

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 416**

51 Int. Cl.:

**C08G 69/48** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C08G 69/08** (2006.01)  
**C08G 81/00** (2006.01)  
**C08L 77/00** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2010 E 10741313 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2399948**

54 Título: **Poliaminoácidos catiónicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**13.02.2009 JP 2009031799**

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

**16.07.2014**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)  
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku  
Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**KATAOKA, KAZUNORI;  
WU, SHOURONG;  
ISHII, TAKEHIKO;  
KIM, HYUNJIN;  
MIYATA, KANJIRO y  
NISHIYAMA, NOBUHIRO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 477 416 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

Poli aminoácidos catiónicos y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un poli aminoácido catiónico que tiene un grupo hidrófobo introducido en parte de una cadena lateral. Más específicamente, la presente invención se refiere a un poli aminoácido catiónico que tiene una cadena lateral que tiene una pluralidad de diferentes grupos funcionales amina en un resto que incluye un grupo catiónico y que tiene un grupo hidrófobo introducido en parte de la cadena lateral, y un complejo poli iónico (PIC) del poli aminoácido y un oligo o polinucleótido.

**Técnica anterior**

15 La aplicación de ARNip a tratamientos médicos se espera cada vez más debido a que el ARNip puede silenciar ARNm diana específica y eficazmente. Sin embargo, el desarrollo de un sistema de suministro eficaz es indispensable para aplicar el ARNip a tratamientos médicos. En los últimos años, se ha aclarado que un efecto terapéutico de ARNip desnudo sobre la degeneración macular relacionada con la edad (CNV) a través de su administración intraocular en un ensayo clínico no resulta de un efecto de silenciamiento génico específico de secuencia inducido por ARNip sino que resulta de un efecto no específico de secuencia mediante reconocimiento por receptor de tipo Toll-3 (TLR-3) sobre la superficie celular. Se ha considerado importante desarrollar un portador que sea estable fuera de las células y que pueda suministrar con precisión ARNip al interior de células en cualquiera de las aplicaciones de ARNip *in vivo*.

25 La poli(L-lisina) o polietilenimina, que hace tiempo que se conoce como polímero catiónico para formar un complejo poli iónico (PIC) con ADN para introducir un gen en células eucariotas y expresar el gen, tiene un problema porque el compuesto no presenta eficiencia de expresión génica muy alta o presenta alta toxicidad en las células, por ejemplo. Se han proporcionado una amplia variedad de polímeros catiónicos con el fin de solucionar tal problema. Por ejemplo, un derivado de poli(L-lisina) en el que se han introducido un grupo hidrófilo (por ejemplo, polietilenglicol) y un grupo hidrófobo (por ejemplo, palmitoilo) mediante un grupo  $\epsilon$ -amino de poli(L-lisina) forma una vesícula en presencia de colesterol en un medio acuoso y la vesícula agrega ADN de plásmido que contiene genes para formar un complejo estable (documento de patente 1). Además, un PIC formado por ADN de plásmido con un derivado de copolímero cuya carga catiónica y densidad de reticulación de disulfuro se han modulado mediante la tiolación de un grupo  $\epsilon$ -amino de poli(L-lisina) en un copolímero de poli(L-lisina)-polietilenglicol muestra alta estabilidad en un medio extracelular y libera de manera eficaz el ADN en un compartimento intracelular (documento no de patente 1, algunos de los inventores de la presente invención son coautores del documento no de patente 1). Además, los inventores de la presente invención han confirmado, como parte de tal investigación, que, cuando se producen poli(N-[N-(2-aminoetil)-2-aminoetil]aspartamida (PAsp(DET))) que tiene una estructura de etilendiamina en una cadena lateral y un copolímero de bloque que incluye la PAsp(DET) como un componente de bloque del copolímero de bloque, tales polímeros muestran baja citotoxicidad e introducen ADN de plásmido al interior de células con alta eficacia para expresar un gen incorporado en el ADN eficazmente (véase el documento no de patente 2, documento de patente 2 y documento de patente 3).

**Documentos de la técnica anterior**

45 Documentos de patente

[Documento de patente 1] Documento WO 99/61512

50 [Documento de patente 2] Documento WO 2006/085664 A1

[Documento de patente 3] Documento WO 2007/099660 A1

Documentos no de patente

55 [Documento no de patente 1] K. Mihata *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 2355-2361

[Documento no de patente 2] K. Miyata *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 16287-16294

60 **Sumario de la invención**

Problema que resuelve la invención

65 PAsp(DET) y un copolímero de bloque de la misma dado a conocer en los documentos de patente 2 y 3 presentan baja toxicidad y alta eficacia de introducción de genes en células diana a las que se les tiene que suministrar una molécula de ácido nucleico, pero tal como se mencionó anteriormente, puede no formar necesariamente un PIC que

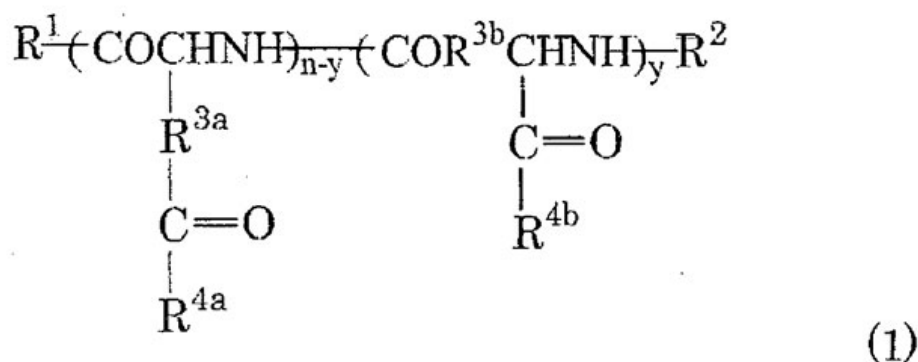
tiene alta estabilidad en condiciones fisiológicas con un ácido nucleico de bajo peso molecular tal como ARNip, que se espera cada vez más para su aplicación en tratamientos médicos. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un material de polímero sintético que puede servir como portador que presenta una mayor estabilidad con un ácido nucleico de bajo peso molecular tal como ARNip en condiciones fisiológicas y que presenta baja toxicidad y alta eficacia de introducción de genes en células diana a las que se les tiene que suministrar una molécula de ácido nucleico.

Medios para solucionar el problema

En esta ocasión, los inventores de la presente invención han encontrado que un poliaminoácido catiónico que tiene una cadena lateral que tiene una pluralidad de diferentes grupos funcionales amina en un resto que incluye un grupo catiónico y que tiene un grupo hidrófobo introducido en parte de la cadena lateral no presenta toxicidad o presenta poca toxicidad en células diana a las que se les tiene que suministrar una molécula de ácido nucleico, y puede formar un PIC estable con un ácido nucleico de bajo peso molecular tal como también ARNip. Los inventores también han encontrado que el PIC así formado forma una asociación estable relativamente monodispersada que tiene un diámetro promedio de aproximadamente cien nm en un medio acuoso en una condición dada, se incorpora al interior de células diana con alta eficacia y ejerce un efecto que presenta inherentemente el ARNip.

Según la presente invención, el problema se soluciona proporcionando un derivado de poliaminoácido, que se representa mediante cada una de las siguientes fórmula (1) y fórmula (2):

[Fórmula química 1]



en la que: R<sup>1</sup> representa un grupo hidroxilo, un grupo alquinoxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un grupo alquenciloxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo alquinoxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, o un grupo imino sustituido con alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono;

R<sup>2</sup> representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, o un grupo alquilcarbonilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 24 átomos de carbono;

R<sup>3a</sup> y R<sup>3b</sup> representan cada uno independientemente un grupo metileno o un grupo etileno;

R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> se eligen cada uno independientemente del mismo grupo o de grupos diferentes en el grupo que consiste en los siguientes grupos:

- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>]<sub>r1</sub>NH<sub>2</sub> (i);
- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q2</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (ii);
- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p3</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q3</sub>-NH<sub>2</sub>][- (CH<sub>2</sub>)<sub>q4</sub>-NH]<sub>r2</sub>H} (iii); y
- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p4</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q5</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q6</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (iv),

en los que: p1 a p4, q1 a q6, y r1 y r2 representan cada uno independientemente un número entero de 1 a 5;

del 5 al 40% de un número total del grupo de cada uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> tienen al menos un grupo amino en el que un átomo de hidrógeno está sustituido por un grupo acilo que tiene un residuo hidrocarbonado alifático saturado o

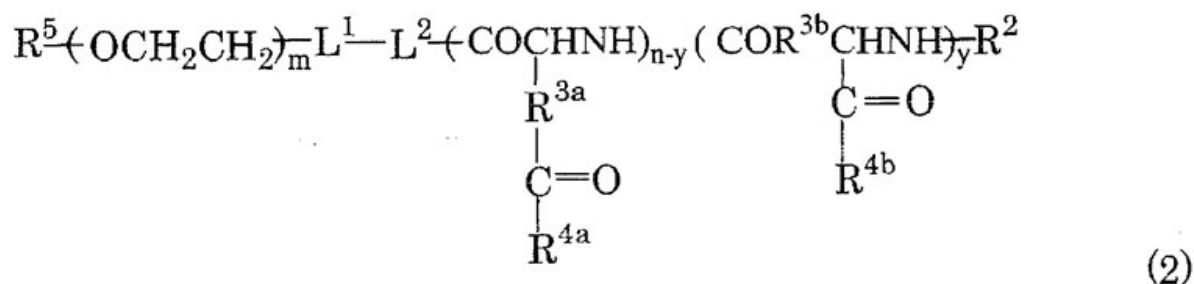
insaturado, lineal o ramificado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono, o un grupo esteroloxicarbonilo;

n representa un número entero de 30 a 5.000; e

5 y representa un número entero de 0 a 5.000,

siempre que, cuando R<sup>3a</sup> y R<sup>3b</sup> representan cada uno un grupo metileno, y representa un número entero menor que n.

