es sustancialmente hidrófoba y capaz de interacción, es decir, alteración de la membrana endosómica, lo cual da como resultado la liberación de la sustancia en el citosol.

20 **[0143]** La internalización celular de los complejos de ARNip con relaciones de cargas de 4:1 se investigó usando citometría de flujo para polímeros P4-P7 basándose en sus características endosomolíticas sensibles al pH. Después de 4 h de exposición al polímero complejo con ARNip 25 nM, se encontró que la absorción celular se correlacionaba positivamente con el contenido de BMA del segundo bloque, mostrando el polímero P7 el nivel más 25 alto de absorción (23% de células positivas para ARNip) durante este marco de tiempo. Los complejos con carga positiva han demostrado previamente que afectan a la internalización de los complejos catiónicos de polímero/ácido nucleico, consiguiendo los complejos con carga positiva las mayores tasas de internalización y expresión transgénica. Es probable que estos resultados no sean una función de la carga superficial o el tamaño, puesto que todas las partículas presentan la misma carga neta ligeramente positiva y los mismos tamaños (85-236 nm) dentro de los límites de la endocitosis no específica (tabla 2). Más bien, el efecto de la absorción puede ser una función de 30 la eficacia endosomolítica del bloque que contiene BMA. Basándose en los resultados de hemólisis, al aumentar el contenido de BMA se produce el escape endosómico en una mayor extensión, y por lo tanto el reciclado desde las células disminuye y la acumulación neta de ARNip en la célula aumenta, de forma similar a otros bioconjugados que contienen ácido propilacrílico. Basándose en la repulsión electrostática entre el ARNip y las membranas celulares, todas las formulaciones de polímero mostraron mucha mayor absorción (hasta 25x) por las células que el ARNip sin 35 formar complejo con el soporte (ARNip desnudo). La internalización del ARNip complejo en hasta 23% de las células después de solo 4 h es extremadamente prometedor para la eficacia terapéutica, ya que la absorción acumulada es probable que sea mucho mayor después de las 48 h totales de tratamiento. Además, se considera que la actividad del ARNip es catalítica; se puede reciclar dentro del citoplasma para destruir múltiples transcritos de ARNm, teniendo por lo tanto un efecto multigeneracional a largo plazo.

40 **[0144]** La citotoxicidad no específica de los soportes poliméricos se investigó incubando las células HeLa en presencia de los complejos con relaciones de cargas de 4:1 durante 24 h. Se observó una alta supervivencia relativa (>90% después de 24 h) para todos los polímeros ensayados. Los polímeros sintéticos, en particular los polímeros catiónicos, se pueden asociar con citotoxicidad apreciable. Por ejemplo, se ha mostrado que la PEI produce la 45 apoptosis y/o necrosis en una variedad de líneas celulares. Esta toxicidad se puede reducir mediante modificación química del segmento policatiónico con segmentos hidrófilos; sin embargo, normalmente hay un equilibrio entre eficacia y toxicidad. En este procedimiento, el uso de un segundo bloque de carga neutralizada del vehículo de suministro polimérico, posiblemente mantenía una alta supervivencia de las células HeLa cultivadas in vitro.

50 **[0145]** La capacidad de los soportes para suministrar eficazmente ARNip se investigó con experimentos de inactivación contra GAPDH con complejos formados a partir de todos los polímeros con relaciones de cargas teóricas de 4:1. Se evaluaron los niveles de proteína GAPDH 48 h después de tratamiento con los complejos. Los soportes poliméricos 1-3 eran ineficaces para producir la reducción de niveles de proteína, probablemente debido a su incapacidad para mediar el escape endosómico. Sin embargo, la reducción de la proteína GAPDH se hizo 55 evidente con el uso del polímero 4 como soporte del ARNip. La inactivación de la proteína aumentó más al aumentar el contenido de BMA de los soportes a 48% en el bloque endosomolítico (polímero P7). El polímero P7 mostró la mayor capacidad de mediar la inactivación de la proteína por el ARNip, donde la GAPDH se redujo a 32% del control. Además, el ARNip de control mostró una reducción despreciable de los niveles de la proteína GAPDH.

[0146] Para caracterizar mejor la eficacia del soporte, se analizó en los polímeros su capacidad para inactivar los niveles del ARNm de GAPDH. De forma similar a las mediciones de proteína, los polímeros 1-3 produjeron una reducción muy pequeña de la señal de ARNm, evaluada por RT-PCR. Otra vez, los polímeros P4-P7 mostraron mayor inactivación de GAPDH al aumentar el contenido de BMA del bloque endosomolítico. Específicamente, la inactivación de GAPDH se redujo a 39%, 30%, 31% y 21% del control con una relación de cargas de 4:1, para los polímeros P4, P5, P6 y P7, respectivamente. En general, los resultados están de acuerdo con los descubrimientos de otros grupos que exploran estrategias de suministro de ADN, que han encontrado que la adición de dominios hidrófobos, específicamente restos de N-oleilo, restos de fenilalanina y metacrilato de butilo, como se usa en el presente documento, potencia la transfección.

10

[0147] Se llevó a cabo otra investigación sobre la capacidad de P7, que incluye el polímero de la tabla 2 y estructuras similares (incluyendo diferentes versiones de P7, tales como P7v6, que se usa de forma intercambiable en el presente documento con PRx0729v6), para mediar la inactivación génica, con respecto a la relación de cargas y la dosis de ARNip. Se encontró que la alteración de las relaciones de cargas teóricas afectaba mucho a la inactivación génica. La GAPDH se redujo a 51%, 42%, 21% y 14% de los niveles de control con relaciones de cargas de 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1, respectivamente. Particularmente, con relaciones de cargas de 4:1 y 8:1, la inactivación génica era similar al soporte HiPerFect disponible en el comercio, donde los niveles de GAPDH se reducían en aproximadamente 80%. Es importante, que los efectos en los niveles de GAPDH son específicos del ARNip que se suministra, de modo que cuando se usa un ARNip de control con una relación de cargas de 8:1, no hay un efecto significativo en los niveles de GAPDH. La alteración de la relación de cargas podía haber producido diferentes niveles de condensación del ARNip en las nanopartículas. Los experimentos con DSL indicaban que el contenido de copolímero creciente en los complejos daba como resultado partículas más condensadas (tabla 3), y estos estudios funcionales sugieren que las partículas más compactas pueden ser internalizadas más eficazmente o con mayor biodisponibilidad del ARNip. Estos descubrimientos están de acuerdo con los artículos previos que indican que los complejos de ADN/polietilenimina y ADN/polilisina más compactos son internalizados en mayores tasas y logran mayores eficacias de transfección. Se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta usando P7 con una relación de cargas de 4:1. Aunque había poca respuesta en la expresión génica de GAPDH con ARNip 1 nM o 5 nM, la expresión se redujo a 77%, 21% y 12% del control cuando se suministró ARNip 10 nM, 25 nM o 50 nM usando el polímero 7. Este nivel de inactivación se acerca al visto usando HiPerFect 50 nM, un control positivo disponible en el comercio. Sin embargo, todos los polímeros, incluyendo el polímero 7 demostraron una biocompatibilidad potenciada, cuando se midió por la citotoxicidad no específica comparada con HiPerFect. Aunque se lograron niveles significativos de inactivación génica con dosis más altas de ARNip (25-50 nM), para el traslado a aplicaciones in vivo, puede ser más conveniente lograr una reducción significativa usando dosis menores de ARNip para evitar los efectos fuera del objetivo. En algunas realizaciones, esto se logra mediante la absorción más eficaz de las partículas de polímero/ARNip, realizadas quizás mejor dirigiendo los ligandos.

Usos

[0148] Como se describe en el presente documento, los polinucleótidos de esta invención que se administran a un sujeto y finalmente se suministran en las células del sujeto, preferiblemente son ADN, ARN o análogos naturales o sintéticos de los mismos. Con respecto al ADN/ARN y análogos sintéticos que pueden inhibir la expresión de genes diana, estos incluyen especies tales como, sin limitación, polinucleótidos de sentido contrario, miARN y ARNip.

[0149] Las enfermedades que son tratadas opcionalmente usando polímeros, y/o complejos de polímero y polinucleótido de esta invención incluyen, sin limitación, trastornos patógenos, cánceres, enfermedades inflamatorias, deficiencias enzimáticas, errores del metabolismo innatos, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, trastornos de la sangre y trastornos de coagulación.

[0150] Los siguientes ejemplos tienen propósitos ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención.

Ejemplos

[0151] A lo largo de la descripción de la presente invención, se usan diferentes acrónimos y abreviaturas conocidas para describir monómeros o restos monoméricos derivados de la polimerización de dichos monómeros. Sin limitación, salvo que se indique otra cosa: "BMA" (o la letra "B" como notación abreviada equivalente) representa metacrilato de butilo o resto monomérico derivado del mismo; "DMAEMA" (o la letra "D" como notación abreviada equivalente) representa metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo o resto monomérico derivado del mismo; "Gal" se refiere a galactosa o un resto de galactosa, que incluye opcionalmente restos protectores de hidroxilo (p. ej., acetilo)

o a un derivado pegilado del mismo (como se describe a continuación); HPMA representa metacrilato de 2-hidroxipropilo o resto monomérico derivado del mismo; "MAA" representa ácido metacrílico o resto monomérico derivado del mismo; "MAA(NHS)" representa éster de N-hidroxil-succinimida del ácido metacrílico o resto monomérico derivado del mismo; "PAA" (o la letra "P" como notación abreviada equivalente) representa ácido 2-propilacrílico o resto monomérico derivado del mismo, "PEGMA" se refiere al monómero metacrílico pegilado, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{O})_{7-8}\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ o resto monomérico derivado del mismo. En cada caso, cualquiera de dichas designaciones indica el monómero (incluyendo todas las sales o análogos iónicos de los mismos), o un resto monomérico derivado de polimerización del monómero (incluyendo todas las sales o análogos iónicos del mismo), y la forma específica indicada es evidente por el contexto para un experto en la materia.

10

Ejemplo 1: Preparación de polímeros y copolímeros de dibloques

[0152] Se preparan los polímeros y copolímeros de dibloques de la siguiente fórmula general:

15 $[\text{A1}_x\text{-/A2}_y]_n\text{-}[\text{B1}_x\text{-/B2}_y\text{-/B3}_z]_{1-5n}$

En la que

[A1-A2] es el primer copolímero de bloques, compuesto de los restos de monómeros A1 y A2

20 [B1-B2-B3] es el segundo copolímero de bloques, compuesto de los restos de monómeros B1, B2, B3
x, y, z es la composición de polímero en % en moles del resto de monómero
n es el peso molecular

[0153] Copolímeros de dibloques de ejemplo: [DMAEMA]-[B-/P-/D]

25

[PEGMA_w]-[B-/P-/D]

[PEGMA_w-DMAEMA]-[B-/P-/D]

[PEGMA_w-MAA(NHS)]-[B-/P-/D]

[DMAEMA-/MAA(NHS)]-[B-/P-/D]

30 [HPMA-/PDSM]-[B-/P-/D]

En los que:

B es metacrilato de butilo

35 P es ácido propilacrílico

D es DMAEMA es metacrilato de dimetilaminoetilo

PEGMA es metacrilato de polietilenglicol donde, por ejemplo, w = 4-5 ó 7-8 unidades de óxido de etileno)

MAA(NHS) es N-hidroxisuccinamida del ácido metilacrílico

HPMA es N-(2-hidroxipropil)metacrilamida

40 PDSM es metacrilato-disulfuro de piridilo

[0154] Estos polímeros representan estructuras en las que la composición del primer bloque del polímero o copolímero se varía o se trata químicamente con el fin de crear polímeros en los que el primer bloque es neutro (p. ej., PEGMA), catiónico (DMAEMA), aniónico (PEGMA-NHS, en el que la NHS se hidroliza al ácido), anfótero (DMAEMA-NHS, en el que la NHS se hidroliza al ácido), o ion híbrido (por ejemplo, poli[fosfato de 2-metacrilato-2'-trimetilamonioetilo]). Además, el polímero [PEGMA-PDSM]-[B-P-D] contiene un grupo funcional de disulfuro de piridilo en el primer bloque que se puede hacer reaccionar con un ARNip tiolado para formar un conjugado de polímero-ARNip.

50 **Ejemplo 1.1: Procedimientos sintéticos generales para preparar los copolímeros de bloques por RAFT**

A. Agente de transferencia de cadena de RAFT

[0155] La síntesis del agente de transferencia de cadena (CTA), ácido 4-ciano-4-(etilsulfanil)tiocarbonil)sulfanilpentanoico (ECT), usado para las siguientes polimerizaciones por RAFT, se adaptó del procedimiento de Moad y col., *Polymer*, 2005, 46(19): 8458-68. Brevemente, se añadió etanotiol (4,72 g, 76 mmol) a lo largo de 10 min a una suspensión agitada de hidruro sódico (60% en aceite) (3,15 g, 79 mmol) en éter dietílico (150 ml) a 0°C. Después, la disolución se dejó agitar durante 10 min antes de la adición de disulfuro de carbono (6,0 g, 79 mmol). El tritio carbonato de S-etilo bruto (7,85 g, 0,049 mol) se recogió por filtración, se suspendió en éter

dietílico (100 ml), y se hizo reaccionar con yodo (6,3 g, 0,025 mol). Después de 1 h, la disolución se filtró, se lavó con tiosulfato sódico acuoso y se secó sobre sulfato sódico. El disulfuro de bis(etilsulfaniltiocarbonilo) bruto se aisló por evaporación en rotavapor. Una disolución de disulfuro de bis-(etilsulfaniltiocarbonilo) (1,37 g, 0,005 mol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico) (2,10 g, 0,0075 mol) en acetato de etilo (50 ml) se calentó a reflujo durante 18 h.

5 Después de evaporación en rotavapor del disolvente, se aisló el ácido 4-ciano-4-(etilsulfaniltiocarbonil)-sulfanilpentanoico (ECT) por cromatografía en columna usando gel de sílice como fase estacionara y acetato de etilo:hexano 50: 50 como eluyente.

B. Macroagente de transferencia de cadena poli(metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo) (macroCTA poliDMAEMA).

10

[0156] La polimerización por RAFT de DMAEMA se llevó a cabo en DMF a 30°C en atmósfera de nitrógeno durante 18 h, usando ECT y 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetil-valeronitrilo) (V-70) (Wako chemicals) como iniciador de radicales. La relación inicial de monómero a CTA ($[CTA]_0/[M]_0$) era tal que el M_n teórico con 100% de conversión era 10.000 (g/mol). La relación inicial de CTA a iniciador ($[CTA]_0/[I]_0$) era de 10 a 1. El macroagente de transferencia de

15 cadena poliDMAEMA resultante se aisló por precipitación en éter dietílico/pentano 50:50 en v.v. El polímero resultante se volvió a disolver en acetona y posteriormente precipitó en pentano (x3) y se secó durante la noche a vacío.

