

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 767**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

C08F 220/28 (2006.01)

C08F 293/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09825524 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2364330**

54 Título: **Copolímeros multibloque**

30 Prioridad:

13.05.2009 US 177921 P 06.11.2008 US 112054 P

18.09.2009 US 243898 P 24.12.2008 US 140779 P

24.12.2008 US 140774 P 21.04.2009 US 171358 P

06.11.2008 US 112048 P 21.04.2009 US 171369 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2015

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:

PRIEVE, MARY G.;
JOHNSON, PAUL H.;
STAYTON, PATRICK S.;
HOFFMAN, ALLAN S.;
OVERELL, ROBERT W.;
GALL, ANNA S.;
PASCHAL, AMBER E. E.;
DIAB, CHARBEL;
DE, PRIYADARSI;
DECLUE, MICHAEL S. y
MONAHAN, SEAN D.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 540 767 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 multibloque

5 [0001] La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 61/112.048, presentada el 6 de noviembre de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos Nº de Serie 61/112.054, presentada el 6 de noviembre de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 61/140.774, presentada el 24 de diciembre de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 61/140.779, presentada el 24 de diciembre de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 61/171.358, presentada el 21 de abril de 2009, solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 61/171.369, presentada el 21 de abril de 2009; US nº de Serie 61/177.921, presentada el 13 de mayo de 2009; y solicitud de patente de Estados Unidos nº de Serie 61/243.898, presentada el 18 de septiembre de 2009.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En ciertos casos, es beneficioso proporcionar agentes terapéuticos, tales como polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos) a las células vivas. En algunos casos, la liberación de dichos polinucleótidos a una célula viva proporciona un beneficio terapéutico.

20 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0003] La presente invención proporciona una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, tal como se describe en las reivindicaciones. También se proporciona un método para la liberación intracelular de un polinucleótido utilizando la composición de la invención. La presente invención también proporciona una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, tal como se describe en las reivindicaciones.

[0004] Entre los diversos aspectos de la presente descripción es una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido. El copolímero de bloques comprende al menos tres bloques de composición diferente. El primero de los tres bloques es un bloque de polímero hidrófilo. El segundo de los tres bloques es un bloque de polímero, que se encuentra entre el primer y el tercer bloque, estando el segundo bloque (i) asociado con el polinucleótido. El tercer bloque es un bloque de polímero hidrófobo que comprende unidades de repetición aniónicas; las unidades de repetición aniónicas tienen una población de aniones como sustituyentes de los mismos que varía en número de una manera dependiente del pH, la población es mayor a pH 7,4 que a pH 5.

[0005] Entre los diversos aspectos de la presente descripción es una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo adecuado para dirigir o proteger estéricamente el polinucleótido, un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, asociándose el segundo bloque con el polinucleótido, y un tercer bloque, comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH.

[0006] Otro aspecto de la descripción se dirige a una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, asociándose el segundo bloque con el polinucleótido, y un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos.

[0007] Otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque hidrófilo y comprendiendo una pluralidad de residuos monoméricos catiónicos en asociación iónica con el polinucleótido, y un tercer bloque, comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH.

[0008] Otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque un bioconjugado de polímero que comprende el polinucleótido acoplado covalentemente al segundo bloque, y un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH.

[0009] Otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo adecuado para dirigir o proteger estéricamente el polinucleótido, un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque un bioconjugado de polímero que comprende el polinucleótido

acoplado covalentemente al segundo bloque, y un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos.

5 **[0010]** En otro aspecto de la descripción se refiere a micelas poliméricas que comprenden las composiciones descritas en el presente documento.

10 **[0011]** Se proporciona en ciertas realizaciones en el presente documento una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende:

- 15 a. un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de protección hidrófilo;
 b. un segundo bloque, estando el segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque un bloque portador de polinucleótido; y
 c. un tercer bloque, siendo el tercer bloque un bloque hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH; asociándose la pluralidad de copolímeros de bloque en la micela de tal manera que la micela es estable en un medio acuoso a pH 7,4.

20 **[0012]** Se proporciona en ciertas realizaciones en el presente documento una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende:

- 25 a. un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo adecuado para dirigir o proteger estéricamente el polinucleótido,
 b. un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, asociándose el segundo bloque al polinucleótido; y
 c. un tercer bloque, comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH; asociándose la pluralidad de copolímeros de bloque en la micela, siendo la micela estable en un medio acuoso a pH 7,4.