[Fórmula química 2]



10

en la que: R<sup>2</sup>, R<sup>3a</sup>, R<sup>3b</sup>, R<sup>4a</sup>, R<sup>4b</sup>, n e y tienen los mismos significados que los definidos para la fórmula (1);

L<sup>1</sup> representa -S-S- o un enlace de valencia;

15

L<sup>2</sup> representa -NH-, -O-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-NH- o -L<sup>2a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>-L<sup>2b</sup>-, en los que: p1 y q1 representan cada uno independientemente un número entero de 1 a 5; L<sup>2a</sup> representa OCO, OCONH, NHCO, NHCOO, NHCONH, CONH, o COO; y L<sup>2b</sup> representa NH u O;

20

R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono; y m representa un número entero de 30 a 20.000.

A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que los grupos o restos en la fórmula (1) y fórmula (2), o los grupos definidos para las mismas están unidos covalentemente en la direccionalidad descrita. A este respecto, sin embargo, una unidad de repetición que tiene un número de repetición de n-y y una unidad de repetición que tiene un número de repetición de y en la fórmula (1) y fórmula (2) están dispuestas de cualquier manera adecuada, y puede aplicarse cualquier estructura adecuada tal como una estructura de bloque, una estructura al azar o una estructura alterna.

25

### 30 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un diagrama para ilustrar las fórmulas estructurales respectivas de PAsp(DET) (a la izquierda de la figura) y PAsp(DET)-ST preparado mediante un método según el ejemplo 1(1).

35

[Figura 2] La figura 2 es una fotografía como alternativa a un diagrama para mostrar los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida de un PIC de PAsp(DET)-ST al 19% y ARNip formado mediante un método según el ejemplo 1(2).

40

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que ilustra los resultados de la evaluación del diámetro de partícula y el índice de polidispersidad del PIC del ejemplo 1(2) mediante dispersión de luz dinámica. A N/P=5,0, una micela de ST al 12% tenía un tamaño promedio de 171 nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0,144, mientras que un micela de ST al 19% tenía un tamaño promedio de 152 nm y un índice de polidispersidad de 0,100.

45

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que ilustra los resultados de una prueba de silenciamiento de un gen endógeno Bcl-2 usando el PIC del ejemplo 2(1).

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que ilustra los resultados de la evaluación de citotoxicidad en la prueba de silenciamiento usando el PIC en el ejemplo 2(1).

50

[Figura 6] La figura 6 es un gráfico que ilustra los resultados de una prueba de silenciamiento de un gen endógeno de VEGF usando el PIC en el ejemplo 2(2) (evaluación de la expresión de VEGF).

[Figura 7] La figura 7 es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba de silenciamiento del gen endógeno de VEGF usando el PIC en el ejemplo 2(2) (evaluación de VEGF a nivel proteico).

5 [Figura 8] La figura 8 es un diagrama conceptual que ilustra la formación de micelas de polímero de PEG-SS-PAsp(DET)-ST y ARNip sintetizado en el ejemplo 3(1).

[Figura 9] La figura 9 es un gráfico que ilustra los resultados de una prueba de transfección de ARNip usando un complejo de PEG-SS-PAsp(DET)-ST y ARNip del ejemplo 3(3).

## 10 Descripción de las realizaciones

A continuación en el presente documento, se describe la presente invención más específicamente.

15 Sin querer limitarse a ninguna teoría, un poliaminoácido catiónico de la presente invención tiene una cadena lateral que tiene una pluralidad de diferentes grupos funcionales amina en un resto que incluye un grupo catiónico y por tanto presenta pKa en una pluralidad de fases. En condiciones fisiológicas a pH 7,4, la pluralidad de grupos funcionales amina están cada uno en un estado parcialmente protonado y pueden formar un complejo poliiónico (PIC) a través de una interacción con un ácido nucleico. Además, puede entenderse que, cuando el PIC así formado se capta en el interior del endosoma (pH 5,5), la protonación del poliaminoácido catiónico avanza adicionalmente  
20 debido a una disminución en el pH y la promoción de la salida del endosoma a través de un efecto tampón (o efecto de esponja de protones) disminuye el daño en las células. Mientras tanto, se entiende que, cuando se introduce un grupo hidrófobo al interior de un resto que incluye un grupo catiónico a una razón específica, la introducción no afecta de manera adversa al efecto tampón (o efecto de esponja de protones) y el PIC se estabiliza a través de una interacción hidrófoba, y como resultado, se forma una asociación estable relativamente monodispersada que tiene un diámetro promedio de aproximadamente cien nm. Además, cuando se usa el poliaminoácido catiónico tal como se describió anteriormente según la presente invención en forma de un copolímero de bloque con un segmento de PEG de la misma manera que la descrita en el documento de patente 3, el copolímero de bloque puede formar una micela de polímero que presenta capacidad de retención satisfactoria en la sangre en circulación mientras mantiene al menos las características poseídas por el propio poliaminoácido catiónico.

30 El resto alquilo en un grupo alquilo lineal o ramificado, grupo imino sustituido con alquilo, o similares que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, que se define por R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> en la fórmula (1) y fórmula (2), puede ser, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo grupo, un grupo n-hexilo, un grupo decilo y un grupo undecilo. Un resto alquenilo o alquinilo en un grupo alqueniloxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo alquiniloxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, o similares puede mostrarse a modo de ejemplo mediante uno que incluye un doble enlace o un triple enlace en el grupo alquilo que tiene 2 o más átomos de carbono tal como se mostró a modo de ejemplo anteriormente.

40 Para tal grupo o resto, un sustituyente en un caso "sustituido" puede mostrarse a modo de ejemplo por, pero sin limitarse a, un grupo alcoxilo C<sub>1-6</sub>, un grupo ariloxilo, un grupo ariloxilo C<sub>1-3</sub>, un grupo ciano, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo alcoxycarbonilo C<sub>1-6</sub>, un grupo acilamida C<sub>2-7</sub>, un grupo tri-alquil-siloxilo C<sub>1-6</sub>, un grupo siloxilo o un grupo sililamino, o puede mostrarse a modo de ejemplo por un grupo formilo acetilado, un grupo formilo o un halógeno tal como cloro o flúor. En este contexto, por ejemplo, la expresión "C<sub>1-6</sub>" significa de 1 a 6 átomos de carbono y se usa con el mismo significado en la siguiente descripción. Además, un resto alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono en el grupo alquilcarbonilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 24 átomos de carbono puede seleccionarse con referencia a los ejemplos, y un resto alquilo que tiene 13 o más átomos de carbono puede ser, por ejemplo, un grupo tridecilo, un grupo tetradecilo, un grupo pentadecilo, un grupo nonadecilo, un grupo docosanilo y un grupo tetracosilo.

50 Para el grupo metileno o el grupo etileno en la definición para R<sup>3a</sup> y R<sup>3b</sup>, se entiende que, cuando tanto R<sup>3a</sup> como R<sup>3b</sup> representan cada uno un grupo metileno, una unidad de repetición que implica tal definición representa una unidad derivada de poli(ácido aspártico), y las unidades respectivas que tienen estos grupos están presentes al azar. Mientras tanto, cuando tanto R<sup>3a</sup> como R<sup>3b</sup> representan cada uno un grupo etileno, una unidad de repetición que implica tal definición representa una unidad derivada de poli(ácido glutámico), y en este caso, representa un polímero en el que y representa un número entero de 0 o n-y representa un número entero de 0. El primero representa, por ejemplo, una unidad derivada de poli(ácido α-glutámico) obtenida mediante la polimerización de éster γ-bencílico del ácido glutámico-anhídrido N-carboxílico. Mientras tanto, el último representa, por ejemplo, una unidad derivada de poli(ácido γ-glutámico) producida por una cepa bacteriana que pertenece al género de bacterias *Bacillus* tal como *Bacillus natto*.

El grupo elegido del grupo que consiste en:

65 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>]<sub>r1</sub>NH<sub>2</sub> (i);

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q2</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (ii);

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p3</sub>-N{[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q3</sub>-NH<sub>2</sub>][-(CH<sub>2</sub>)<sub>q4</sub>-NH]<sub>r2</sub>H} (iii); y

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p4</sub>-N{-(CH<sub>2</sub>)<sub>q5</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q6</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>}<sub>2</sub> (iv),

que se define para el grupo de cada uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup>, es preferiblemente el mismo grupo, y p1 a p4 y q1 a q6 representan independientemente cada uno preferiblemente 2 ó 3, más preferiblemente 2. Mientras tanto, r1 y r2 representan independientemente cada uno preferiblemente un número entero de 1 a 3.

En el grupo de cada uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup>, un átomo de hidrógeno de al menos un grupo amino en el grupo que representa del 5 al 40%, preferiblemente del 10 al 30%, más preferiblemente del 15 al 25% del número total de n-y o y del grupo está sustituido por un grupo acilo que tiene un residuo hidrocarbonado alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono, o un grupo esteroloxicarbonilo. Cuando el residuo hidrocarbonado alifático está saturado, el residuo es equivalente a un grupo alquilo que tiene de 6 a 27 átomos de carbono y se muestra a modo de ejemplo mediante un grupo pentacosilo, un grupo hexacosilo o un grupo heptacosilo así como el grupo alquilo. El residuo hidrocarbonado alifático insaturado corresponde a un grupo en el que de 1 a 5 enlaces sencillos carbono-carbono en una cadena del grupo alquilo están sustituidos por dobles enlaces carbono-carbono. Un grupo acilo (RCO-) que tiene tal residuo (R) puede mostrarse a modo de ejemplo por, pero sin limitarse a, ácido láurico (o ácido dodecanoico), ácido mirístico (o ácido tetradecanoico), ácido palmítico (o ácido hexadecanoico), ácido palmitoleico (o ácido 9-hexadecenoico), ácido esteárico (o ácido octadecanoico), ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eleosteárico (o ácido 9,11,13-octadecatrienoico), ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido nervónico, ácido cerótico o ácido montánico.