C. Copolimerización de bloques de DMAEMA, PAA y BMA a partir del macroCTA poli(DMAEMA).

20

[0157] Se añadieron las cantidades estequiométricas deseadas de DMAEMA, PAA y BMA al macroCTA poli(DMAEMA) disuelto en N,N-dimetilformamida (25% en peso de monómero y macroCTA respecto al disolvente). Para todas las polimerizaciones, las $[M]_0/[CTA]_0$ y $[CTA]_0/[I]_0$ eran 250:1 y 10:1, respectivamente. Después de la adición de V70, las disoluciones se purgaron con nitrógeno durante 30 min y se dejaron reaccionar a 30°C durante

25 18 h. Los copolímeros de dibloques resultantes se aislaron por precipitación en éter dietílico/pentano 50:50 en v.v. Después, los polímeros precipitados se volvieron a disolver en acetona y posteriormente se precipitaron en pentano (x3) y se secaron durante la noche a vacío. Se usó la cromatografía de gel permeable (GPC) para determinar los pesos moleculares y las polidispersidades (PDI, M_w/M_n) tanto del macroCTA poli(DMAEMA) como de las muestras de copolímeros de dibloques en DMF con respecto a las referencias de poli(metacrilato de metilo) (columnas SEC

30 Tosoh TSK-GEL R-3000 y R-4000 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) conectadas en serie a Viscotek GPCmax VE2001 y refractómetro VE3580 (Viscotek, Houston, TX)). Se usó DMF de calidad para HPLC que contenía 1,0% en peso de LiBr como fase móvil. La figura 1A resume los pesos moleculares y composiciones de algunos de los polímeros sintetizados por RAFT. (PRx0729v6 se usa de forma intercambiable con P7v6 en esta solicitud y en diferentes solicitudes de prioridad). La figura 1B resume los pesos moleculares, tamaño de partículas y

35 composiciones para algunos polímeros sintetizados por RAFT.

Ejemplo 1.2. Preparación de la copolimerización del segundo bloque (B1-B2-B3) de DMAEMA, PAA y BMA a partir de un macroCTA poli(PEGMA).

40 **[0158]** Se añadieron las cantidades estequiométricas deseadas de DMAEMA, PAA y BMA al macroCTA poli(PEGMA) disuelto en N,N-dimetilformamida (25% en peso de monómero y macroCTA respecto al disolvente). Para todas las polimerizaciones, la $[M]_0/[CTA]_0$ y $[CTA]_0/[I]_0$ eran 250:1 y 10:1, respectivamente. Después de la adición de AIBN, las disoluciones se purgaron con nitrógeno durante 30 min y se dejaron reaccionar a 68°C durante

45 6-12 h (Figura 2). Los copolímeros de dibloques resultantes se aislaron por precipitación en éter dietílico/pentano 50:50 en v.v. Después, los polímeros precipitados se volvieron a disolver en acetona y posteriormente se precipitaron en pentano (x3) y se secaron durante la noche a vacío. Se usó la cromatografía de gel permeable (GPC) para determinar los pesos moleculares y las polidispersidades (PDI, M_w/M_n) tanto del macroCTA poli(PEGMA) como de las muestras de copolímeros de dibloques en DMF usando un Viscotek GPCmax VE2001 y refractómetro

50 VE3580 (Viscotek, Houston, TX). Se usó DMF de calidad para HPLC que contenía 1,0% en peso de LiBr como fase móvil. Se usó la espectroscopía de RMN en $CDCl_3$ para confirmar la estructura de polímero y calcular la composición del 2º bloque. La figura 2 resume la síntesis del polímero $[PEGMA_w]_n$ -[B-P-D] donde $w = 7-8$. Las figuras 3A, 3B y 3C resumen la caracterización del polímero $[PEGMA_w]_n$ -[B-P-D] donde $w = 7-8$.

Ejemplo 1.3. Preparación y caracterización de copolímeros de PEGMA-DMAEMA

55

[0159] La síntesis de polímero se llevó a cabo usando un procedimiento similar al descrito en los ejemplos 1.1 y 1.2. La relación de PEGM y DMAEMA en el primer bloque se varió usando diferentes relaciones de alimentación de los monómeros individuales para crear los copolímeros descritos en la figura 4.

Ejemplo 1.4. Preparación y caracterización de copolímeros de PEGMA-MAA(NHS)

[0160] La síntesis de polímero se llevó a cabo como se describe en los ejemplos 1.1 y 1.2 (y se resume en la figura 5), usando relaciones de alimentación de monómeros para obtener la composición deseada del copolímero del 1^{er} bloque. Las figuras 6A, 6B y 6C resumen la síntesis y caracterización del polímero [PEGMA_w-MAA(NHS)]-[B-P-D] donde la relación de monómeros del copolímero del 1^{er} bloque es 70:30. Los polímeros que contienen NHS se pueden incubar en tampón acuoso (fosfato o bicarbonato) a pH entre 7,4 y 8,5 durante 1-4 h, a temperatura ambiente o 37°C para generar la forma hidrolizada (ácida).

10 Ejemplo 1.5. Preparación y caracterización de copolímeros de DMAEMA-MAA(NHS)

[0161] La síntesis de polímero se llevó a cabo como se describe en los ejemplos 1.1 y 1.2, usando relaciones de alimentación de monómeros para obtener la composición deseada del copolímero del 1^{er} bloque. Las figuras 7A, 7B y 7C resumen la síntesis y caracterización del polímero [DMAEMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] donde la relación de monómeros del copolímero del 1^{er} bloque es 70:30. Los polímeros que contienen NHS se pueden incubar en tampón acuoso (fosfato o bicarbonato) a pH entre 7,4 y 8,5 durante 1-4 h, a temperatura ambiente o 37°C para generar la forma hidrolizada (ácida).

20 Ejemplo 2. Preparación y caracterización de conjugados de copolímero de HPMA-PDS(ARN) para el suministro del fármaco ARNip**A. Síntesis del monómero metacrilato-disulfuro de piridilo (PDSMA)**

[0162] El esquema de síntesis para el PDSMA se resume en la figura 8. Se disolvió Aldritol-2™ (5 g, 22,59 mmol) en 40 ml de metanol y 1,8 ml de AcOH. La disolución se añadió a una disolución de 2-aminoetanotiol.HCl (1,28 g, 11,30 mmol) en 20 ml de metanol a lo largo de 30 min. La reacción se agitó en atmósfera de N₂ durante 48 h a T.a. Después de evaporar los disolventes, el aceite residual se lavó dos veces con 40 ml de éter dietílico. El compuesto bruto se disolvió en 10 ml de metanol y el producto se precipitó dos veces con 50 ml de éter dietílico para dar el compuesto 1 deseado en forma de un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 95%.

[0163] Se disolvieron piridina-ditioetilamina (1, 6,7 g, 30,07 mmol) y trietilamina (4,23 ml, 30,37 mmol) en DMF (25 ml) y piridina (25 ml) y se añadió lentamente mediante jeringa cloruro de metacrilato (3,33 ml, 33,08 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a T.a. Después de la reacción, la reacción se inactivó con disolución saturada de NaHCO₃ (350 ml) y se extrajo con acetato de etilo (350 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron más con HCl al 10% (100 ml, 1 vez) y agua pura (100 ml, 2 veces) y se secaron con MgSO₄. El producto puro se purificó por cromatografía en columna (EA/Hex: de 1/10 a 2/1) en forma de un jarabe amarillo. R_f = 0,28 (EA/Hex = 1/1). Rendimiento: 55%.

B. Síntesis del copolímero de HPMA-PDSMA

[0164] La polimerización por RAFT de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) y metacrilato-disulfuro de piridilo (típicamente en una relación de monómeros 70:30) se lleva a cabo en DMF (monómero:disolvente al 50% en peso) a 68°C en atmósfera de nitrógeno durante 8 h usando 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo (AIBN) como iniciador de radicales libres (Figura 9). La relación molar de CTA a AIBN es de 10 a 1 y la relación de monómero a CTA se fija de modo que se logre un peso molecular de 25.000 g/mol si hay una conversión de 100%. El macroCTA poli(HPMA-PDS) se aisló por precipitación repetida en éter dietílico a partir de metanol.

[0165] El macroCTA se seca a vacío durante 24 h y después se usa para la copolimerización de bloques del metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), ácido propilacrílico (PAA) y metacrilato de butilo (BMA). Se añaden cantidades equimolares de DMAEMA, PAA y BMA ([M]₀/[CTA]₀ = 250) al macroCTA HPMA-PDS disuelto en N,N-dimetilformamida (25% en peso de monómero y macroCTA respecto al disolvente). Se añade el iniciador de radicales AIBN con una relación de CTA a iniciador de 10 a 1. La polimerización se deja avanzar en atmósfera de nitrógeno durante 8 h a 68°C. Después, el polímero de dibloques resultante se aísla por precipitación 4 veces en éter dietílico/pentano 50:50, volviendo a disolver en etanol entre las precipitaciones. Después el producto se lava 1 vez con éter dietílico y se seca durante la noche a vacío.

C. Conjugación de ARNip con el copolímero de HPMA-PDSMA

[0166] El ARNip tiolado se obtuvo en el comercio (Agilent, Boulder, CO) en forma de ARN dúplex con una cadena

de sentido 5' modificada con disulfuro. La forma de tiol libre para la conjugación se prepara disolviendo el compuesto liofilizado en agua y se trata durante 1 h con el agente de reducción de disulfuro TCEP inmovilizado en un gel de agarosa. El ARN reducido (400 μ M) después se hizo reaccionar durante 24 h con el polímero funcionalizado con disulfuro de piridilo en tampón de fosfato (pH 7) que contenía ácido etilendiaminatetraacético 5 mM (EDTA) (Figura 5 9).

[0167] La reacción del polímero de disulfuro de piridilo con el ARN-tiol crea 2-piridinationa, que se puede medir por espectrofotometría para caracterizar la eficacia de la conjugación. Para validar mejor el intercambio de disulfuro, los conjugados se hicieron correr en un gel de SDS-PAGE con tricina al 16,5%. En paralelo, se tratan partes alícuotas de las reacciones de conjugación con TCEP inmovilizado antes del SDS-PAGE para verificar la liberación del ARN del polímero en un entorno reductor. Las reacciones de conjugación se llevan a cabo con estequiometrías de polímero/ARN de 1, 2 y 5. Se usan las mediciones de absorbancia por espectrofotometría UV a 343 nm para la liberación de 2-piridinationa para medir las eficacias de conjugación.

15 Ejemplo 3: Caracterización del complejo de ARNip/polímero

[0168] Después de verificarse que se había completado la complejación de ARNip estable en suero por retardo en gel de agarosa, los complejos de ARNip/polímero se caracterizaron según el tamaño y el potencial zeta usando un detector ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, láser 15 mW, haz incidente = 676 nm). Brevemente, el polímero se formuló con 0,1 mg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco) y se formaron los complejos por adición de polímero a ARNip GAPDH (Ambion) con las relaciones de cargas teóricas indicadas basadas en el DMAEMA con carga positiva, que está protonado al 50% a pH = 7,4, y el ARNip con carga negativa. Se recogieron las funciones de correlación con un ángulo de dispersión de 90°, y los tamaños de partículas se calcularon usando la viscosidad y el índice de refracción del agua a 25°C. Los tamaños de partículas se expresan como diámetros eficaces suponiendo una distribución logarítmica normal. Las movilidades electroforéticas medias se midieron a 25°C usando el software de análisis de potencial zeta ZetaPALS, y se calcularon los potenciales zeta usando el modelo de Smoluchowsky para suspensiones acuosas.

30 Ejemplo 4: Cultivo de células HeLa

[0169] Células de carcinoma de cuello uterino humano HeLa (ATCC CCL-2) se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) que contenía L-glutamina (Gibco), penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Invitrogen) a 37°C y 5% de CO₂.

35 Ejemplo 5: Alteración de la membrana dependiente del pH de soportes y complejos de ARNip/polímero

[0170] Se usó la hemólisis para determinar la potencial actividad endosomolítica tanto del polímero libre como de los conjugados de ARNip/polímero a valores de pH que imitan el tráfico endosómico (extracelular pH 7,4, endosoma temprano pH = 6,6, y endosoma tardío pH = 5,8). Brevemente, se recogió sangre humana entera en tubos Vacutainer que contenían EDTA. Se centrifugó la sangre, se aspiró el plasma, y se lavó tres veces con NaCl 150 mM para aislar los glóbulos rojos (RBC). Los RBC después se volvieron a suspender en tampón de fosfato (PB) a pH 7,4, pH 6,6 o pH 5,8. Después, los polímeros (10 μ g/ml) o complejos de polímero/ARNip se incubaron con los RBC a los tres valores de pH durante 1 h a 37°C. Después se centrifugaron los RBC intactos y se midió la hemoglobina liberada en el líquido sobrenadante por absorbancia a 541 nm como indicación de la lisis de membrana de RBC dependiente de pH. La figura 10A muestra la hemólisis de polímeros en una concentración de 10 μ g/ml, y la figura 10B muestra los complejos de polímero/ARNip de los polímeros 5-7 a relaciones de cargas teóricas de 1:1 y 4:1. Se normalizó la actividad hemolítica con respecto a un control positivo, Triton X-100 al 1% en v/v, y son datos representativos de un solo experimento realizado por triplicado \pm desviación típica.

50 Ejemplo 6: Medición de la absorción de ARNip mediada por soporte

[0171] La absorción intracelular de los complejos de ARNip/polímero se midió usando citometría de flujo (analizador de sobremesa Becton Dickinson LSR). Se sembraron células HeLa 15.000 células/cm² y se dejaron adherir durante la noche. Se formó complejo de ARNip marcado con FAM (5-carboxifluoresceína) (Ambion) con polímero con una relación de cargas teórica de 4:1 durante 30 min a temperatura ambiente, y después se añadió a las células HeLa cultivadas con una concentración final de ARNip 25 mM. Después de incubación con los complejos durante 4 h, las células se tripsinizaron y se volvieron a suspender en PBS con BSA al 0,5% y azul de trypan al 0,01%. El azul de trypan se usó como se ha descrito previamente para atenuar la fluorescencia extracelular y discriminar los complejos que han sufrido endocitosis por las células. Se analizaron 10.000 células por muestra y la

activación de la fluorescencia se determinó usando muestras que no recibían tratamiento y recibían polímero que no formaba complejo con ARNip marcado con FAM. La figura 11 muestra la internalización por células HeLa de ARNip marcado con FAM y complejos de polímero/ARNip formados con los polímeros 4-7 y suministrados durante 4 h. Los datos son de tres experimentos independientes realizados por triplicado con barras de error que representan el error 5 típico de la media (ETM).

Ejemplo 7: Citotoxicidad del complejo de ARNip/polímero

[0172] La citotoxicidad del complejo de ARNip/polímero se determinó usando un kit de detección de la citotoxicidad 10 de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche). Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 12.000 células por pocillo y se dejó que se adhirieran durante la noche. Los complejos se formaron por adición de polímero (disoluciones madre de 0,1 mg/ml) a ARNip de GAPDH con relaciones de cargas teóricas 4:1 y para alcanzar una concentración de ARNip/pocillo 25 nM. Se añadieron complejos (relación de cargas = 4:1) a los 15 pocillos por triplicado. Después de que las células se incubaron durante 24 h con los complejos de polímero, se separaron los medios y las células se lavaron con PBS dos veces. Después las células se lisaron con tampón de lisis (100 μ l/pocillo, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, β -glicerofosfato 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM) durante 1 h a 4°C. Después de mezclar mediante pipeta, se diluyeron 20 μ l de lisato celular 1:5 en PBS y se cuantificó la lactato deshidrogenasa (LDH) mezclando con 20 100 μ l de la disolución de sustrato de LDH. Después de una incubación de 10-20 min para la formación de color, se midió la absorbancia a 490 nm con el ajuste de referencia a 650 nm.