30 **[0013]** Se proporciona en ciertas realizaciones en el presente documento una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende:

- 35 a. un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo,
 b. un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, asociándose el segundo bloque al polinucleótido; y
 c. un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos, estando la pluralidad de copolímeros de bloque asociados en la micela, siendo la micela estable en un medio acuoso a pH 7,4.

40 **[0014]** Se proporciona en ciertas realizaciones en el presente documento una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende:

- 45 a. un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo,
 b. un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque hidrófilo y comprendiendo una pluralidad de residuos monoméricos catiónicos en asociación iónica con el polinucleótido, y
 c. un tercer bloque, comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH, estando asociada la pluralidad de copolímeros de bloque en la micela, siendo la micela estable en un medio acuoso a pH 7,4.

50 **[0015]** Se proporciona en ciertas realizaciones en el presente documento una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende:

- 55 a. un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo,
 b. un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, siendo el segundo bloque un bioconjugado de polímero que comprende el polinucleótido acoplado covalentemente al segundo bloque, y
 c. un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH, estando asociada la pluralidad de copolímeros de bloque en la micela, siendo la micela estable en un medio acuoso a pH 7,4.

60 **[0016]** Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para preparar una composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo el método mezclar un copolímero de bloques con un primer medio de desnaturalización, comprendiendo el copolímero de bloques un primer, un segundo y un tercer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, siendo el segundo bloque un bloque de polímero hidrófilo situado entre el primer y tercer bloques que comprende un resto que tiene la capacidad para la asociación con un polinucleótido, siendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo pH hidrófobo desestabilizante de membrana y dependiente del pH, exponer el copolímero de bloques a un segundo medio acuoso, permitir que el copolímero de bloques se asocie en el medio acuoso para formar una micela, y asociar un polinucleótido con el segundo bloque del copolímero de bloque.

65

[0017] Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los copolímeros de bloques o micelas de la presente invención.

5 [0018] Un aspecto adicional de la presente descripción es el uso de un copolímero de bloques o micela de la presente invención en la fabricación de un medicamento.

10 [0019] Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para la liberación intracelular de un polinucleótido, comprendiendo el método poner en contacto una composición que comprende un copolímero de bloques o micela de la presente invención con una superficie de la célula en un medio en un primer pH; introducir la composición en una membrana endosomal dentro de la célula a través de endocitosis; y desestabilizar la membrana endosomal, con lo que la composición o el polinucleótido se liberan al citosol de la célula.

15 [0020] Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para modular la actividad de una diana intracelular en una célula, comprendiendo el método: liberar un polinucleótido al citosol de una célula usando una composición que comprende un copolímero de bloques o micela de la presente invención, y permitir que el polinucleótido interactúe con la diana intracelular, con lo que se modula la actividad de la diana intracelular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 [0021] La **figura 1** ilustra la síntesis de poli [PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA].
 La **figura 2** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA] por RMN
 La **figura 3** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA] por GPC.
 La **figura 4** ilustra la síntesis de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA]-b-[DMAEMA-BMA-PAA].
 La **figura 5** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA]-b-[DMAEMA-BMA-PAA] por RMN.
 25 La **figura 6** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA]-b-[DMAEMA-BMA-PAA] por GPC.
 La **figura 7** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA]-b-[DMAEMA-BMA-PAA] por RMN en PBS-d.
 La **figura 8** ilustra la caracterización de poli[PEGMA-MAA(NHS)]-b-[DMAEMA]-b-[DMAEMA-BMA-PAA] por DLS.

30 ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

[0022] Cuando se introducen elementos de la presente invención o la realización o realizaciones preferidas de la misma, los artículos "un", "una", "el/la" y "dicho/a" se pretende significar que hay uno o más de los elementos. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser inclusivos y significan que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

35

[0023] Alifático: a menos que se indique lo contrario, "alifático" o "grupo alifático" significa un resto hidrocarbonado no aromático opcionalmente sustituido. El resto puede ser, por ejemplo, lineal, ramificado o cíclico (por ejemplo, mono- o policíclico, tales como policíclico fusionado, con puente, o condensado a espiro), o una combinación de los mismos. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alifáticos contienen 1-20 átomos de carbono.