El esteroles usado en el presente documento significa un compuesto natural, semisintético o sintético basado en un anillo de ciclopentanona-hidrofenantreno (C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>) y derivados del mismo. Por ejemplo, un esteroles natural se muestra a modo de ejemplo por, pero sin limitarse a, colesterol, colestanol, dihidrocolesterol, ácido cólico, campesterol o sitosterol. Compuestos semisintéticos o sintéticos del mismo pueden ser, por ejemplo, precursores sintéticos de estos productos naturales (si es necesario, que abarcan un compuesto en el que parte o todos, si están presentes, de determinados grupos funcionales, grupos hidroxilo se han protegido con un grupo protector de hidroxilo convencional, o un compuesto en el que se ha protegido un grupo carboxilo con protección de carboxilo). Además, el derivado de esteroles significa que, por ejemplo, sin afectar de manera adversa al objeto de la presente invención, puede introducirse un grupo alquilo C<sub>1-12</sub>, un átomo de halógeno tal como cloro, bromo o flúor en un anillo de ciclopentanona-hidrofenantreno, y el sistema de anillos puede estar saturado o parcialmente insaturado. Un residuo del derivado de esteroles es preferiblemente un grupo en el que se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo en la posición 3 de colesterol, colestanol o dihidrocolesterol. El residuo es más preferiblemente un grupo en el que se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo en la posición 3 de colesterol. Un esteroles del grupo esteroloxicarbonilo se muestra a modo de ejemplo por uno de origen de aceite animal o vegetal tal como colesterol, colestanol, dihidrocolesterol, ácido cólico, campesterol o sitosterol.

n, que representa el número de unidades de repetición de un aminoácido, puede representar de 30 a 5.000, y en vista de conveniencia en la síntesis, puede representar de 30 a 300, preferiblemente de 60 a 150, más preferiblemente de 60 a 100. Además, y puede representar de 0 a 5.000, y en vista de conveniencia en la síntesis, puede representar de 30 a 300, preferiblemente de 60 a 150, más preferiblemente de 60 a 100.

Según la presente invención, también puede proporcionarse un copolímero de bloque representado por la fórmula (2). En la fórmula (2), R<sup>2</sup>, R<sup>3a</sup>, R<sup>3b</sup>, R<sup>4a</sup>, R<sup>4b</sup>, n e y en la fórmula tienen los mismos significados que los definidos para la fórmula (1) y descritos anteriormente.

L<sup>1</sup> representa -S-S- o un enlace de valencia. Mientras tanto, L<sup>2</sup> representa -NH-, -O-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-NH- o -L<sup>2a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>-L<sup>2b</sup>-, en los que: p1 y q1 representan cada uno independientemente un número entero de 1 a 5; L<sup>2a</sup> representa OCO, OCONH, NHCO, NHCOO, NHCONH, CONH o COO; y L<sup>2b</sup> representa NH u O. L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> necesitan combinarse entre sí de modo que puedan formar un grupo de unión. Por ejemplo, cuando L<sup>2</sup> representa -NH-, L<sup>1</sup> no representa -S-S- sino un enlace de valencia. -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>- preferido es uno que forma un grupo de unión en el caso en el que L<sup>1</sup> representa -S-S-.

R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Como ejemplos del mismo, se aplican los descritos para R<sup>1</sup>. m, que representa el número de unidades de repetición de etilenglicol (u oxietileno), representa un número entero de 30 a 20.000, preferiblemente de 200 a 2.000, más preferiblemente de 500 a 1.000.

El poliaminoácido representado por la fórmula (1) puede prepararse, por ejemplo: sometiendo un poli(éster de aminoácido), que se prepara mediante la polimerización de un anhídrido N-carboxílico convencional derivado a partir de un éster de ácido aspártico o un éster de ácido glutámico, a aminólisis usando una poliamina que corresponde a un residuo de poliamina del grupo de cada uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup>, para introducir el residuo de poliamina en una cadena lateral del poliaminoácido; y sometiendo un grupo amino de un resto poliamina así introducido a reacción con una cantidad apropiada de un ácido carboxílico activado, que se obtiene mediante la activación de un grupo carboxilo de

un ácido carboxílico que corresponde a un grupo acilo que tiene el residuo hidrocarbonado alifático, si se requiere. El copolímero de bloque de la fórmula (2) puede prepararse según un método de unión convencional para un segmento de polietilenglicol y el poliaminoácido preparado tal como se describió anteriormente, o puede prepararse según el método descrito en el documento no de patente 3 que incluye preparar un copolímero de bloque que tiene el residuo de poliamina libre de un grupo hidrófobo y entonces llevar a cabo una reacción con un ácido carboxílico activado. La introducción de un grupo hidrófobo excluyendo el grupo acilo también puede llevarse a cabo mediante una reacción convencional de un grupo amino y un producto esterificado de carbonato activo que porta el grupo hidrófobo.

Los polímeros de la fórmula (1) y la fórmula (2) que pueden proporcionarse tal como se describió anteriormente presentan los pKa en una pluralidad de fases, y por tanto pueden formar un complejo poliónico (PIC) con un compuesto que puede cargarse con aniones en condiciones fisiológicas. El compuesto que puede cargarse con aniones puede ser una proteína, un lípido, un péptido o un ácido nucleico. En particular, se forma de manera conveniente un PIC con un ácido nucleico. Por tanto, a continuación en el presente documento, se describe un PIC de un ácido nucleico y un poliaminoácido catiónico de la presente invención o un copolímero de bloque del mismo con el fin de simplificar la descripción.

Tal como se describió anteriormente, el poliaminoácido catiónico de la presente invención tiene un grupo hidrófobo en su cadena lateral, y por tanto el poliaminoácido catiónico también puede formar un PIC con un ácido nucleico de bajo peso molecular en condiciones fisiológicas para proporcionar una vesícula o una asociación estable. El ácido nucleico que puede proporcionar un PIC según la presente invención usando el poliaminoácido catiónico de la fórmula (1) o copolímero de bloque de la fórmula (2) significa un poli u oligonucleótido que incluye como unidad básica nucleótidos formados por una base de purina o pirimidina, una pentosa y ácido fosfórico, y ejemplos del mismo pueden incluir oligo- o poli-ARN bicatenario, oligo- o poli-ADN bicatenario, oligo- o poli-ADN monocatenario, y oligo- o poli-ARN monocatenario. Además, también se incluyen oligo- o poli-ácido nucleico bicatenario y oligo- o poli-ácido nucleico monocatenario en cada uno de los cuales existen ARN y ADN en un estado mixto en la misma cadena. Además, el nucleótido contenido en el ácido nucleico puede ser de tipo natural o de tipo no natural modificado químicamente, o puede tener añadido al mismo un grupo amino, un grupo tiol, un compuesto fluorescente o cualquier otra molécula. El ácido nucleico no está limitado pero puede estar formado por de 4 a 20.000 bases, preferiblemente de 10 a 10.000 bases, más preferiblemente de 18 a 30 bases. Además, en consideración de funciones o acciones, pueden facilitarse ADN de plásmido, ARNip, micro-ARN, ARNhp, un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico señuelo, un aptámero y una ribozima.

Como ARNip, por ejemplo, pueden usarse todos de los designados para un gen o un polinucleótido de interés mediante un método convencional. Para la longitud de cadena de ARNip, un resto para formar una hebra doble puede tener una longitud de preferiblemente de 15 a 50 bases, más preferiblemente de 18 a 30 bases, y se abarcan compuestos convencionales y todos los nucleótidos que tienen las mismas acciones o funciones que aquellos compuestos. Pueden diseñarse ejemplos específicos del ARNip con referencia a un gen que puede servir como diana de una terapia génica, pero no se limitan a los mismos. Los ejemplos de tales genes pueden incluir, pero no se limitan a, PKC $\alpha$  relacionado con una enfermedad tal como carcinoma de pulmón de células no pequeñas, BCL-2 relacionado con una enfermedad tal como melanoma maligno, ICAM-1 relacionado con enfermedad de Crohn, VHC relacionado con hepatitis de tipo C, TNF $\alpha$  relacionado con artritis reumatoide o psoriasis, receptor de adenosina A1 relacionado con asma, c-raf cinasa relacionada con una enfermedad tal como cáncer de ovario, H-ras relacionada con una enfermedad tal como cáncer de páncreas, c-myc relacionada con arteriopatía coronaria, PKA Ria relacionada con cáncer de intestino grueso, VIH relacionado con SIDA, ADN metil transferasa relacionada con cáncer sólido, receptor de VEGF relacionado con cáncer, enzima de reducción de ribonucleótidos relacionada con cáncer de riñón, CMV IE 2 relacionado con retinitis por CMV, MMP-9 relacionada con cáncer de próstata, TGF $\beta$ 2 relacionado con glioma maligno, CD 49 d relacionado con esclerosis múltiple, PTP-1B relacionada con diabetes, c-myb relacionada con cáncer, EGFR relacionado con una enfermedad tal como cáncer de mama, y mdr1, autotaxina y gen de GLUT-1 relacionados con cáncer. En cuanto al ácido nucleico antisentido, pueden emplearse aquellos conocidos en la técnica o todos los que tienen las mismas funciones o acciones que aquellos como diana para formar un PIC según la presente invención.

Por tanto, el PIC del ácido nucleico y el compuesto representado por la fórmula (1) o la fórmula (2) tal como se describieron anteriormente, se proporciona como otro aspecto de la presente invención. Tal PIC del compuesto de la fórmula (1) o la fórmula (2) y, por ejemplo, ARNip, puede ser estable en condiciones fisiológicas generalmente cuando la razón de N/P es de 2 a 60.

Puede aplicarse la definición de la razón de N/P = [número total de grupo amino y grupo amino sustituido del resto policatiónico en la cadena lateral]/[número total de grupo fosfato en el ácido nucleico].

En cuanto al compuesto de la fórmula (1), una razón de N/P óptima varía dependiendo de la razón del grupo hidrófobo en el grupo amino total y por tanto no puede especificarse. Sin embargo, en general cuando se forma un PIC con ARNip de modo que la razón de N/P es de 5 o más, preferiblemente de 7 o más, puede proporcionarse una asociación estable que tiene un tamaño de diámetro de partícula promedio de aproximadamente cien y varias decenas de nm en condiciones fisiológicas tal como en la sangre en circulación. Tal PIC puede prepararse mezclando el compuesto de la fórmula (1) y ARNip en una disolución acuosa tamponada según sea necesario para

lograr la razón de N/P. Cuando se usa el copolímero de bloque de la fórmula (2), y en particular, se aumenta la razón de un grupo hidrófobo, existe una tendencia de que tal copolímero solo se asocie de manera autónoma en una disolución acuosa para formar una micela polimérica. Por tanto, puede formarse un PIC estable en un intervalo más amplio de razones de N/P en comparación con el caso de usar el compuesto de la fórmula (1).