[0173] La figura 12A muestra la citotoxicidad de células HeLa no específica y la figura 12B muestra la inactivación 25 de GAPDH en función del soporte polimérico del ARNip. Las células HeLa se transfectaron con ARNip contra GAPDH con 25 nM usando complejos de polímero/ARNip formulados con relaciones de cargas teóricas de 4:1. (A) Después de 24 h, se recogió el lisato de células y se ensayó la lactato deshidrogenasa, una medición de la viabilidad celular, y los datos se muestran respecto a células no tratadas. (B) Después de 48 h, se examinaron los niveles tanto de proteína (negro) como de ARNm (blanco) usando un ensayo de actividad enzimática de GAPDH y RT-PCR, respectivamente, y los datos se muestran con respecto a células que no reciben tratamiento. Los datos son de tres 30 experimentos independientes realizados por triplicado con barras de error que representan la desviación típica.

Ejemplo 8: Evaluación de la proteína GAPDH e inactivación génica por complejos de ARNip/polímero

[0174] La eficacia de las series de polímeros para el suministro de ARNip se cribó usando un ensayo de actividad 35 de GAPDH (Ambion). Se cultivaron células HeLa (12.000 células/cm²) en placas de 96 pocillos. Después de 24 h, se añadieron los complejos (relaciones de cargas = 4:1) a las células con una concentración final de ARNip 25 nM en presencia de suero al 10%. La extensión de la reducción de la proteína GAPDH mediada por el ARNip se evaluó 48 h después de transfección. Como control positivo, se llevaron a cabo experimentos de inactivación en paralelo usando HiPerFect (Qiagen) siguiendo las condiciones del fabricante. La actividad restante de la GAPDH se midió como describe el fabricante usando el procedimiento de aumento de fluorescencia cinética a lo largo de 5 min y se 40 calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de expresión restante = fluorescencia, GAPDH/fluorescencia, sin tratamiento, donde fluorescencia = fluorescencia 5 min - fluorescencia 1 min. El procedimiento de transfección no afectó significativamente a la expresión de GAPDH cuando se usó una secuencia de ARNip no directora. La figura 13A muestra la inactivación de GAPDH en células HeLa medida por RT-PCR en tiempo real 48 h después del tratamiento con complejos en función de la relación de cargas (1:1-8:1) y la figura 13B muestra la inactivación de 45 GAPDH en células HeLa medida por RT-PCR en tiempo real 48 h después del tratamiento con complejos en función de la dosis de ARNip (1-50 nM) con el polímero 7 como soporte. El ARNip de control negativo n° 1 (Ambion) y un reactivo de transfección disponible en el comercio, HiPerFect (Qiagen), se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

50 [0175] Después del cribado inicial para identificar el soporte que produjo la inactivación de GAPDH mediada por ARNip más fuerte, se usó la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para evaluar directamente el suministro de ARNip. Después de 48 h de incubación con complejos como los formados antes, las células se lavaron con PBS. Se aisló el ARN total usando Qiagen's Qiashtredder y mini kit RNeasy. Se digirió cualquier ADN genómico residual en las muestras (RNase-Free DNase Set, Qiagen) y el ARN se 55 cuantificó usando el ensayo de RiboGreen (Molecular Probes) basándose en las instrucciones del fabricante.

[0176] La transcripción inversa se realizó usando el kit the Omniscript RT (Qiagen). Se usó una muestra de ARN de 25 ng total para la síntesis del ADNc y se llevó a cabo la PCR usando el sistema de detección de secuencia ABI 7000 usando un conjunto de cebador y sonda prediseñado (Assays on Demand, Applied Biosystems) para la

GAPDH y beta-actina como gen de mantenimiento. Las reacciones (20 μ l total) consistían en 10 μ l de 2X Taqman Universal PCR Mastermix, 1 μ l de cebador/sonda, y 2 μ l de ADNc, completado hasta 20 μ l con agua exenta de nucleasa (Ambion). Se usaron los siguientes parámetros de PCR: 95°C durante 95 s seguido de 45 ciclos de 95°C durante 30 s y 55°C durante 60 s. Se usó el análisis del ciclo umbral (CT) para cuantificar la GAPDH, normalizada con respecto a la beta-actina y con respecto a la expresión de células HeLa no tratadas.

Ejemplo 9. Diseño funcional de poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)].

[0177] La figura 14 muestra el diseño de polímero para poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]. Se incorporaron propiedades multifuncionales mediante estrategias de síntesis del polímero por RAFT usando un CTA funcionalizado en el extremo con disulfuro de piridilo para formar una arquitectura de dibloques diseñada para tener solubilidad acuosa y propiedades desestabilizadoras de la membrana dependientes de pH. Las funcionalidades químicas del monómero resaltadas en la figura 14 se eligieron con el fin de producir las propiedades deseadas para cada bloque de polímero. Es importante que el módulo 3 se diseñó para tener carga cerca de la neutralidad a pH fisiológico (aproximadamente 50% de protonación de DMAEMA y 50% de desprotonación de PAA predicha) y para dar una transición a un estado más hidrófobo y con carga positiva en entornos de pH más bajos.

Ejemplo 10. Síntesis de disulfuro de piridilo-CTA

[0178] El precursor del ácido 4-ciano-4-(etilsulfanilcarbonyl)sulfanilpentanoico (ECT) se sintetizó como se muestra en la figura 15. El agente de transferencia de cadena (CTA) para RAFT funcionalizado con disulfuro de piridilo se sintetizó convirtiendo primero el ECT en el éster de NHS seguido de reacción con piridilditio-etilamina. El ECT (1,05 g, 4 mmol) y la N-hidroxisuccinimida (0,460 g, 4 mmol) se disolvieron en 100 ml de cloroformo. Después, la mezcla se enfrió a 0°C, momento en el que se añadió N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0,865 mg, 4,2 mmol). La disolución se mantuvo a 0°C durante 1 h y después se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 22 h. La disolución después se filtró para separar la diciclohexilurea y la disolución se concentró por evaporación en rotavapor. Después, el sólido resultante se secó a vacío y se usó sin ninguna purificación adicional. La NHS-ECT (1,80 g, 5,0 mmol) y piridilditio-etilamina (0,90 g, 5,0 mmol) después se disolvieron por separado en 200 y 300 ml de cloroformo, respectivamente. La disolución de piridilditio-etilamina después se añadió gota a gota como 3 fracciones separadas 20 min. La mezcla después se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. Después de separar el disolvente, se llevaron a cabo dos cromatografías en columna sucesivas (Silica gel 60, Merk) (acetato de etilo:hexano 50:50; acetato de etilo:hexano 70:30 v/v) dando un sólido naranja viscoso. RMN 1 H 200 MHz (CDCl₃, T.a., ppm) 1,29-1,41 [t, CH₃CH₂S: 3H], 1,85-1,93 [s, (CH₃)C(CN): 3H], 2,33-2,59 [m, C(CH₃)(CN)(CH₂CH₂): 4H], 2,86-2,97 [t, CH₂SS: 2H], 3,50-3,61 [t, NHCH₂: 2H], 7,11-7,22 [m, Ar CH *para*: 1H], 7,46-7,52 [m, Ar CH *orto*: 1H], 7,53-7,62 [ancho, NH: 1H], 7,53-7,68 [m, Ar CH *meta*: 1H], 8,47-8,60 [m, CHN *meta*: 1H].

Preparación de polímero reactivo con tiol: Polimerización por RAFT de poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)] funcionalizado con disulfuro de piridilo. La polimerización por RAFT de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA) se llevó a cabo en metanol (monómero:disolvente al 50 por ciento) a 70°C en atmósfera de nitrógeno durante 8 h usando 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo (AIBN) como iniciador de radicales libres. La relación molar de CTA a AIBN era de 10 a 1 y la relación de monómero a CTA se ajustó de modo que se obtuviera un peso molecular de 25.000 g/mol para una conversión de 100%. Se aisló el macro-CTA poli(HPMA) por precipitación repetida en éter dietílico a partir de metanol. El macroCTA se secó a vacío durante 24 h y después se usó para la copolimerización de bloques de metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), ácido propilacrílico (PAA) y metacrilato de butilo (BMA). Se añadieron cantidades equimolares de DMAEMA, PAA y BMA ($[M]_0/[CTA]_0 = 250$) al macroCTA de HPMA disuelto en N,N-dimetilformamida (monómero y macroCTA al 25% respecto al disolvente). Se añadió el iniciador de radicales V70 con una relación de CTA a iniciador de radicales de 10 a 1. La polimerización se dejó proceder en atmósfera de nitrógeno durante 18 h a 30°C. Después, el polímero de dibloques resultante se aisló por precipitación 4 veces en éter dietílico/pentano 50:50, volviendo a disolver en etanol entre precipitaciones. Después, el producto se lavó 1 vez con éter dietílico y se secó durante la noche a vacío.

[0179] Se usó la cromatografía de gel permeable (GPC) para determinar el peso molecular y la polidispersidad (M_w/M_n , PDI) tanto del macroCTA poli(HPMA) como del copolímero de dibloques en DMF. Los cálculos de peso molecular se basaron en los tiempos de elución de la columna respecto a las referencias de poli(metacrilato de metilo) usando DMF de calidad para HPLC que contenía LiBr al 0,1% en peso a 60°C como la fase móvil. Se usó el hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el disulfuro de piridilo terminal del polímero, liberando 2-piridinationa. Basándose en el peso molecular del polímero determinado experimentalmente y el coeficiente de extinción molar de la 2-piridinationa a 343 nm ($8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en disolventes acuosos, se determinó el porcentaje de conservación del grupo terminal para el macroCTA poli(HPMA) y el copolímero de dibloques.

Ejemplo 11. Conjugación de polímero-péptido

[0180] La fusión con el dominio de transducción de péptidos del péptido transportina (también conocido como la secuencia del péptido Antennapedia (Antp) se usó para sintetizar una forma de internalización en la célula del péptido Bak-BH3 (Antp-BH3) que contiene un resto cisteína carboxi-terminal (NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKKMGQVGRQLAIGDDINRRYDSC-COOH). Para asegurar tioles libres para la conjugación, el péptido se reconstituyó en agua y se trató durante 1 h con el agente de reducción de disulfuro TCEP inmovilizado en un gel de agarosa. El péptido reducido (400 μ M) después se hizo reaccionar durante 24 h con el polímero funcionalizado en el extremo con disulfuro de piridilo en tampón de fosfato (pH 7) que contenía ácido etilendiaminatetraacético 5 mM (EDTA).

[0181] Como se muestra en la figura 16, la reacción del grupo terminal disulfuro de piridilo del polímero con la cisteína peptídica crea la 2-piridinación, que posteriormente se puede medir por espectrofotometría para caracterizar la eficacia de la conjugación. Para validar mejor el intercambio de disulfuro, los conjugados se hicieron correr en un gel de SDS-PAGE con tricina al 16,5%. En paralelo, se trataron partes alícuotas de las reacciones de conjugación con el TCEP inmovilizado antes del SDS-PAGE para verificar la liberación del péptido del polímero en un entorno reductor.

[0182] Las reacciones de conjugación se llevaron a cabo con estequiometrías de polímero/péptido 1, 2 y 5. Las mediciones de la absorbancia por espectrofotometría UV a 343 nm para la liberación de 2-piridinación indicaron eficacias de conjugación de 40%, 75% y 80%, respectivamente (moles de 2-piridinación/moles de péptido). Se usó un gel de SDS-PAGE para caracterizar mejor los conjugados de péptido-polímero (figura 17). Con una relación molar de polímero/péptido de 1, una cantidad detectable del péptido formó dímeros por enlace disulfuro por la cisteína terminal. Sin embargo, la reacción del tiol con el disulfuro de piridilo estaba favorecida, y la banda del péptido libre ya no era visible con relaciones de polímero/péptido iguales o mayores que 2 (Figura 17A). Al tratar los conjugados con el agente de reducción TCEP, se podían escindir las uniones disulfuro del polímero-péptido como se indicaba por la aparición de la banda del péptido en estas muestras (figura 17B).

30 EJEMPLO 12. PROPIEDADES DESESTABILIZADORAS DE LA MEMBRANA DEPENDIENTES DEL pH DEL POLI[HPMA]-B-[(PAA)(BMA) (DMAEMA)]

[0183] Con el fin de evaluar la potencial actividad endosomolítica del polímero, se usó un ensayo de alteración de la membrana para medir la capacidad del polímero para producir la alteración dependiente del pH de las membranas de bicapa lipídica como se muestra en la figura 18. Se extrajo sangre entera humana y se centrifugó para separar el plasma. Los eritrocitos restantes se lavaron 3 veces con NaCl 150 mM y se volvieron a suspender en tampones de fosfato correspondientes a los entornos fisiológico (pH 7,4), endosómico temprano (pH 6,6) y endosómico tardío (pH 5,8). Se añadieron polímero (1-40 μ g/ml) o Triton X-100 al 1% a las suspensiones de eritrocitos y se incubaron durante 1 h a 37°C. Los eritrocitos intactos se sedimentaron por centrifugación, y se midió el contenido de hemoglobina en el líquido sobrenadante por absorbancia a 541 nm. Se determinó el porcentaje de hemólisis relativa al Triton X-100. La hemólisis del polímero se cuantificó en concentraciones en el intervalo de 1-40 μ g/ml con respecto al Triton X-100 al 1% v/v. Este experimento se completó 2 veces por triplicado, dando resultados similares. Los datos mostrados representan un solo experimento realizado por triplicado \pm desviación típica.

[0184] La hemólisis de los glóbulos rojos mide las propiedades de alteración de la membrana dependientes del pH del copolímero de dibloques a valores de pH que imitan los entornos fisiológico (pH 7,4), endosómico temprano (pH 6,6) y endosómico tardío (pH 5,8). A pH fisiológico no se observó alteración significativa de la membrana de los glóbulos rojos incluso con concentraciones de polímero tan altas como 40 μ g/ml (figura 18). Sin embargo, al disminuir el pH a valores endosómicos, se detectó un aumento significativo de la hemólisis, con mayor alteración de la membrana a pH 5,8 comparado con 6,6. El comportamiento hemolítico del polímero se correlacionaba con la concentración de polímero, con casi 70% de lisis de eritrocitos que se producía con 40 μ g/ml de polímero en tampón a pH 5,8. Este "cambio" agudo a una conformación desestabilizadora de la membrana a pH endosómico combinado con la actividad despreciable en la membrana a intervalos de pH fisiológico, indican el potencial para este polímero como vehículo de suministro intracelular no tóxico.

55

EJEMPLO 13. CARACTERIZACIÓN DEL SUMINISTRO INTRACELULAR EN CÉLULAS HELA

[0185] Se mantuvieron células de carcinoma de cuello uterino humano, HeLa (ATCC CCL-2), en medio esencial mínimo (MEM) que contenía L-glutamina, penicilina-estreptomina al 1% y FBS al 10%. Antes de los experimentos,

se dejó que las células HeLa se adhirieran durante la noche en portaobjetos compartimentados de 8 pocillos (20.000 células/pocillo) para microscopía o placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) para otros ensayos. Se añadieron los conjugados de polímero-péptido y los controles en MEM con FBS al 1%.

5 **[0186]** Se evaluó el potencial de suministro intracelular del polímero después de bioconjugación con el péptido Bak-BH3 fusionado con el péptido que penetra la célula Antp (penetratina). La fusión de BH3 a Antp se ha estudiado extensamente como un dominio de translocación celular y se ha encontrado previamente que produce la señalización apoptótica (Li y col. *Neoplasia* (New York, N.Y. 2007;9(10): 801-811). Sin embargo, se cree que los productos terapéuticos suministrados a través de dominios de transducción peptídicos pueden tener una potencia
10 impedida debido al secuestro en vesículas intracelulares (Sugita y col. *British Journal of Pharmacology*, 2008;153(6): 1143-1152). Los siguientes estudios in vitro demuestran que el suministro citoplasmático del péptido Antp-BH3 combinado y la funcionalidad proapoptótica eran potenciadas por conjugación al polímero de dibloques.

[0187] Análisis microscópico del escape endosómico conjugado. Se mezcló el éster de succinimidilo de Alexa-488
15 reactivo con amina en una relación molar de 1 a 1 con el péptido Antp-BH3 en dimetilformamida anhidra (DMF). El fluoróforo sin reaccionar y el disolvente orgánico se separaron usando una columna de desalación PD10, y el péptido marcado por fluorescencia se liofilizó. Se conjugó Antp-BH3 marcado con Alexa-488 con el polímero como se ha descrito antes. Se aplicó el péptido libre o el conjugado de polímero-péptido a células HeLa cultivadas en portaobjetos de microscopio compartimentados en una concentración de Antp-BH3 25 μ M. Las células se trataron
20 durante 15 min, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio de nueva aportación durante 30 min adicionales. Las muestras se volvieron a lavar y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a 37°C. Se montaron los portaobjetos con reactivo ProLong Gold Antifade que contenía DAPI y se generaron las imágenes usando un microscopio de fluorescencia.

25 **[0188]** Para estudiar los efectos de la conjugación del polímero en el escape endosómico de péptidos, el péptido marcado con Alexa-488 se analizó por microscopía de fluorescencia. El péptido marcado por fluorescencia se suministró solo o como el bioconjugado del polímero. El análisis por microscopio puso de manifiesto diferencias
30 claras en la localización intracelular del péptido después de conjugación del polímero (figura 19). El péptido solo presentó una tinción puntiforme, indicativa de la compartimentalización endosómica. Las muestras que suministraban conjugado de polímero-péptido presentaban un patrón de fluorescencia disperso, que consistía en la
35 difusión del péptido por el citoplasma. Las imágenes representativas que ilustraban (figura 19A) la tinción puntiforme del péptido (verde) en las muestras suministraron péptido solo y (figura 19B) dispersaron la fluorescencia del péptido dentro del citosol después de suministrar el conjugado de péptido-polímero. Las muestras se trataron durante 15 min con péptido 25 μ M y se prepararon para el examen microscópico después de la tinción nuclear con DAPI (azul).

[0189] Medición de la citotoxicidad conjugada. La eficacia bioconjugada para producir la muerte de células
40 tumorales se determinó usando un ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH). Al final de cada tiempo de medición, las células se lavaron dos veces con PBS y después se lisaron con tampón de lisis celular (100 μ l/pocillo, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, β -glicerolfosfato 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM) durante 1 h a 4°C. Se diluyeron 20 μ l de lisato de cada muestra en 80 μ l de PBS y se cuantificó la LDH mezclando con 100 μ l de disolución de sustrato de LDH. Después de una incubación de 10 min, se determinó la LDH midiendo la absorbancia a 490 nm. El porcentaje de viabilidad se expresó con respecto a las muestras que no recibieron tratamiento.

45 **[0190]** Para evaluar la bioactividad del conjugado de polímero-péptido, se llevó a cabo un estudio de citotoxicidad en células de cáncer de cuello uterino HeLa. Se encontró que el conjugado de Antp-BH3-polímero producía potencialmente la muerte de células HeLa de una forma dependiente de la dosis. Se detectó una viabilidad de las células HeLa menor de 50% después de 6 h de tratamiento con conjugado peptídico 10 μ M (figura 20A), y las
50 muestras que recibieron el conjugado peptídico 25 μ M (figura 20B) mostraron pocas, si mostraban alguna, células viables después de tan poco como 4 h de exposición. Las muestras de control que recibieron solo péptido o polímero presentaron un efecto del tratamiento despreciable, y no había diferencia entre estos grupos de tratamiento de control. Es importante que los conjugados de Antp-BH3 y poli(HPMA) que carecían de bloque sensible al pH eran similares a ambos grupos de control y no produjeron una toxicidad significativa, validando más la funcionalidad del bloque endosomolítico (figura 20).

55 **[0191]** Evaluación por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial. Se evaluó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, un indicador de la apoptosis conocido, usando el colorante JC-1. JC-1 presenta fluorescencia verde cuando se dispersa en el citosol y en células sanas, forma agregados rojo-fluorescentes en la membrana mitocondrial (Cossarizza y col., *Biochemical and biophysical research*

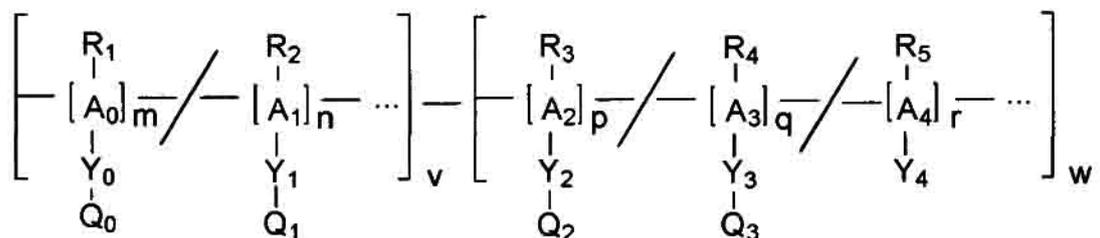
communications. 1993;197(1):40-45). Las células HeLa se incubaron durante 2 h con péptido 10 μ M o conjugado equivalente o polímero solo. Se añadió JC-1 con una concentración final de 5 μ g/ml y se incubó durante 15 min. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se tripsinizaron y se volvieron a suspender en BSA al 0,5% para el análisis por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de células que presentaban despolarización mitocondrial basándose en el número de células verdes fluorescentes que eran negativas para la fluorescencia roja. Aquí, se detectó una pérdida significativa de agregados JC-1 de fluorescencia roja y por lo tanto una pérdida de polarización mitocondrial después de tratamiento tanto con el péptido Antp-BH3 como con el conjugado de polímero-péptido (figura 21A). Los controles de polímero eran similares a las células que no recibieron tratamiento, mientras que Antp-BH3 solo y en un conjugado de polímero dio como resultado un aumento de aproximadamente 4 y 10 veces, respectivamente, del porcentaje de células que presentaban pérdida de la polaridad mitocondrial.

[0192] Ensayo de actividad de la caspasa 3/7. Se midió la activación de la caspasa 3/7 usando un kit de ensayo disponible en el comercio. Este ensayo se usa como un sustrato de caspasa 3/7 profluorescente que una vez escindido enzimáticamente se vuelve fluorescente permitiendo la determinación de la actividad enzimática relativa, usando un lector de placa de fluorescencia. Aquí, las células HeLa se incubaron durante 30 min con péptido 25 μ M (solo o como conjugado con polímero) además del polímero solo en una cantidad equivalente a las muestras de conjugado. Después, se añadió un indicador fluorogénico de caspasa 3/7 directamente al medio de cultivo de cada muestra. Las placas se agitaron durante 1 h y después se ensayaron usando un lector de placa de fluorescencia. Los datos se expresaron como porcentaje de actividad de la caspasa con respecto a las muestras que no recibieron tratamiento.

[0193] La activación de las caspasas 3 y 7, que es indicativa de la señalización proapoptótica, se puede medir usando un sustrato profluorescente específico para estas proteasas. La figura 21B muestra que los controles que contienen solo el polímero presentaban actividad de caspasa equivalente con respecto a los controles negativos que no recibieron tratamiento. Sin embargo, se detectó una rápida activación de la caspasa (aproximadamente 2,5 veces) después de tratamiento con el propio péptido Antp-BH3 o en la forma conjugada con polímero. Los efectos similares de Antp-BH3 solo o como un conjugado de polímero podrían indicar que la señalización de la caspasa está saturada por el tratamiento con el péptido solo o que existen otros mecanismos de retroalimentación positiva para la amplificación de perturbaciones en el estado de activación de la caspasa. Estos resultados sugieren mínimamente que no había impedimento estérico u otras reducciones en la actividad de la caspasa inducida por el péptido como resultado de la conjugación al polímero.

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero que comprende:
- 5 (a) un primer bloque que comprende una primera unidad constitutiva que es hidrófila a pH fisiológico normal;
- (b) un segundo bloque que comprende:
- (i) una segunda unidad constitutiva que es catiónica a pH fisiológico normal y que puede ser igual o diferente de la primera unidad constitutiva;
- 10 (ii) una tercera unidad constitutiva que es aniónica a pH fisiológico normal;
- (iii) un resto potenciador de la hidrofobicidad en el que:
- 15 el resto potenciador de la hidrofobicidad está covalentemente unido a la segunda unidad constitutiva;
- el resto potenciador de la hidrofobicidad está covalentemente unido a la tercera unidad constitutiva;
- 20 el resto potenciador de la hidrofobicidad está compuesto de una cuarta unidad constitutiva del segundo bloque; o cualquier combinación de los mismos.
2. El copolímero de la reivindicación 1, en el que el segundo bloque es sustancialmente neutro en la
- 25 carga total.
3. El copolímero de la reivindicación 1 ó 2, en el que el copolímero es un copolímero de dibloques.
4. El copolímero de la reivindicación 1 ó 2, en el que la primera unidad constitutiva es catiónica.
- 30 5. El copolímero de la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer bloque comprende una pluralidad de unidades constitutivas.
6. El copolímero de la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo bloque comprende una pluralidad de
- 35 segundas unidades constitutivas, una pluralidad de terceras unidades constitutivas y una pluralidad de restos potenciadores de la hidrofobicidad.
7. El copolímero de la reivindicación 1, en el que el primer bloque de polímero es de aproximadamente
- 40 2.000 daltons a aproximadamente 30.000 daltons.
8. El copolímero de la reivindicación 1, que comprende la fórmula química I:



(I)

- 45 A₀, A₁, A₂, A₃ y A₄ se seleccionan del grupo que consiste en -C-, -C-C-, -C(O)(C)_aC(O)O-, -O(C)_aC(O)- y -O(C)_bO-; en los que,
- a es 1-4;

b es 2-4;

Y₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C), cicloalquilo (3C-6C), O-alquilo(1C-10C), -C(O)O-alquilo(1C-10C), C(O)NR₆(1C-10C), y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor;

Y₀, Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C)-, -C(O)O-alquilo(2C-10C)-, -OC(O)-alquilo(1C-10C)-, -O-alquilo(2C-10C)- y -S-alquilo(2C-10C)-, -C(O)NR₆-alquilo(2C-10C)-;

10

Y₃ se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, alquilo (1C-10C) y arilo (6C-10C); en los que los átomos de carbono tetravalentes de A₁-A₄ que no están completamente sustituidos con R₁-R₅ e Y₀-Y₄ están completados con un número adecuado de átomos de hidrógeno;

15 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -CN, alquilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

Q₀ es un resto seleccionado del grupo que consiste en restos que son hidrófilos a pH fisiológico; restos que se pueden conjugar o funcionalizar; o hidrógeno;

Q₁ es un resto que es hidrófilo a pH fisiológico normal;

Q₂ es un resto que tiene carga positiva a pH fisiológico normal;

25

Q₃ es un resto que tiene carga negativa a pH fisiológico normal, pero sufre protonación a pH más bajo;

m es de aproximadamente 0 a menos de 1,0;

30 n es mayor que 0 hasta aproximadamente 1,0; en los que $m + n = 1$;

p es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5;

q es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5; en los que p es sustancialmente el mismo que q;

35

r es de 0 a aproximadamente 0,6; en los que $p + q + r = 1$;

v es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa; y,

40 w es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kDa.

9. El copolímero de la reivindicación 8, en el que Q₁ es un resto que tiene carga positiva a pH fisiológico normal; carga negativa a pH fisiológico normal pero sufre protonación a pH más bajo; neutro a pH fisiológico normal; o ion híbrido a pH fisiológico normal.

45

10. El copolímero de la reivindicación 8 ó 9, en el que la relación de v:w es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3.

11. El copolímero de la reivindicación 1, 2, 8 ó 9, que además comprende un agente terapéutico.

50

12. El copolímero de la reivindicación 11, en el que el agente terapéutico está asociado con el copolímero.

13. El copolímero de la reivindicación 12, en el que el agente terapéutico es un ARNip.

55 14. El copolímero de la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico está covalentemente unido al copolímero; o en el que el agente terapéutico está asociado iónicamente con el copolímero.

15. Un copolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar en la inhibición de la expresión génica; o para usar en el suministro intracelular de un polinucleótido.

60

FIG. 1A

Polímero	Estructura [D] _{Mw1} -[Bx-Py-Dz] _{Mw2}	Mn kDa	Relación de bloques Mw ₂ /Mw ₁
P7v1	[D] _{9,1K} -[B ₄₈ -P ₂₉ -D ₂₃] _{11,37K}	19	1,2
P7v2	[D] _{10K} -[B ₄₆ -P ₁₈ -D ₃₇] _{8,9K}	19	0,9
P7v3	[D] _{6,5K} -[B ₄₁ -P ₃₉ -D ₂₀] _{9,5K}	16	1.5
P7v6	[D] _{9,1K} -[B ₅₂ -P ₂₆ -D ₂₂] _{21,9K}	31	2,4

x, y, z SON % EN MOLES. LOS PESOS MOLECULARES SE DETERMINARON POR CROMATOGRAFÍA DE GEL PERMEABLE USANDO REFERENCIAS DE PMMA. LAS COMPOSICIONES SE DETERMINARON POR ESPECTROSCOPIA DE RMN.