A continuación en el presente documento, se describe adicionalmente la presente invención mediante ejemplos específicos. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

#### Ejemplo de producción 1

##### Síntesis de octadecanoato de N-succinimidilo

Se sintetizó octadecanoato de N-succinimidilo según el siguiente artículo [N. M. Howarth, W. E. Lindsell, E. Murray, P. N. Preson, Tetrahedron 61 (2005) 8875-8887]. Se disolvieron ácido esteárico (1,87 g, 6,56 mmol) y N-hidroxisuccinimida (0,76 g, 6,56 mmol) en 80 ml de diclorometano (DCM) y se sometieron a reacción con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (WSC) (1,25 g, 6,56 mmol) durante 48 horas. Entonces se lavó el producto de reacción con agua, se extrajo con DCM dos veces y se secó sobre MgSO<sub>2</sub> para proporcionar un polvo blanco (1,4 g, rendimiento del 56%). Se calculó la tasa de conversión de un grupo carboxilo en ácido esteárico mediante <sup>1</sup>H-RMN y se encontró que era del 96%.

#### Ejemplo 1

##### (1) Síntesis de PAsp(DET) con grupo estearoilo introducido (PAsp(DET)-ST)

Se sometió L-aspartato de β-bencilo-anhídrido N-carboxílico (BLA-NCA) a polimerización por escisión usando n-butilamina como iniciador para sintetizar poli(L-aspartato de β-bencilo) (PBLA) (grado de polimerización: 110). A continuación, se liofilizó PBLA (513 mg) a partir de benceno y entonces se disolvió en 25 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP). Se mezcló un equivalente de 50 veces de dietilentriamina (DET) con respecto a una cadena lateral de PBLA con 13,5 ml de NMP. Entonces, bajo argón a 10°C, se añadió la disolución de DET a la disolución de PBLA y se sometió la mezcla a reacción durante 1 hora. Tras esto, se añadió el producto resultante a una disolución acuosa de HCl 0,01 N, se dializó frente a HCl 0,01 N dos veces, se dializó frente a agua a 4°C y entonces se recogió por liofilización. Se ha realizado la confirmación de que la PAsp(DET) (a la izquierda de la figura 1) así sintetizada tiene una alta capacidad de tampón mientras que tiene una actividad de daño a la membrana celular en respuesta a un entorno de pH bajo, y puede transportar ADN de plásmido al interior del citoplasma eficazmente (véase el documento no de patente 2). A continuación, se disolvieron PAsp(DET) (100 mg, 0,366 mmol en cuanto al número molar de una unidad de Asp (DET)) y DIPEA (638 ml, 3,66 mmol) en 6 ml de metanol y se sometieron a reacción con octadecanoato de N-succinimidilo (27,8 mg, 0,073 mmol) disuelto en 6 ml de DCM a 4°C durante 24 horas. Tras la reacción, se volvió a precipitar el producto de reacción en dietil éter y se filtró. Se disolvió la muestra resultante en metanol/agua (1:1 v/v) y entonces se dializó a 4°C frente a una disolución acuosa de HCl 0,01 M tres veces y agua destilada una vez. Tras esto, se recogió el producto resultante mediante liofilización para sintetizar PAsp(DET)-ST que tenía un grupo estearoilo introducido en una cadena lateral (a la derecha de la figura 1). El rendimiento del polímero fue del 90% o más.

##### (2) Formación del complejo de PAs p(DET)-ST y ARNip

Se disolvió PAsp(DET)-ST que tenía una tasa de introducción de grupo estearoilo del 0, el 12 o el 19% en un tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) o una disolución de etanol al 50% (etanol/tampón Hepes 10 mM, 1:1 v/v) y se mezcló con ARNip (20 μM, tampón HEPES 10 mM (pH 7,3)) a diferentes razones de N/P. Se confirmó la formación del complejo mediante electroforesis con poli(acrilamida) (la figura 2 ilustra los resultados de electroforesis de complejos de PAsp(DET)-ST al 19% y ARNip). Como resultado, en el caso de usar cualquier polímero, desapareció una banda de ARNip libre a una razón de N/P igual o superior a un valor específico (razón de N/P de 2,5 o más en el caso de PAsp(DET)-ST al 19%), sugiriendo que se produjo la formación del complejo de ARNip con PAsp(DET) o PAsp(DET)-ST. A continuación, Se evaluó PAsp(DET)-ST/ARNip para determinar su diámetro de partícula y su índice de polidispersidad (PDI) mediante dispersión de luz dinámica (aparato Zetasizer de dispersión de luz dinámica (Malvern Instruments, Worcestershire, R.U.)) (figura 3). Como resultado, se formó un agregado grande que tenía un tamaño de 200 nm o más a una razón de N/P relativamente baja (razón de N/P de 1,4 a 2,5 en el caso de PAsp(DET) y razón de N/P de 2,0 a 3,5 en el caso de PAsp(DET)-ST), mientras que se formó una asociación relativamente monodispersada que tenía un tamaño de 150 a 170 nm sólo en el caso de PAsp(DET)-ST a una razón de N/P de 3,5 a 4,0 o más. Por otro lado, en el caso de PAsp(DET), la intensidad de la luz dispersada era débil y no se confirmó la formación de asociación.

Los resultados mencionados anteriormente sugieren que la introducción de un grupo estearoilo como grupo hidrófobo en una cadena lateral de PAsp(DET) condujo a la estabilización del complejo a través de una interacción hidrófoba y formación de nanopartículas.

#### Ejemplo 2



## (1) Silenciamiento del gen endógeno Bcl-2 con complejo PAsp(DET)-ST/ARNip

Se sembraron células Panc-1 de cáncer de páncreas humano en una placa de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) y se cultivaron durante la noche. Entonces, se formó un complejo de ARNip dirigido frente a Bcl-2 y cada uno de PAsp(DET) y PAsp(DET)-ST tal como se describió anteriormente y se cultivó con las células durante 48 horas (concentración de ARNip: 100 nM). Tras esto, se recogieron las células mediante tripsinización y se recogió el ARN total con un kit Rneasy Mini (Qiagen). A continuación, se preparó ADNc usando un kit de reactivo PrimeScript RT de TAKARA y se evaluaron las cantidades de ARNm de Bcl-2 y GADPH (gen de mantenimiento como patrón interno) mediante PCR en tiempo real (ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.)) usando un kit de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen). En este caso, se usó la siguiente secuencia como ARNip dirigido frente a Bcl-2 (5'-CAG GAC CUC GCC GCU GCA GAC-3'; 3'-CGG UCC UGG AGC GGC GAC GUC UG-5') (referencia 1). Los resultados revelaron que PAsp(DET)-ST al 12% y PAsp(DET)-ST al 19% podían silenciar ARNm de Bcl-2, que era un gen endógeno y era supresor de la apoptosis, a una razón de N/P de 7,5 o más y a cualquier razón de N/P, respectivamente (figura 4). Además, se evaluó la citotoxicidad no específica en las células Panc-1 debida a la transfección con ARNip (cultivo durante 40 horas) usando el kit Cell Counting-8 (Dojindo, Japón). Como resultado, no se observó citotoxicidad a ninguna tasa de introducción de grupo estearoilo ni razón de N/P (figura 5).

## (2) Silenciamiento de gen endógeno de VEGF con complejo PAsp(DET)-ST/ARNip

Se cultivaron los complejos preparados mezclando PAsp(DET)-ST al 19% y ARNip a diferentes razones de N/P con células HeLa de cáncer de cuello uterino humano durante 48 horas, y se determinó cuantitativamente la cantidad de ARNm de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mediante PCR en tiempo real (usando actina como patrón interno) de la misma manera a la anteriormente descrita (figura 6). En este caso, la secuencia de ARNip dirigida contra VEGF usada fue tal como se describe a continuación (GGA GUA CCC UGA UGA GAU CdTdT; GAU CUC AUC AGG GUA CUC CdTdT). Como resultado, PAsp(DET)-ST al 19% silenció significativamente la expresión de VEGF a cualquier razón de N/P, y la actividad era similar a la de Lipofectamine 2000 usado como control positivo (figura 6). Por otro lado, PEI (ExGen) no dio ningún efecto de silenciamiento génico significativo (figura 6). A continuación, se evaluó la cantidad de expresión de VEGF a nivel proteico mediante un ELISA (kit de inmunoensayo de tipo sándwich (DVE00, VEGF humano Quantkine<sup>(R)</sup>, R&D Systems, Minneapolis, MN)). Los resultados revelaron que PAsp(DET)-ST al 19% también suprimía la cantidad de expresión de VEGF de una manera específica de secuencia a nivel proteico (figura 7).

## Ejemplo 3

## (1) Síntesis de PEG-SS-PAsp(DET)-ST

Se sintetizó PEG-SS-PAsp(DET), en el que se unieron polietilenglicol (PEG) y PAsp(DET) a través de un enlace disulfuro (SS) que experimenta escisión en un organismo vivo, según la referencia 2. Específicamente, se sometió BLA-NCA a polimerización por apertura de anillo usando PEG-SS-NH<sub>2</sub> como iniciador en cloruro de metileno para proporcionar PEG-SS-PBLA que tenía un grado de polimerización de PBLA de 59 y 98. A continuación, se disolvió PEG-SS-PBLA en NMP y se sometió a reacción con DET a 5°C durante 40 minutos. Tras esto, se neutralizó el producto de reacción con una disolución acuosa de ácido acético al 25%, se dializó frente a HCl 0,01 N a 4°C y se liofilizó adicionalmente para sintetizar 0,27 g de PEG-SS-PAsp(DET).