FIG. 1B

Polímero	Estructura [D] _{Mw1} -[Bx-Py-Dz] _{Mw2}	Relación de bloques Mw ₂ /Mw ₁	Tamaño de partículas (nm)
PRX-1	[D] _{11,3K} -[B ₅₀ -P ₃₀ -D ₂₀] _{20,7K}	1,83	41
PRX-2	[D] _{14,5K} -[B ₅₇ -P ₂₃ -D ₂₀] _{26,4K}	1,82	49
PRX-3	[D] _{11,5K} -[B ₃₅ -P ₂₇ -D ₃₈] _{33,4K}	2,92	60
PRX-4	[D] _{10,7K} -[B ₅₀ -P ₂₇ -D ₂₃] _{33,8K}	3,16	50
PRX-5	[D] _{10,7K} -[B ₄₀ -P ₃₁ -D ₂₉] _{32,2K}	3,00	59
PRX-6	[D] _{14,5K} -[B ₅₃ -P ₃₁ -D ₁₆] _{67,0K}	4,62	115

FIG. 2

SÍNTESIS DE [PEGMA_w]-[B-P-D]

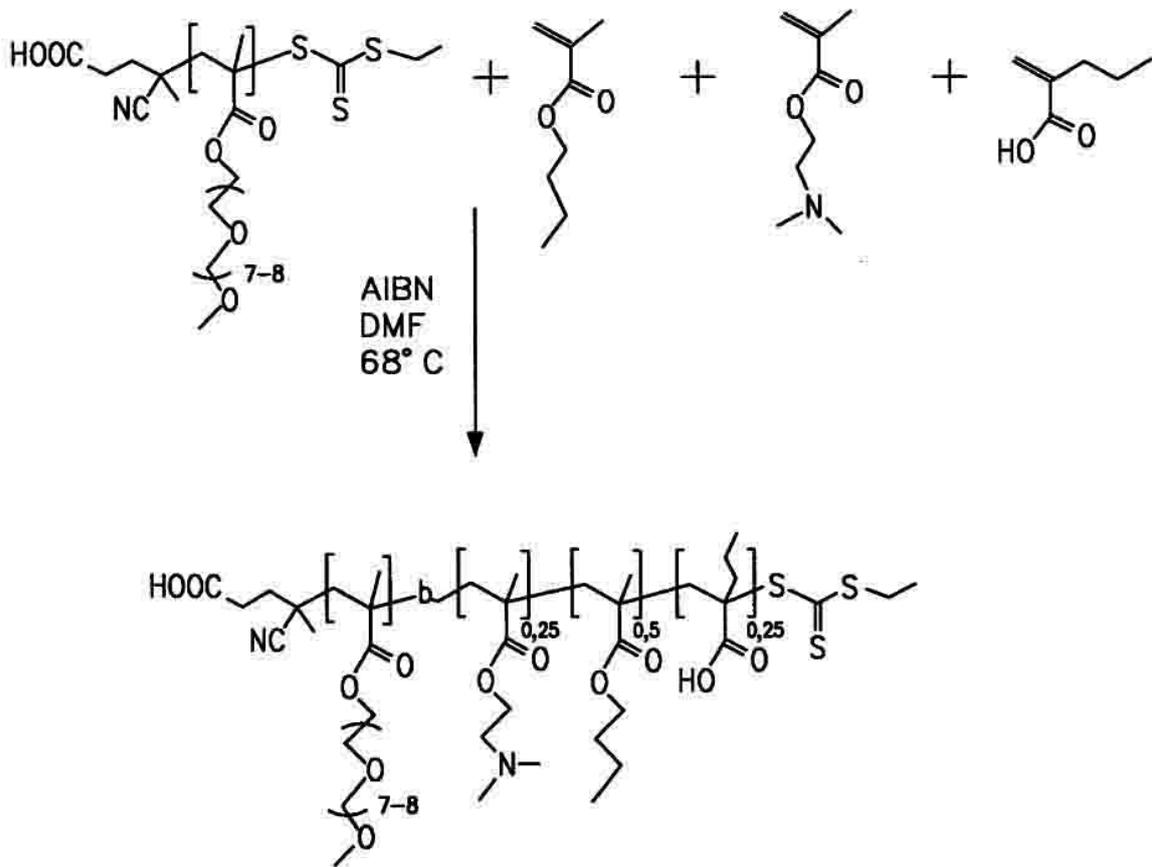


FIG. 3A
 CARACTERIZACIÓN DE P7-PEGMA 100-40 kDa

POLÍMERO	PRIMER BLOQUE		SEGUNDO BLOQUE				
	Mn (kDa)	PDI	Mn (kDa)	PDI	PEGMA (mol)	DMAEMA (mol)	PAA (mol)
P7-PEGMA100 40kDa	40,12	1,34	59,3	1,40	53	26	21

FIG. 3B

P7-PEGMA100-40kDa

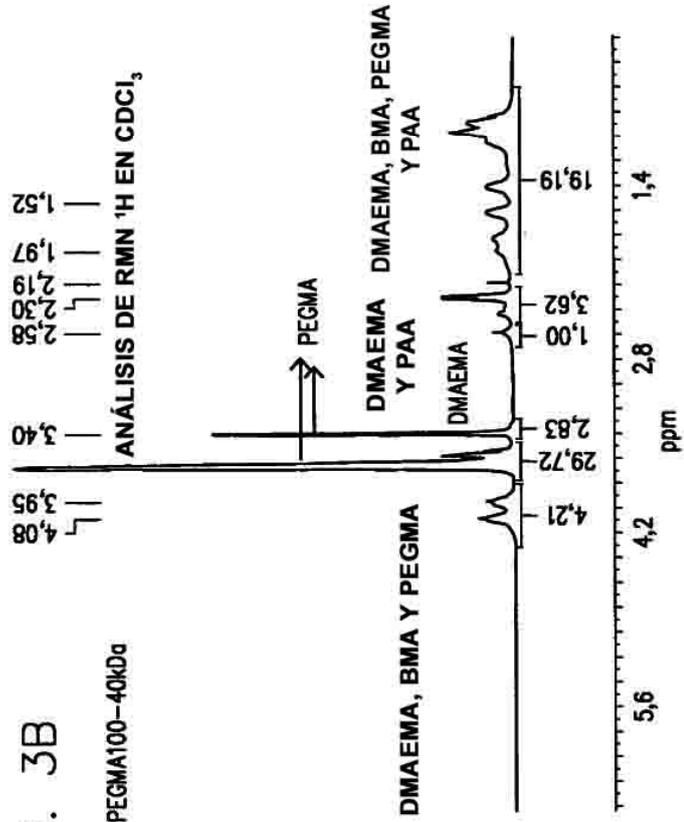


FIG. 3C

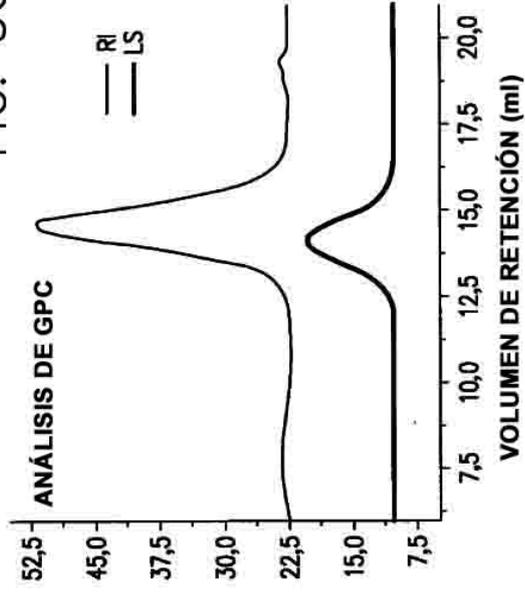
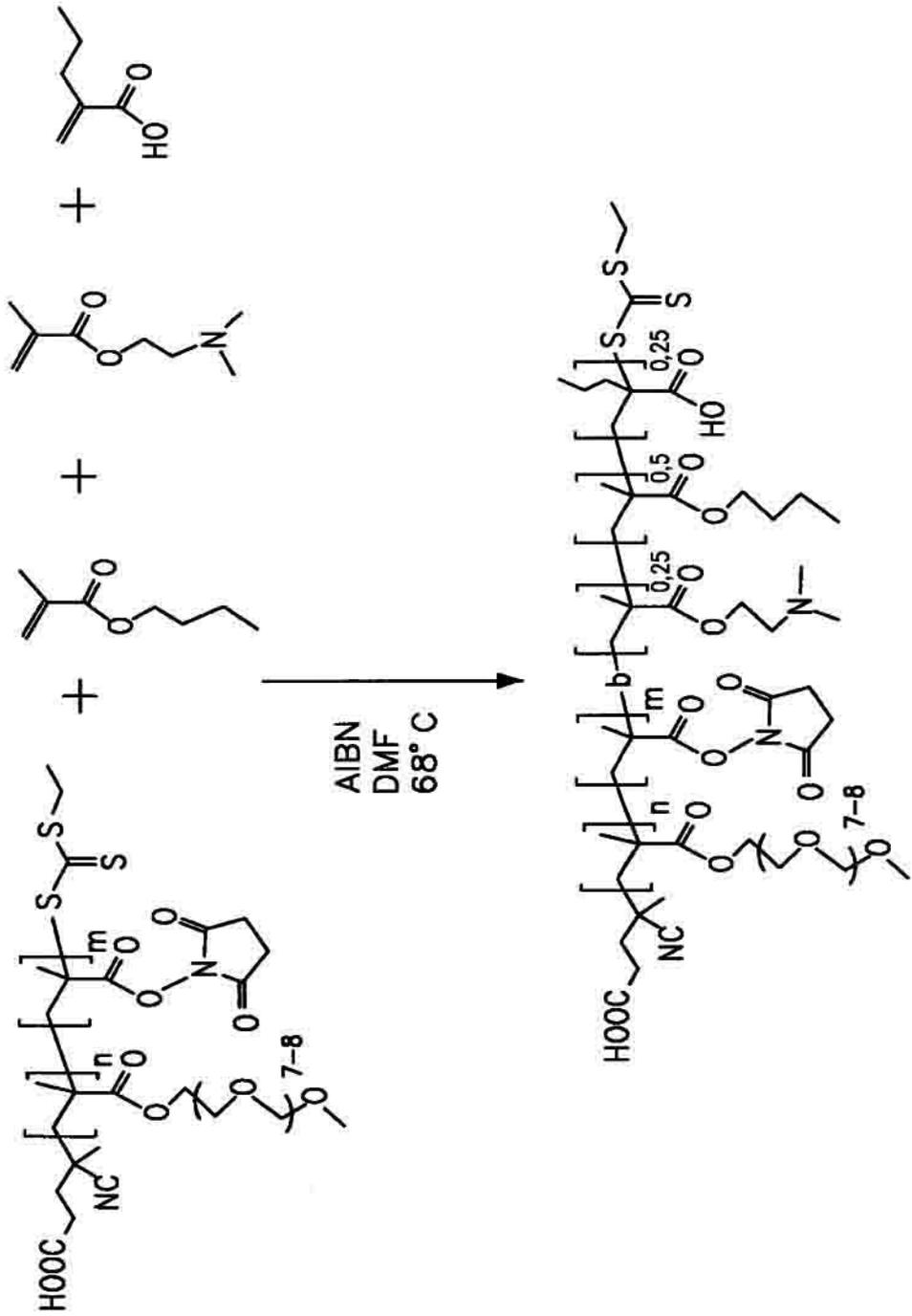


FIG. 5

SÍNTESIS DE [PEGMA_w-MAA(NHS)]-[B-P-D]



COPOLIMERIZACIÓN POR RAFT DE PEGMA Y MAA-NHS

[PEGMA]: [MAA-NHS]=75: 25

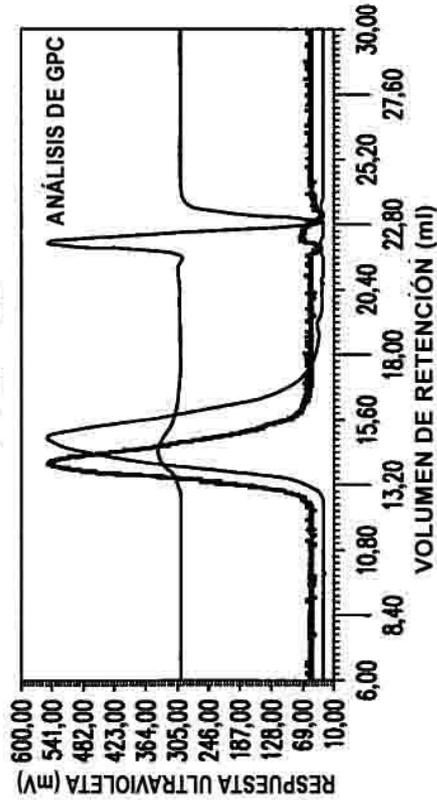
NOMBRE	Fw (g/mol)	EQUIV.	Mol	PESO	PESO REAL
PEGMA	475	112,5	$5,5958 \times 10^{-3}$	2,658g	2,6641g
MAA-NHS	183,16	37,5	$1,8672 \times 10^{-3}$	0,342g	0,3422g
ECT	263,4	1	$4,9740 \times 10^{-5}$	13,1mg	13,8mg
AIBN	164,21	0,04	$1,9896 \times 10^{-6}$	0,33mg	0,34mg

FIG. 6A

DMF = 3,0 g; PURGADO N₂: 30 min; POLIMERIZACIÓN REALIZADA A 68°C. TIEMPO DE POLIM. = 2 h 5 min

LOS COPOLÍMEROS SE DIALIZARON FRENTE A METANOL (1 litro X 8) DURANTE 50 h, USANDO MEMBRANA DE MWCO DE 2 k; EL METANOL SE ELIMINÓ BAJO LA CAMPANA EXTRACTORA, SE SECÓ A VACÍO 3 h, FINALMENTE SE LIOFILIZÓ DURANTE 3 h.