A continuación, se llevó a cabo una reacción de introducción de un grupo estearoilo en una cadena lateral de PAsp(DET) de PEG-SS-PAsp(DET). Se llevó a cabo la reacción de introducción de un grupo estearoilo mediante una reacción con octadecanoato de N-succinimidilo de la misma manera que en el ejemplo 1. En este caso, se sometieron polímeros de PEG-SS-PAsp(DET) que tenían grados de polimerización de PAsp(DET) de 59 y 98, respectivamente, a reacción con octadecanoato de N-succinimidilo en una cantidad correspondiente al 20% de un grupo amino primario de cadena lateral. Como resultado, se sintetizaron polímeros de PEG-SS-PAsp(DET)-ST que tenían grupos estearoilo introducidos en la cadena lateral al 17% y 19%, respectivamente. Se disolvieron estos polímeros en un tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) y se mezclaron con ARNip para lograr N/P=5,0 para formar complejos. Es concebible que cada uno de los complejos así formados tengan una estructura de micela de polímero en la que un complejo PAsp(DET)-ST/ARNip está recubierto con una cubierta externa de PEG biocompatible. Además, PEG se desprende gradualmente en un organismo vivo y por tanto es concebible que se logren simultáneamente tanto la alta estabilidad en la sangre como la introducción de ARNip eficaz en un tejido diana en el suministro de ARNip mediante administración sistémica (figura 8).

## (2) Evaluación de la captación intracelular de complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip

Se estima que un complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip (N/P=5,0) tiene una estructura de bicapa en la que una superficie está recubierta con una envoltura externa de PEG, y por tanto tiene la posibilidad de experimentar una captación intracelular diferente de un complejo PAsp(DET)-ST/ARNip que tiene una superficie catiónica. En vista de lo anterior, se formó un complejo usando ARNip marcado con un colorante fluorescente Cy5 y se evaluó para determinar su cantidad de captación intracelular. Se cultivaron células HeLa (100.000 células/pocillo) en una placa

múltiple de 6 pocillos y se cultivaron con complejo PAsp(DET)-ST/ARNip y complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip durante 3 horas. Tras esto, se llevó a cabo la tripsinización y se evaluó la intensidad de fluorescencia promedio de Cy5 captado en el interior de las células mediante citometría de flujo (citómetro de flujo BD™ LSR II). La tabla 1 muestra los resultados.

5

[Tabla 1]

| Concentración de ARNip | PAsp(DET)-ST | PEG (10 k)-SS-PAsp(DET) (59)-ST | PEG (10 k)-SS-PAsp(DET) (98)-ST |
|------------------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 100 nM                 | 9215,47      | 1688,86                         | 1265,89                         |
| 300 nM                 |              | 6079,30                         | 4542,10                         |
| 500 nM                 |              | 13935,21                        | 7071,59                         |

Los resultados revelaron que, cuando la concentración de ARNip era de 100 nM, la cantidad de captación intracelular del complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip era menor que la de PAsp(DET)-ST/ARNip, pero el complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip se captaba al interior de las células en una cantidad similar a la de PAsp(DET)-ST/ARNip aumentando la concentración del complejo.

10

### (3) Transfección de ARNip con complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip

15

Se sembraron células Huh-7 de cáncer hepático humano en una placa de 24 micropocillos (20.000 células/pocillo) y se cultivaron durante la noche. Tras esto, se introdujo ADN de plásmido que podía expresar luciferasa de luciérnaga y luciferasa de *Renilla* al interior de las células usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tras 4 horas, se añadió cada uno de los complejos de ARNip formados a partir de PAsp(DET)-ST al 19%, PEG-SS-PAsp(DET) (59)-ST al 17% y PEG-SS-PAsp(DET) (98)-ST al 19%, que portaban cada uno ARNip dirigido frente a luciferasa de luciérnaga, a un medio y se cultivaron durante 48 horas. Tras esto, se calculó la eficacia de silenciamiento génico con ARNip basándose en la cantidad de expresión de luciferasa de luciérnaga con respecto a luciferasa de *Renilla* usando un kit de ensayo indicador de luciferasa doble (Promega). Como resultado, en ARNip 100 nM, el complejo PEG-SS-PAsp(DET)-ST/ARNip no mostró ningún efecto de silenciamiento génico significativo, mientras que en ARNip 300 y 500 nM, el complejo mostró una actividad de silenciamiento génico dependiente de la concentración (figura 9). Los resultados concuerdan bien con los resultados de una captación intracelular en la tabla 1. Por tanto, es concebible que un complejo que tiene una estructura de micela de polímero se capta en el interior de las células y entonces sale eficazmente del endosoma, lo que permite que una función de ARNip se exprese eficazmente en el citoplasma.

20

25

(Referencia 1)

M. Ocker, D. Neureiter, M. Lueders, S. Zopf, M. Ganslmayer, E. G. Hahn, C. Herold, D. Schuppan, Gut 54: 1298-1308 (2005)

(Referencia 2)

S. Takae, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Colloidal Au replacement assay for highly sensitive quantification of low molecular weight analytes by surface plasmon resonance. Bioconjugate Chem. 18 (4): 1241-1245 (2007)

40

#### Lista de secuencias

<110> The University of Tokyo

45 <120> Poliaminoácido catiónico y uso el mismo

<130> LT0901W

<150> Documento JP2009-031799

50 <151> 13-02-2009

<160> 4

<210> 1

55 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> hebra sentido de ARNip de *Homo sapiens* para Bc1-2

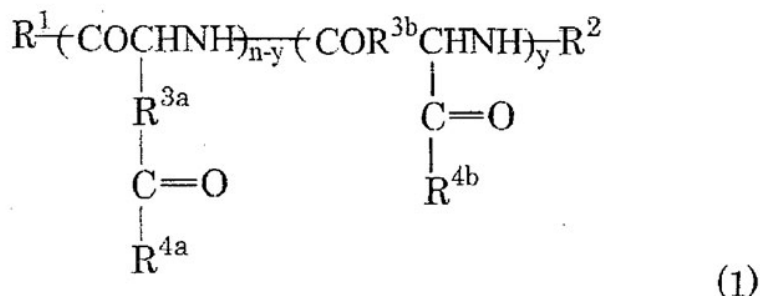
# ES 2 477 416 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <400> 1  |    |
|    | caggaccucg cgcugcaga c   | 21 |
| 5  | <210> 2<br><211> 23<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                       |    |
| 10 | <220><br><223> hebra antisentido de ARNip de <i>Homo sapiens</i> para Bc1-2          |    |
|    | <400> 2  |    |
| 15 | gucugcagcg gcgagguccu ggc  | 23 |
|    | <210> 3<br><211> 21<br><212> ARN   |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial   |    |
|    | <220><br><223> hebra antisentido de ARNip de <i>Homo sapiens</i> para el gen de VEGF |    |
| 25 | <400> 3  |    |
|    | ggaguaccu gaugagauct t   | 21 |
|    | <210> 4<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                       |    |
| 30 |  |    |
|    | <220><br><223> hebra sentido de ARNip de <i>Homo sapiens</i> para el gen de VEGF     |    |
| 35 |  |    |
|    | <400> 4  |    |
|    | gaucucauca gguacucct t   | 21 |
| 40 |  |    |

## REIVINDICACIONES

1. Poliaminoácido catiónico, que está representado por la siguiente fórmula (1):

[Fórmula química 1]

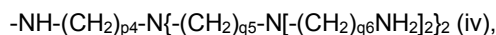
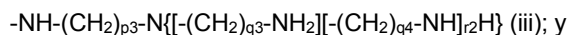
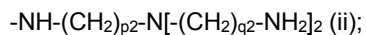
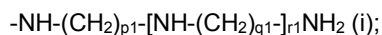


en la que:  $R^1$  representa un grupo hidroxilo, un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un grupo alquinoxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo alquinoxilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, o un grupo imino sustituido con alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono;

$R^2$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, o un grupo alquilcarbonilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 24 átomos de carbono;

$R^{3a}$  y  $R^{3b}$  representan cada uno independientemente un grupo metileno o un grupo etileno;

$R^{4a}$  y  $R^{4b}$  se eligen cada uno independientemente del mismo grupo o de grupos diferentes en el grupo que consiste en los siguientes grupos:



en los que:  $p1$  a  $p4$ ,  $q1$  a  $q6$ , y  $r1$  y  $r2$  representan cada uno independientemente un número entero de 1 a 5;

del 5 al 40% de un número total del grupo de cada uno de  $R^{4a}$  y  $R^{4b}$  tienen al menos un grupo amino en el que un átomo de hidrógeno está sustituido por un grupo acilo que tiene un residuo hidrocarbonado alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono, o un grupo esteroloxicarbonilo;

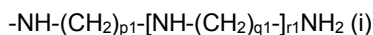
$n$  representa un número entero de 30 a 5.000; e

y representa un número entero de 0 a 5.000,

siempre que, cuando  $R^{3a}$  y  $R^{3b}$  representan cada uno un grupo metileno, y representa un número entero menor que  $n$ .

2. Poliaminoácido catiónico según la reivindicación 1, en el que  $R^{3a}$  y  $R^{3b}$  representan cada uno independientemente un grupo metileno en la fórmula (1).
3. Poliaminoácido catiónico según la reivindicación 1, en el que  $R^{3a}$  representa un grupo etileno e y representa 0 en la fórmula (1).
4. Poliaminoácido catiónico según la reivindicación 1 ó 2, en el que:

$R^{4a}$  y  $R^{4b}$  representan cada uno independientemente el siguiente grupo:

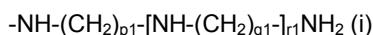


en el que: p1 y q1 representan cada uno independientemente 2 ó 3; y r1 representa un número entero de 1 a 3; y

del 10 al 30% de un número total del grupo de cada uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> tienen un grupo amino en el que un átomo de hidrógeno está sustituido por un grupo acilo que tiene un residuo hidrocarbonado alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono.

5. Poliaminoácido catiónico según la reivindicación 3, en el que:

R<sup>4a</sup> representa el siguiente grupo:

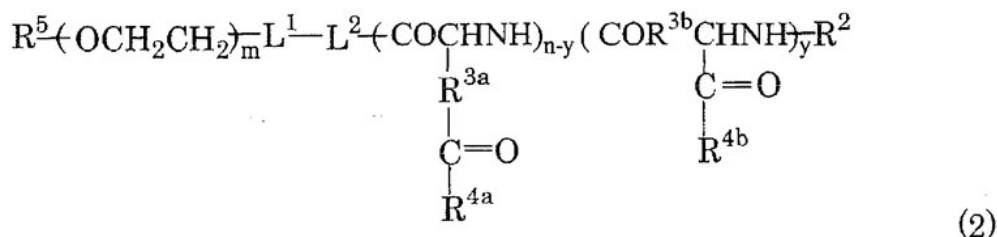


en el que: p1 y q1 representan cada uno independientemente 2 ó 3; y r1 representa un número entero de 1 a 3; y

del 10 al 30% de un número total del grupo de R<sup>4a</sup> tienen un grupo amino en el que un átomo de hidrógeno está sustituido por un grupo acilo que tiene un residuo hidrocarbonado alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono.

6. Copolímero de bloque, que está representado por la siguiente fórmula (2):

[Fórmula química 2]



en la que: R<sup>2</sup>, R<sup>3a</sup>, R<sup>3b</sup>, R<sup>4a</sup>, R<sup>4b</sup>, n e y tienen los mismos significados que los definidos para la fórmula (1) según la reivindicación 1;

L<sup>1</sup> representa -S-S- o un enlace de valencia;

L<sup>2</sup> representa -NH-, -O-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-NH-, o -L<sup>2a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>-L<sup>2b</sup>-, en los que: p1 y q1 representan cada uno independientemente un número entero de 1 a 5; L<sup>2a</sup> representa OCO, OCONH, NHCO, NHCOO, NHCONH, CONH o COO; y L<sup>2b</sup> representa NH u O;

R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo no sustituido o sustituido, lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono; y m representa un número entero de 30 a 20.000.

7. Complejo poliónico que comprende a) o b):

a) poliaminoácido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un ácido nucleico

b) copolímero de bloque según la reivindicación 6 y un ácido nucleico.

8. Complejo poliónico según la reivindicación 7, alternativa a), en el que el ácido nucleico se elige del grupo que consiste en ADN de plásmido, ARNip, micro-ARN, un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico señuelo, un aptámero y una ribozima.

9. Complejo poliónico según la reivindicación 8, en el que el ácido nucleico se elige del grupo que consiste en ADN de plásmido, ARNip, micro-ARN, un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico señuelo, un aptámero y una ribozima.