FIG. 6B



$dn/dc = 0,0465$
 $M_n, GPC = 33.000$ g/mol
 $PDI = 1,42$

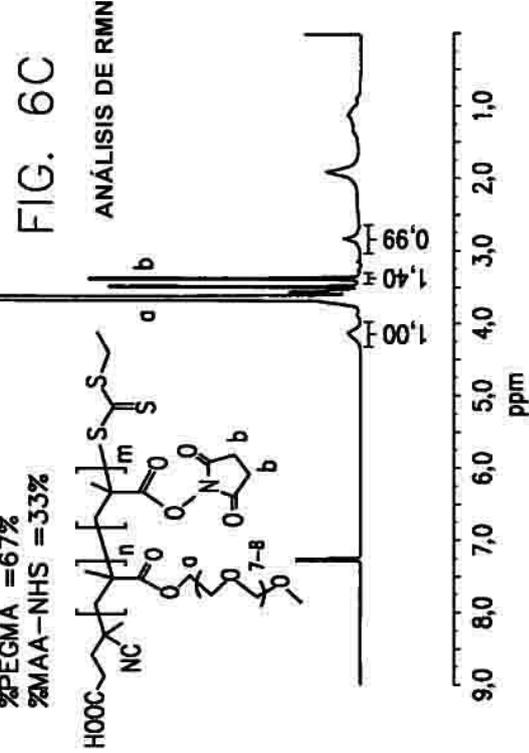


FIG. 6C

%PEGMA = 67%
 %MAA-NHS = 33%

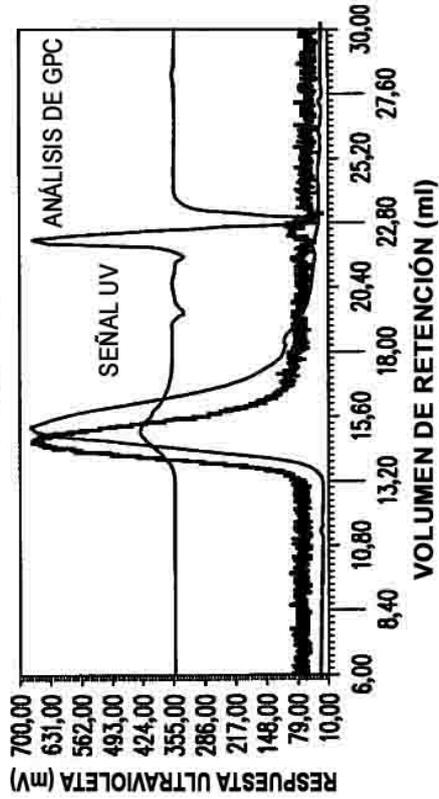
FIG. 7A

[DMAEMA]: [MAA-NHS]=75:25

NOMBRE	Fw (g/mol)	EQUIV.	Mol	PESO	PESO REAL
DMAEMA	157,21	112,5	0,013745	2,161g	2,1668g
MAA-NHS	183,16	37,5	4,5882x10 ⁻³	0,839g	0,8430g
ECT	263,4	1	2,22186x10 ⁻⁴	32,2mg	32,4mg
AIBN	164,21	0,04	4,8774x10 ⁻⁵	0,802mg	0,812mg

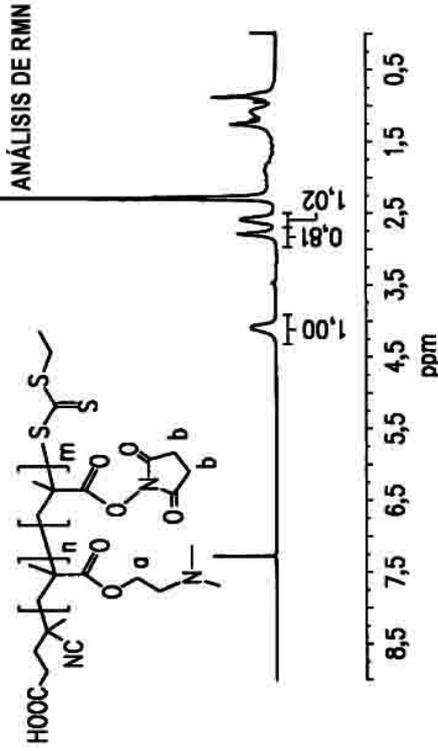
DMF = 3,0 g; PURGADO N₂: 30 min; POLIMERIZACIÓN REALIZADA A 68°C. TIEMPO DE POLIM. = 2 h 30 min

FIG. 7B



dn/dc=0,0704
M_n, GPC=13.660 g/mol
PDI=1,33

FIG. 7C



%DMAEMA = 71,2%
%MAA-NHS = 28,8%

COPOLIMERIZACIÓN POR RAFT DE DMAEMA Y MAA-NHS

FIG. 8

SÍNTESIS DE PDSMA

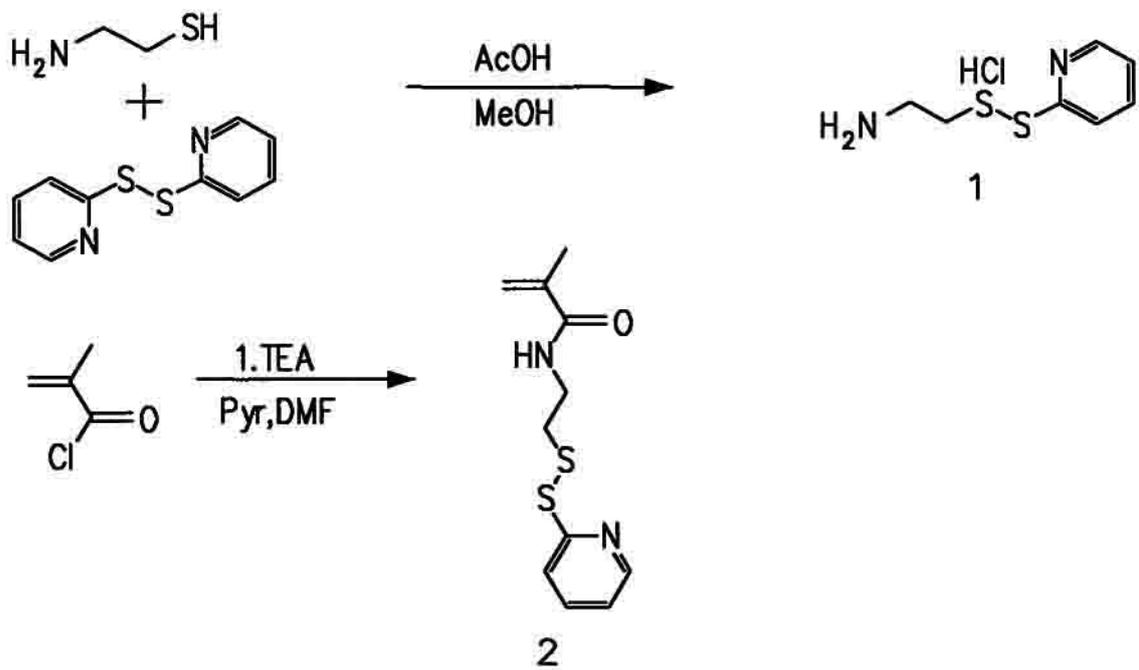


FIG. 9

SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO DE HPMA-PDSMA PARA LA CONJUGACIÓN CON ARNip

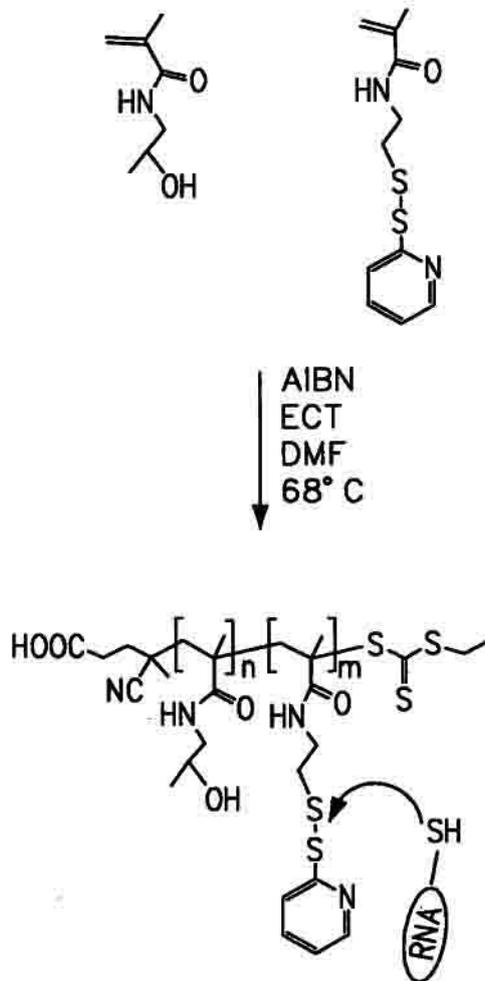


FIG. 10A

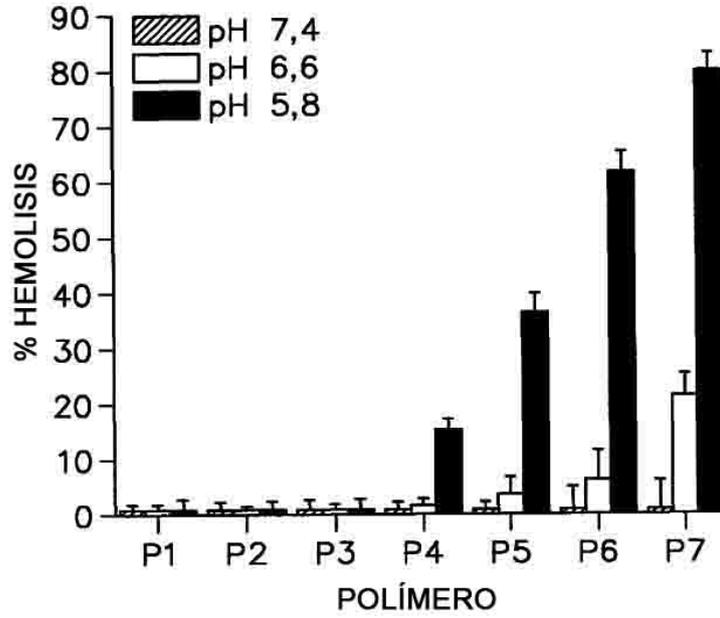


FIG. 10B

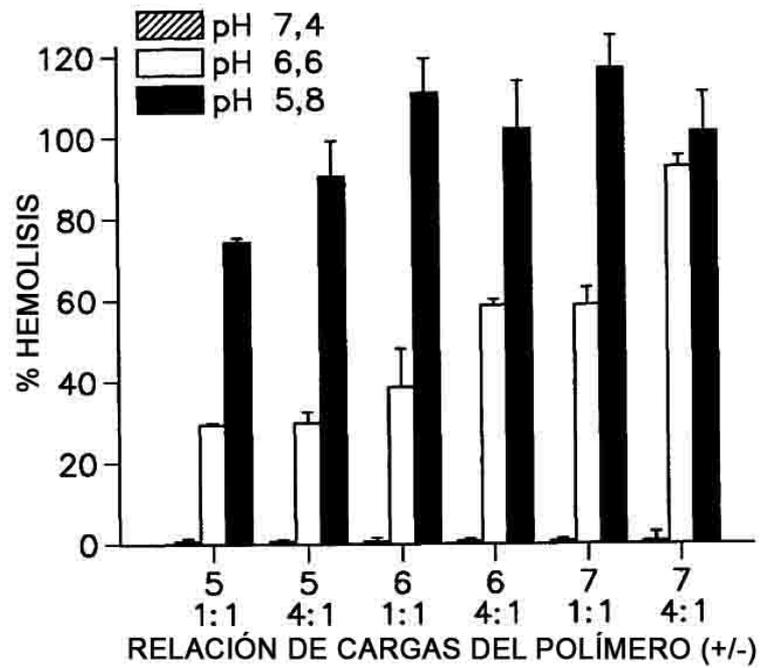


FIG. 11

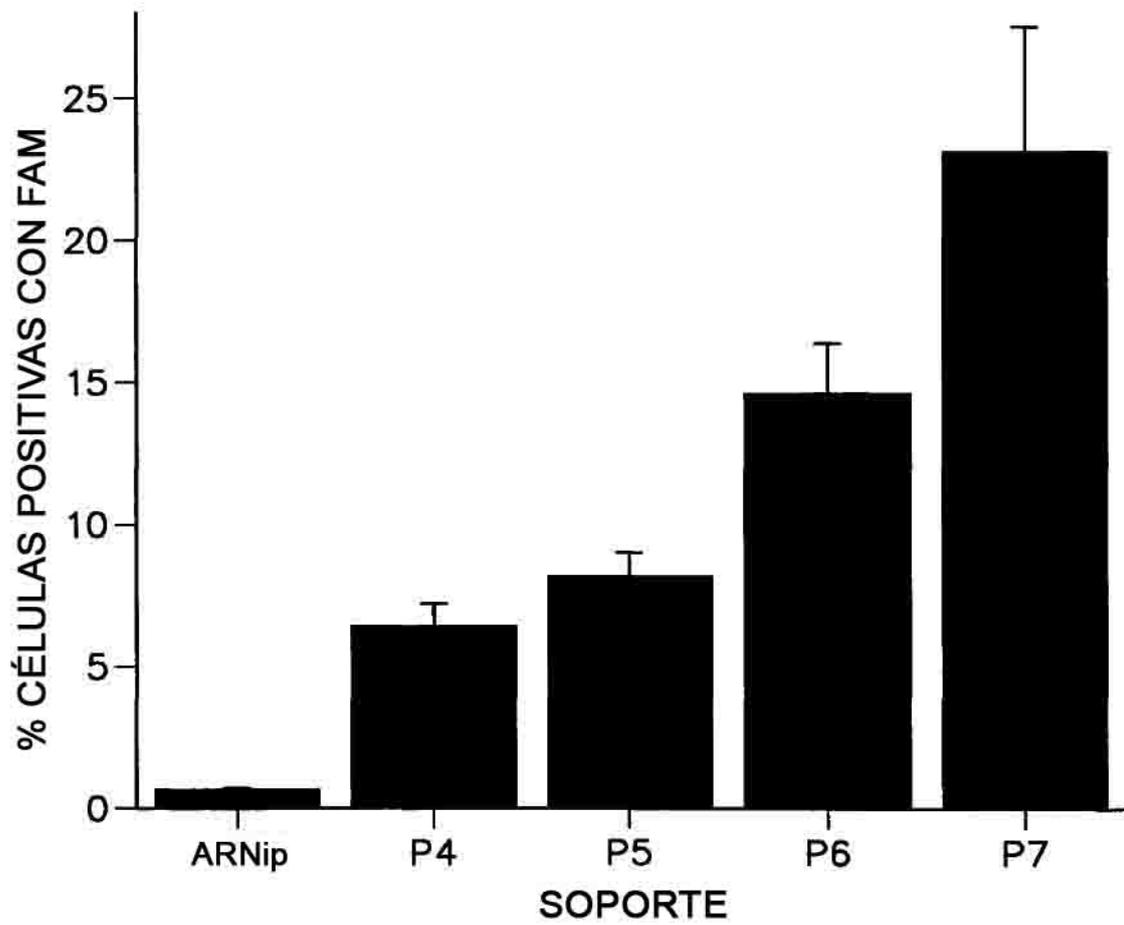


FIG. 12A

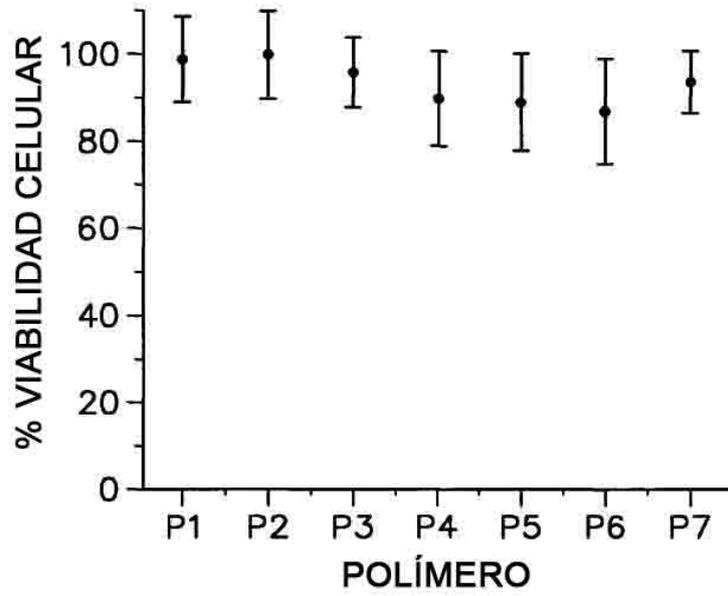


FIG. 12B

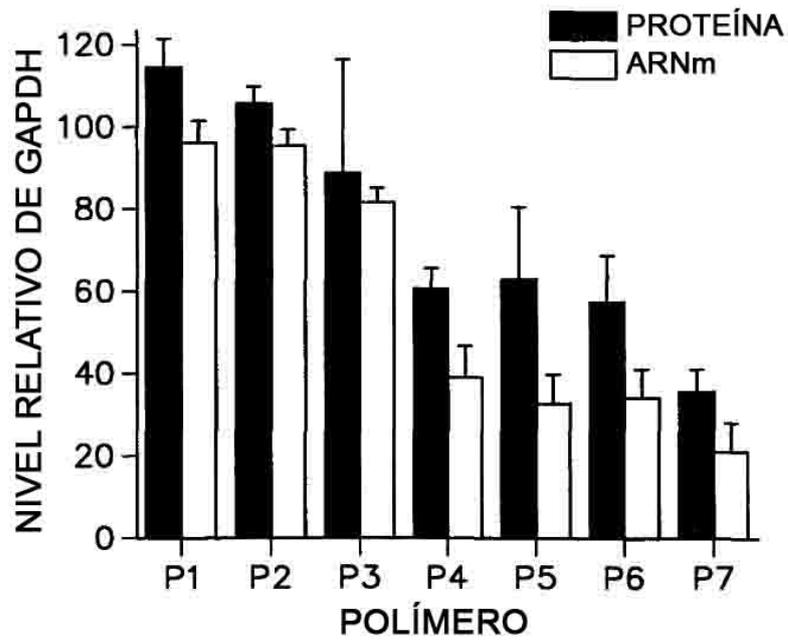


FIG. 13A

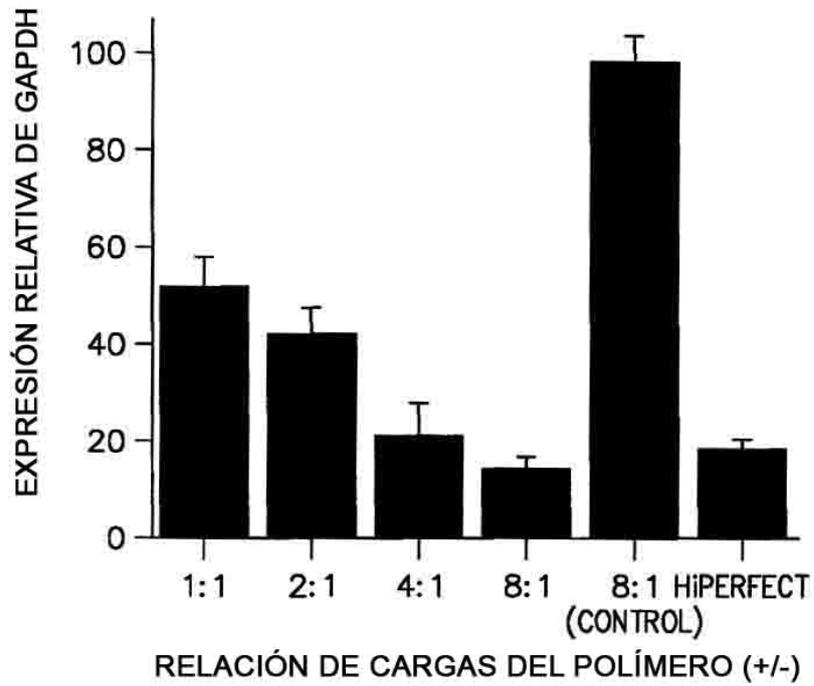


FIG. 13B

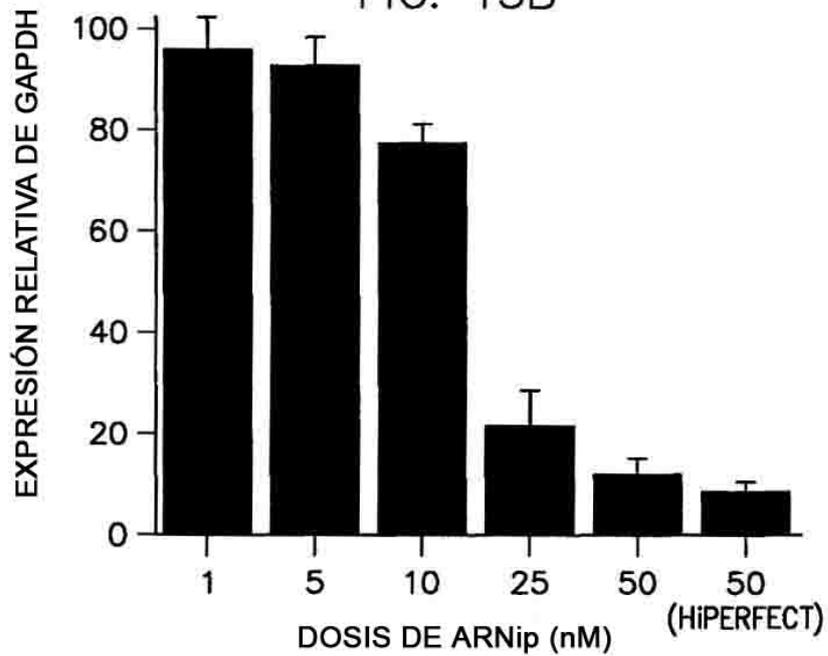
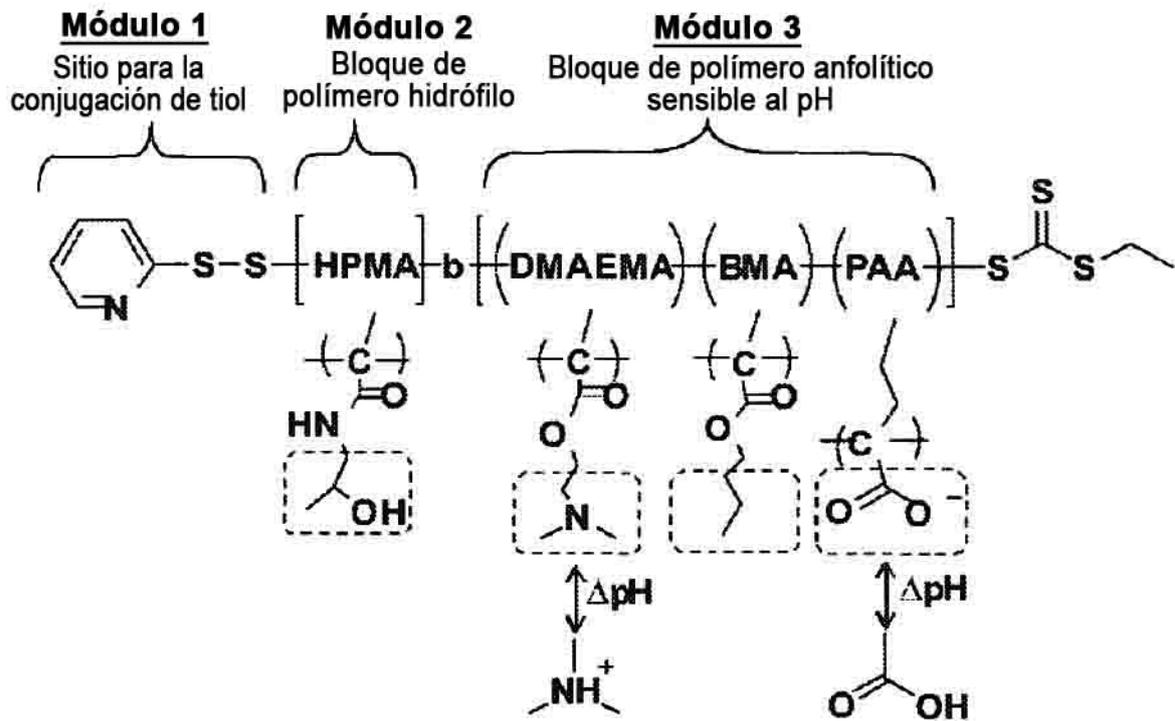
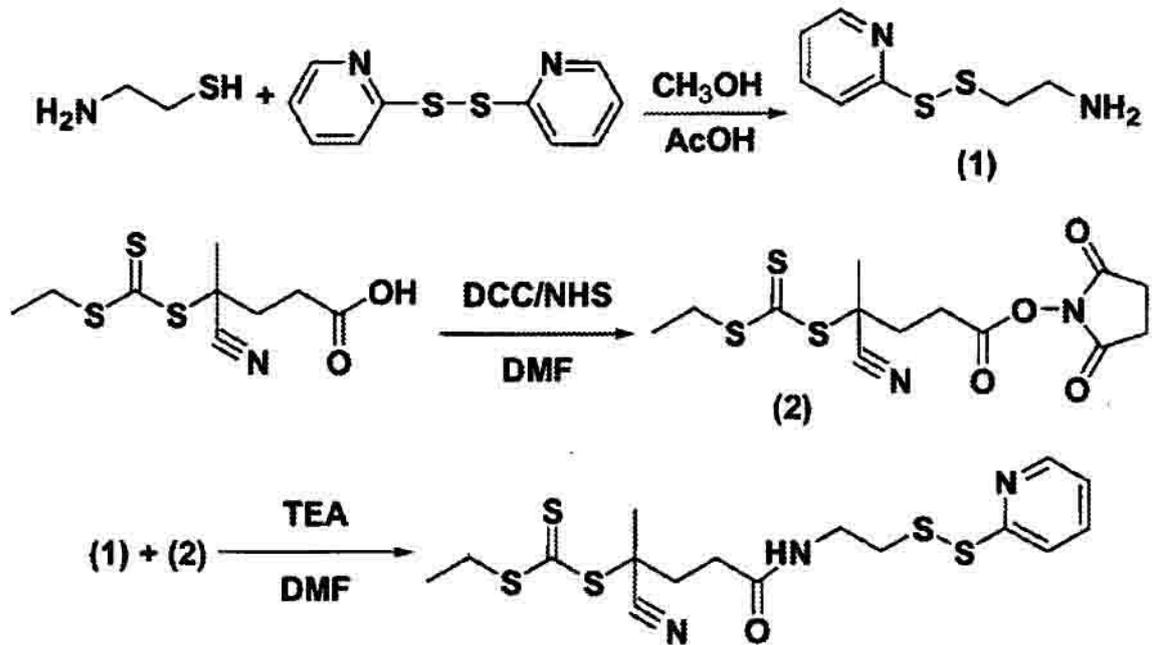


FIG. 14



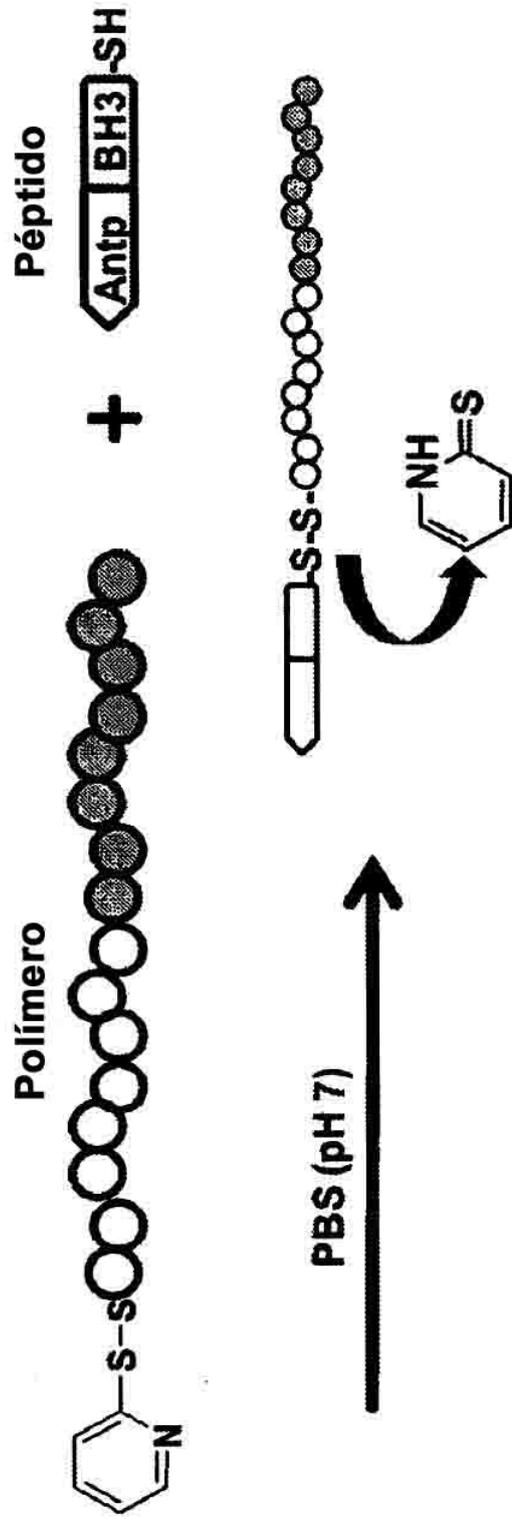
DISEÑO DEL POLÍMERO Poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]