Fig. 1

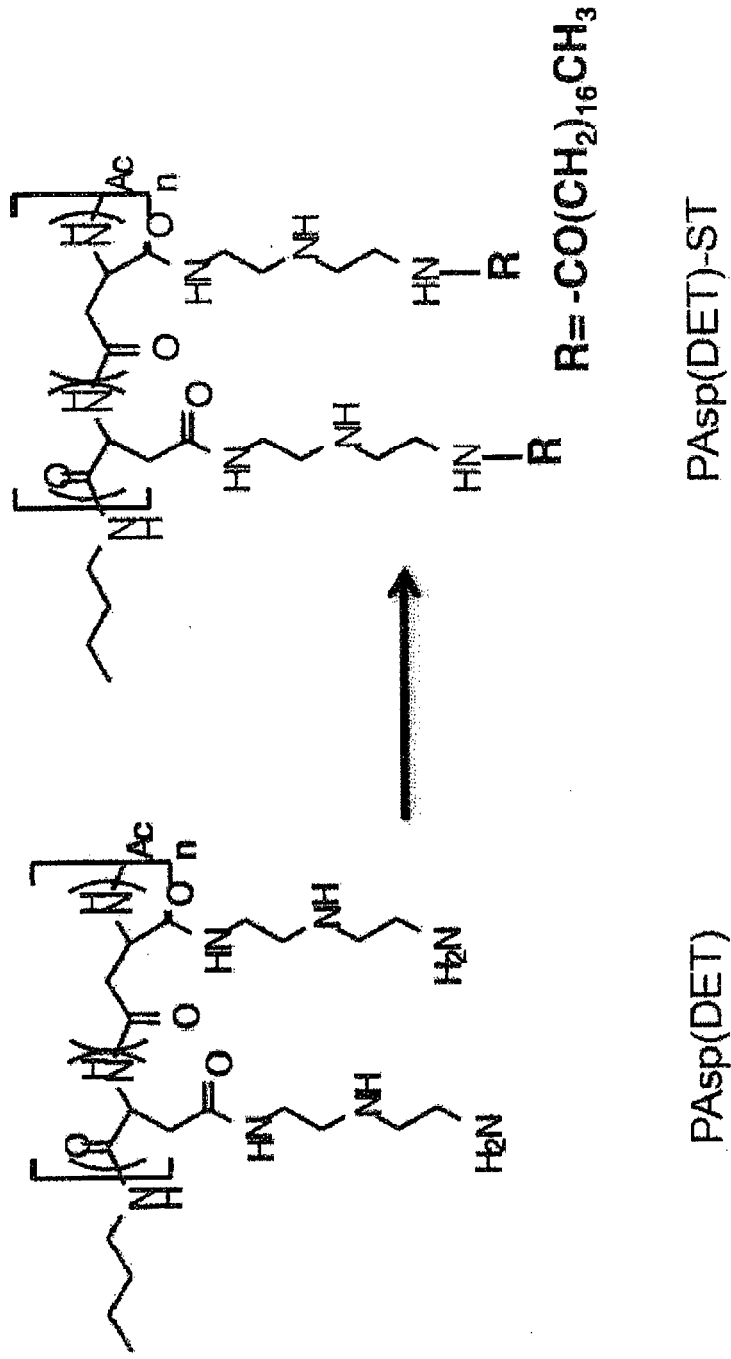


Fig.2

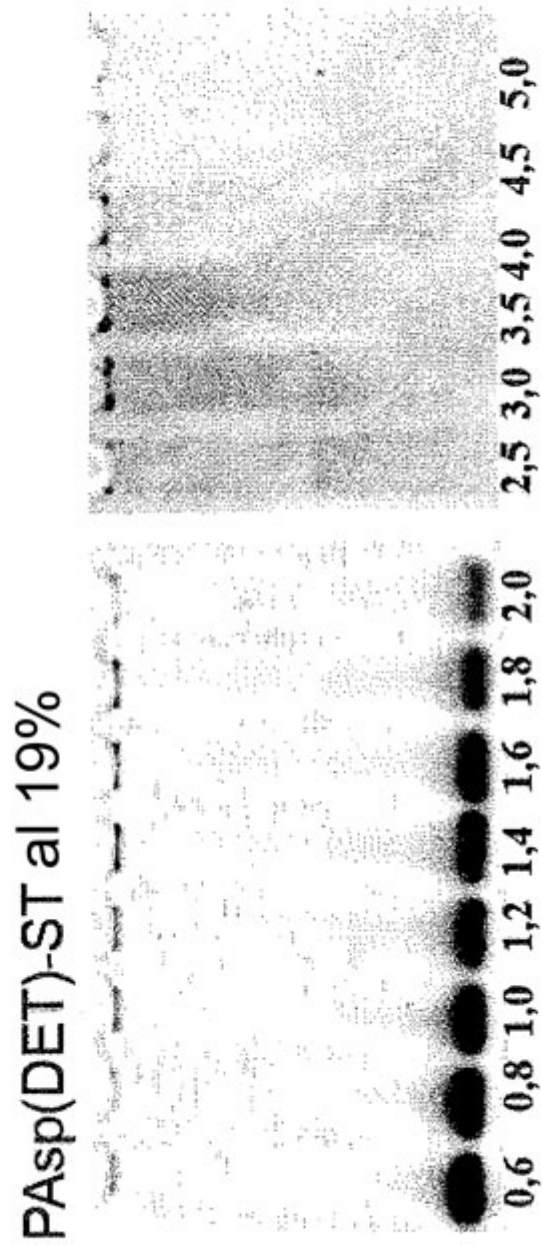


Fig.3

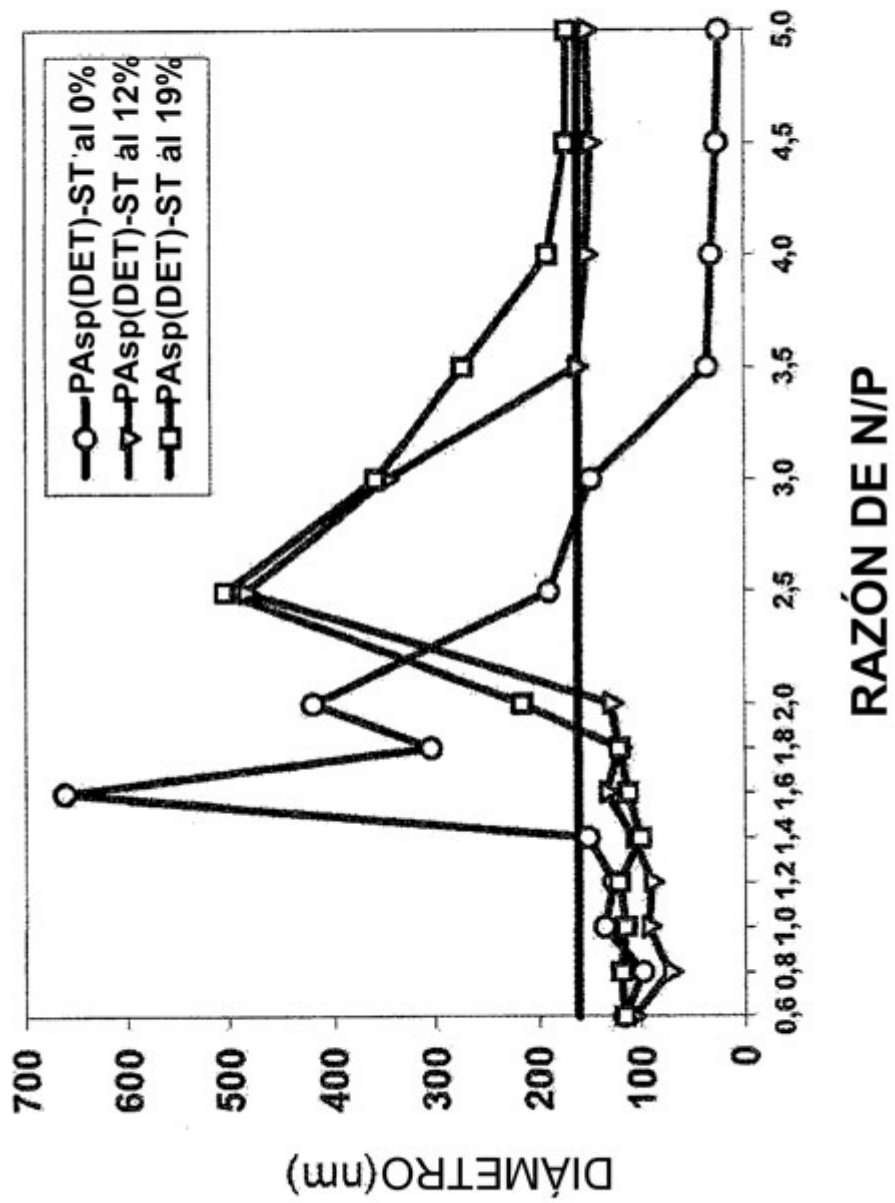




Fig.4

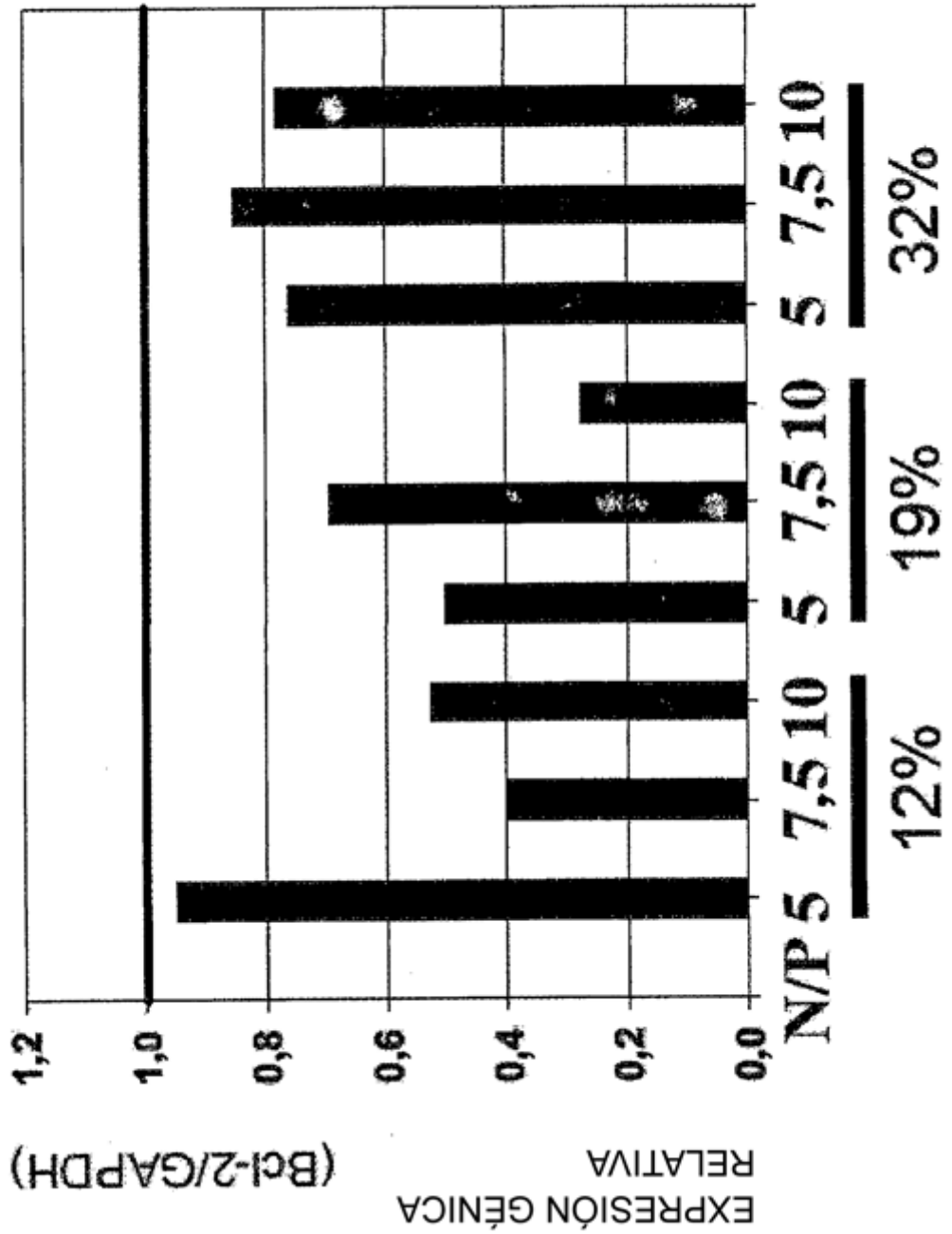


Fig.5

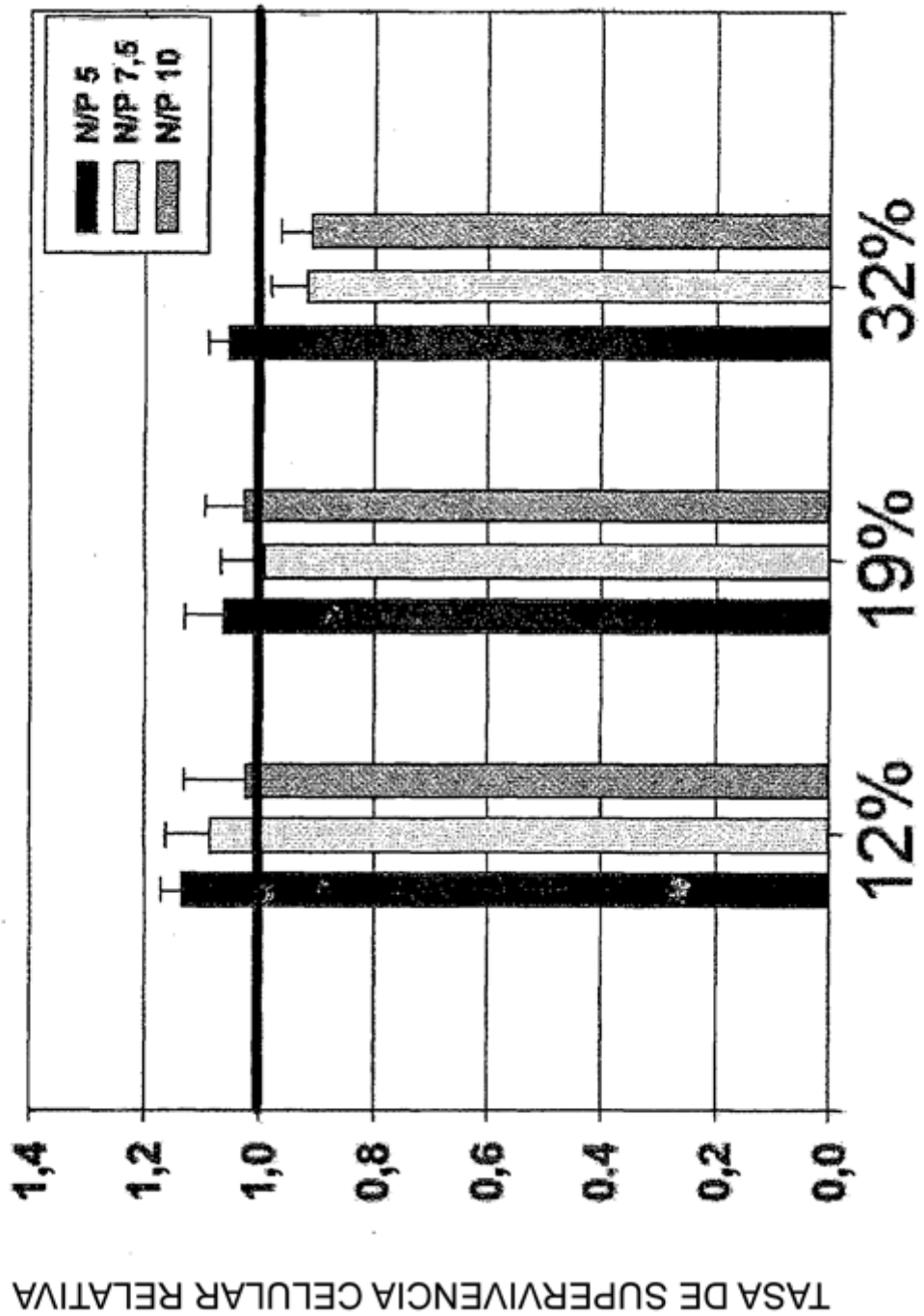


Fig. 6

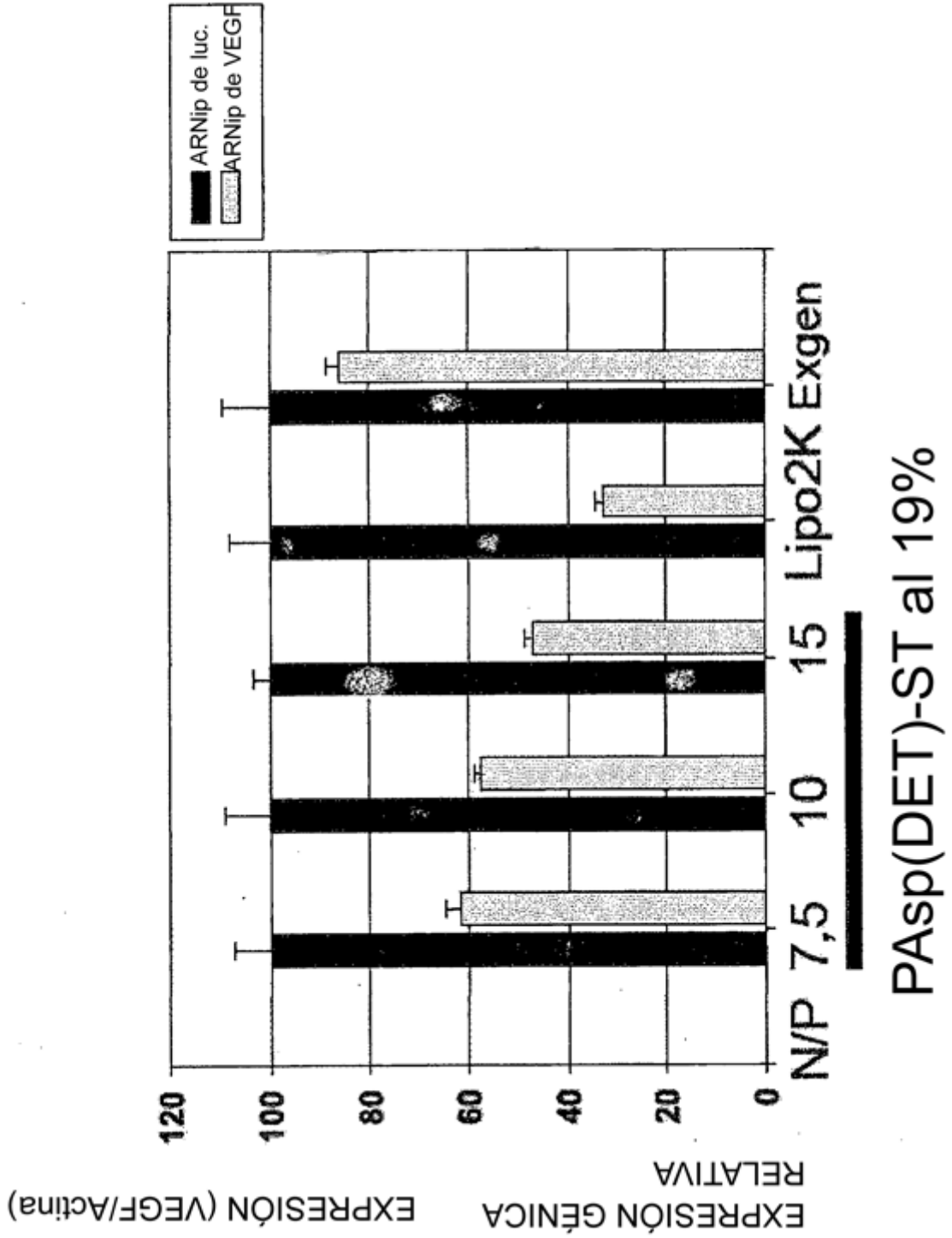


Fig.7

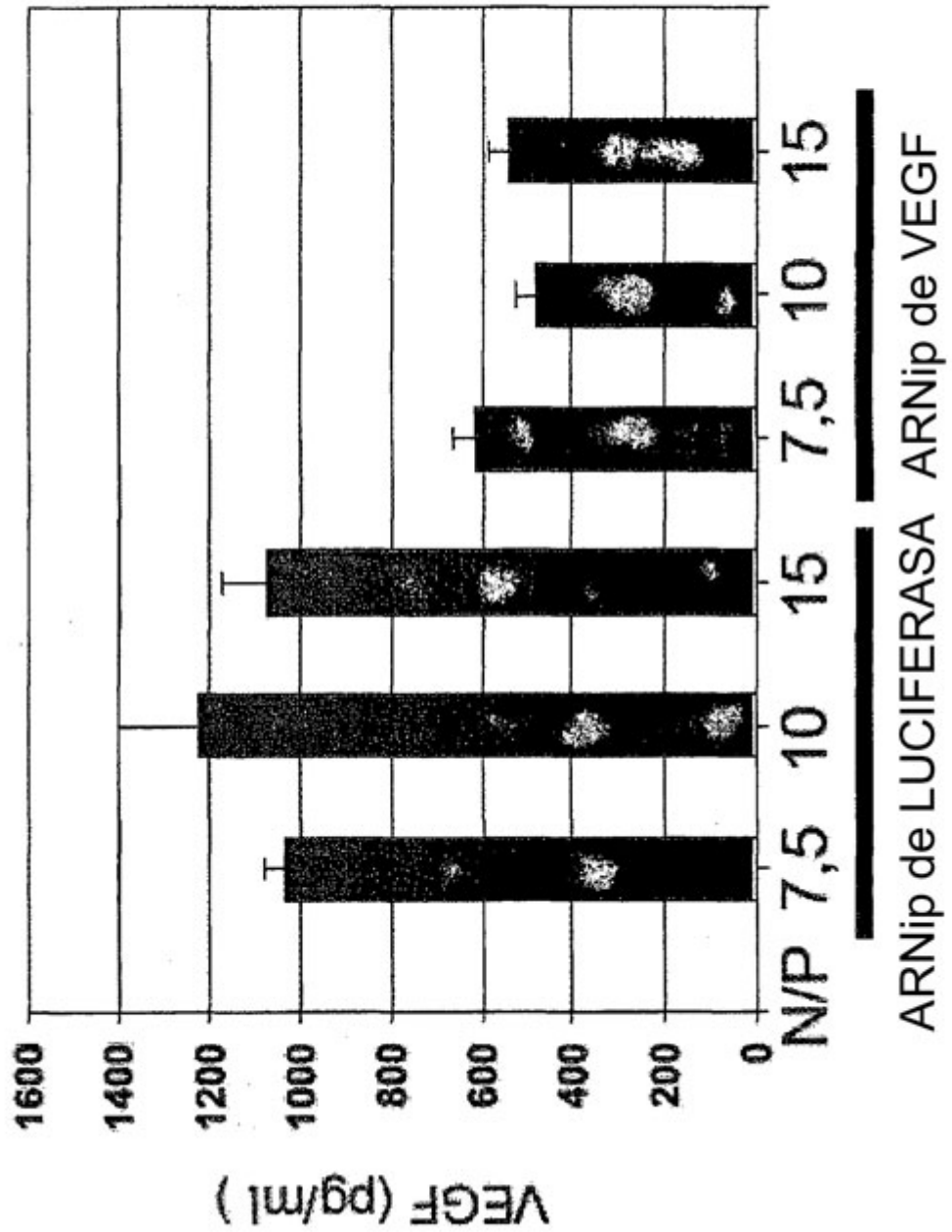


Fig. 8

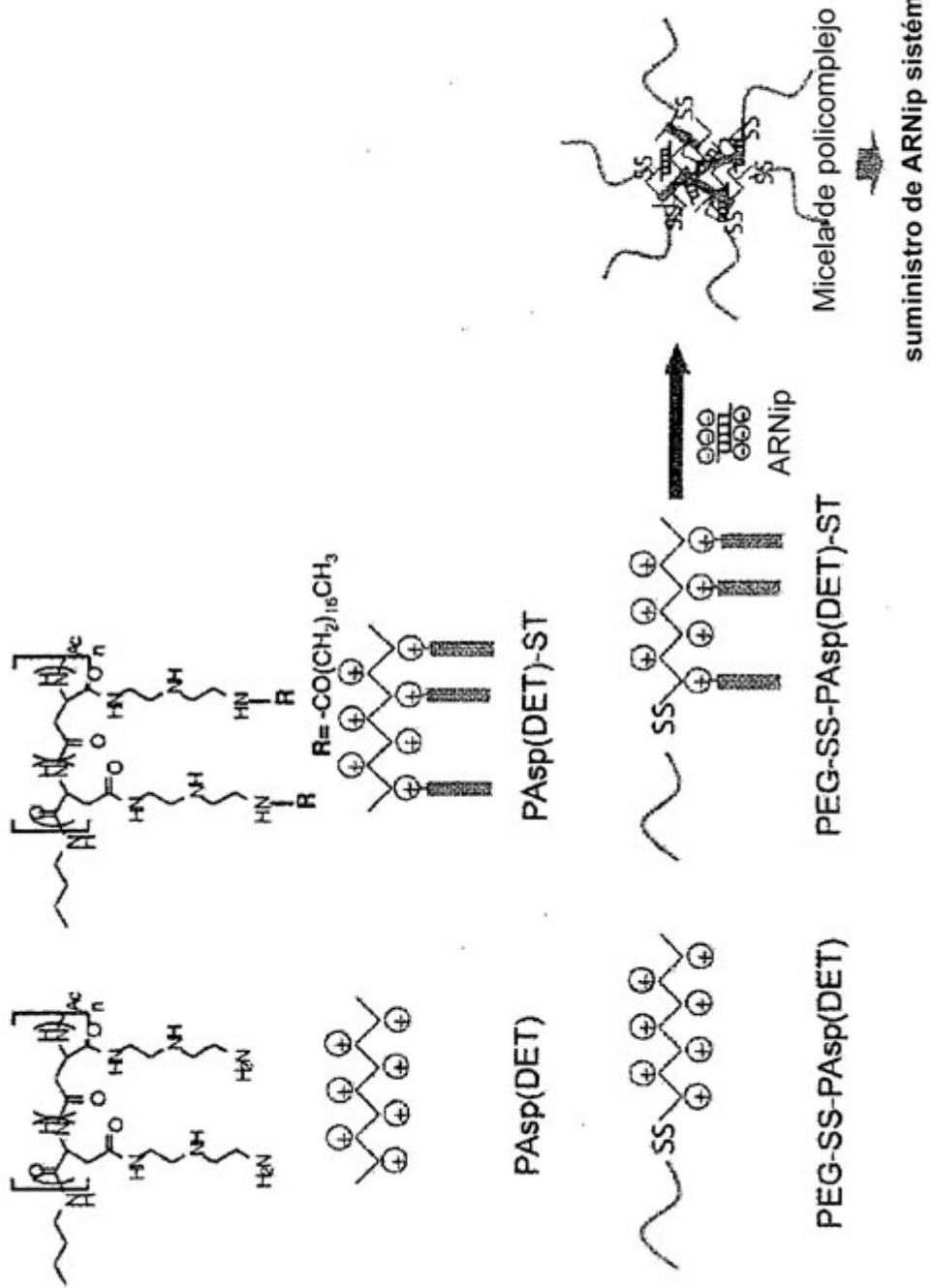


Fig.9