FIG. 15



SÍNTESIS DE DISULFURO DE PIRIDILO-CTA

FIG. 16



CONJUGACIÓN DE POLÍMERO-PÉPTIDO POR REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE DISULFURO

FIG. 17B

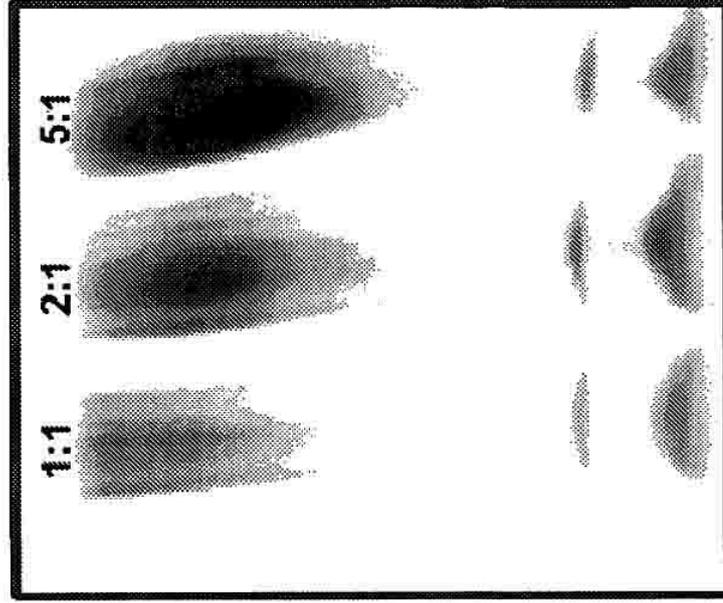
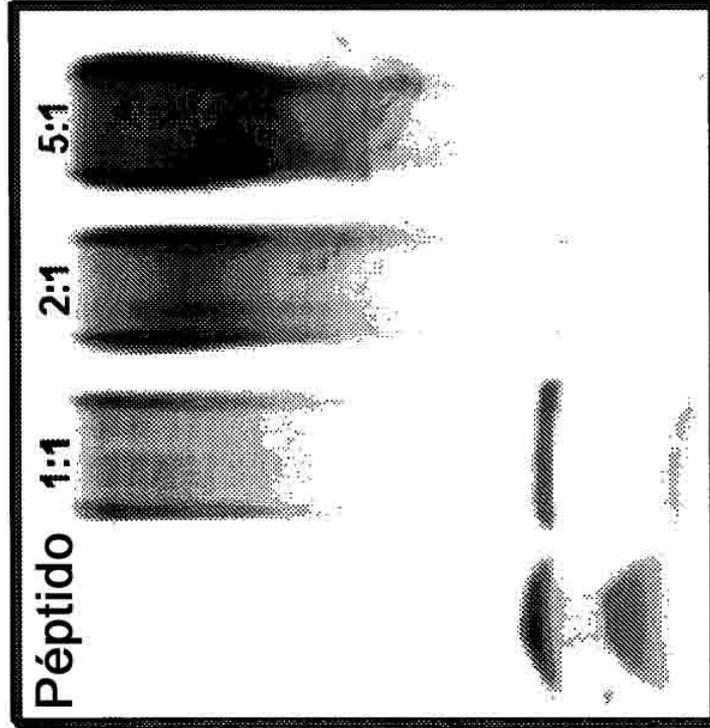
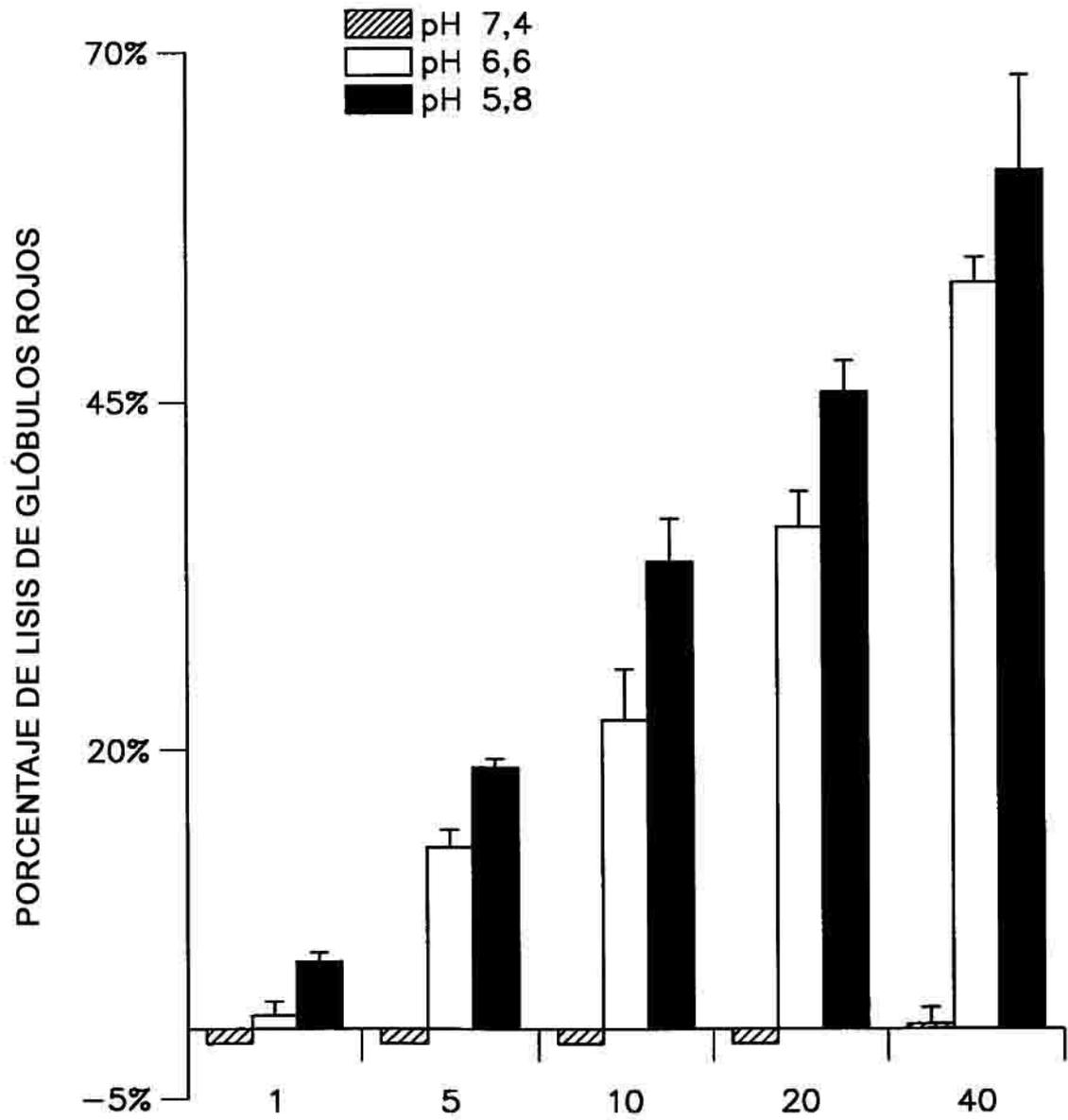


FIG.17A



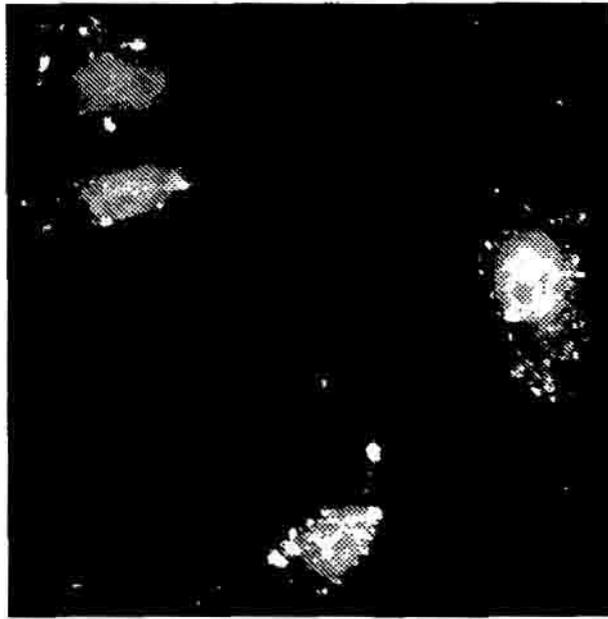
GEL DE SDS-PAGE QUE CONFIRMA LA CONJUGACIÓN DE POLÍMERO-PÉPTIDO POR UNA UNIÓN DISULFURO REDUCIBLE

FIG. 18



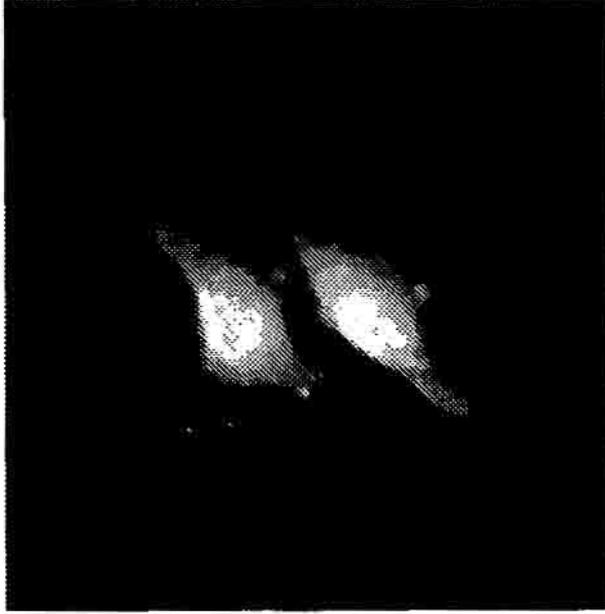
ALTERACIÓN DE MEMBRANA DEPENDIENTE DEL pH POR EL Poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]

FIG. 19A



PÉPTIDO

FIG. 19B



CONJUGADO

SUMINISTRO INTRACELULAR DE PÉPTIDO POTENCIADO POR EL POLÍMERO

FIG. 20B

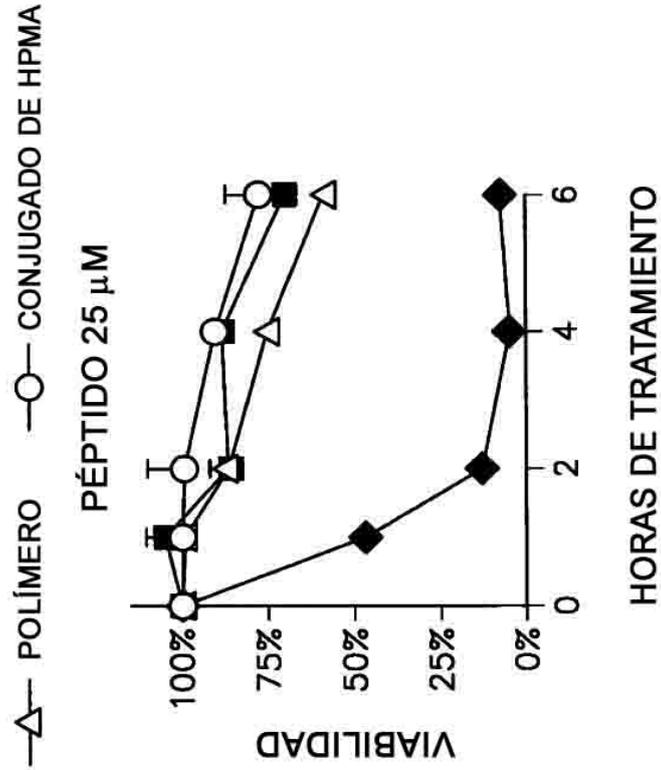
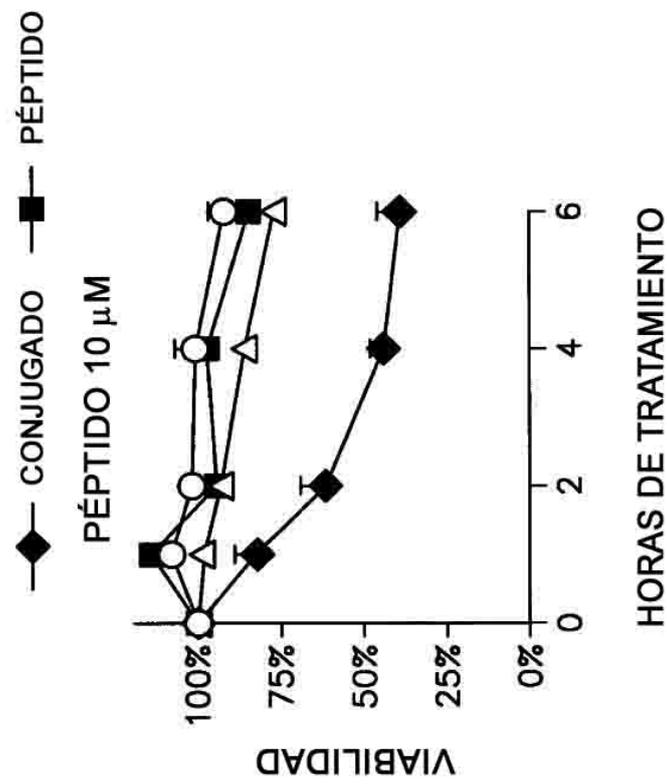


FIG. 20A



INDUCCIÓN POR EL CONJUGADO Poli[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]-Antp-BH3 DE LA MUERTE DE CÉLULAS HeLa

FIG. 21B

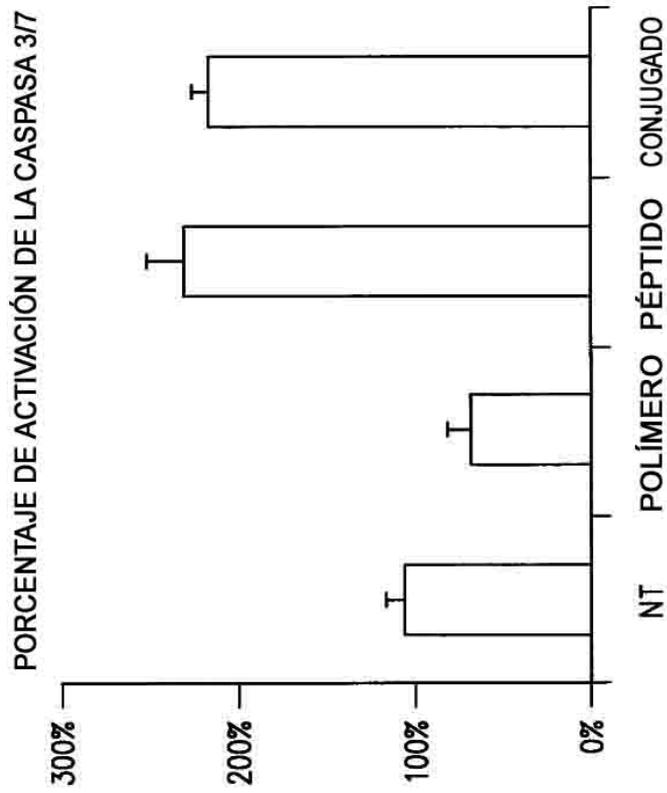
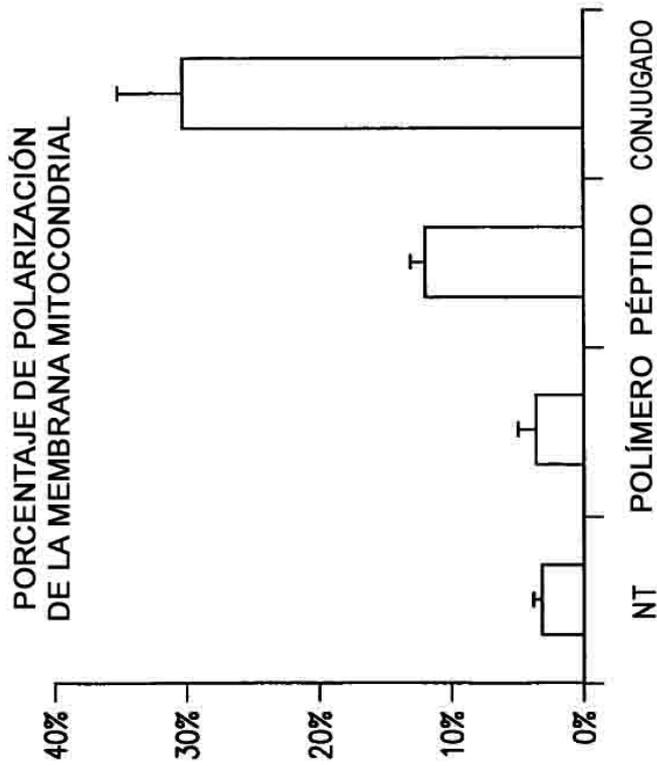


FIG. 21A



BIOACTIVIDAD DE CONJUGADOS PEPTÍDICOS