40

[0024] Alquilo: a menos que se indique lo contrario, los grupos alquilo descritos en este documento son preferiblemente alquilo inferior que contiene de uno a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 20 átomos de carbono. Pueden ser lineales, ramificados o cíclicos e incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo y similares.

45

[0025] Amino: a menos que se indique lo contrario, el término "amino" tal como se usa aquí solo o como parte de otro grupo, indica el resto $-NR_1R_2$, en el que R_1 y R_2 son hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido o heterociclo.

[0026] Amida o Amido: a menos que se indique lo contrario, los restos "amida" o "amido" representan un grupo de la fórmula $-CONR_1R_2$ en la que R_1 y R_2 son como se definen en relación con el término "amino". "Amida sustituida", por ejemplo, se refiere a un grupo de fórmula $-CONR_1R_2$ en el que al menos uno de R_1 y R_2 es distinto de hidrógeno. "Amido no sustituido", por ejemplo, se refiere a un grupo de fórmula $-CONR_1R_2$, en el que R_1 y R_2 son ambos hidrógeno.

50

[0027] Monómero aniónico, unidad monomérica aniónica o unidad de repetición aniónica: a menos que se indique lo contrario, un "monómero aniónico", "unidad monomérica aniónica" o "unidad de repetición aniónica" es un monómero o unidad monomérica que lleva un grupo que está presente en un estado de carga aniónico o en un estado no cargado, pero en el estado no cargado es capaz de convertirse cargado aniónico, por ejemplo, tras eliminar un electrófilo (por ejemplo, un protón (H^+), por ejemplo, en una forma dependiente de pH). En ciertos casos, el grupo está sustancialmente cargado negativamente a un pH aproximadamente fisiológico, pero se somete a protonación y se convierte en sustancialmente neutro a un pH débilmente ácido. Los ejemplos no limitantes de tales grupos incluyen grupos carboxilo, ácido barbitúrico y sus derivados, xantina y derivados de los mismos, ácidos borónicos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfónicos, ácidos sulfónicos, fosfatos y sulfonamidas.

55

60

[0028] Especies aniónicas: a menos que se indique lo contrario, una "especie aniónica" es un grupo, residuo o molécula que está presente en un estado cargado aniónico o estado no cargado, pero en el estado no cargado es capaz de convertirse en cargado aniónico, por ejemplo, tras la eliminación de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H^+), por

65

ejemplo en una forma dependiente de pH). En ciertos casos, el grupo, residuo o molécula está sustancialmente cargado negativamente a un pH aproximadamente fisiológico, pero se somete a protonación y se convierte en sustancialmente neutro a un pH débilmente ácido.

5 **[0029]** Arilo: a menos que se indique lo contrario, el término "arilo" o "grupo arilo" se refiere a sistemas anulares monocíclicos, bicíclicos, y tricíclicos opcionalmente sustituidos que tienen un total de cinco a catorce miembros en el anillo, en donde al menos un anillo en el sistema es aromático y en donde cada anillo en el sistema contiene de tres a siete miembros de anillo. Los términos "arilo" o "Ar" según se usan aquí solos o como parte de otro grupo indican grupos aromáticos homocíclicos opcionalmente sustituidos, preferiblemente grupos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 10 6 a 12 carbonos en la parte del anillo, tales como fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo sustituido, bifenilo sustituido o naftilo sustituido. Fenilo y fenilo sustituido son los arilo más preferido

15 **[0030]** Unido: A menos que se indique lo contrario, dos restos o compuestos están "unidos" si se mantienen juntos por cualquier interacción, incluyendo, a modo de ejemplo, uno o más enlaces covalentes, una o más interacciones no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, fuerzas estáticas, interacciones de van der Waals, combinaciones de los mismos, o similares), o una combinación de los mismos.

20 **[0031]** Copolímero de bloques: a menos que se indique lo contrario, un "copolímero de bloques" comprende dos o más subunidades de homopolímero o copolímero unidos por enlaces covalentes. Los copolímeros de bloques con dos o tres bloques distintos se denominan copolímeros dibloque y copolímeros tribloque, respectivamente. Una generalización esquemática de un copolímero dibloque está representada por la fórmula $[A_a B_b C_c \dots]_m - [X_x Y_y Z_z \dots]_n$, en la que cada letra representa una unidad constitucional o monomérica, y en donde cada subíndice a una unidad constitucional representa la fracción molar de esa unidad en el bloque particular, los tres puntos indican que pueden haber más (también pueden haber menos) unidades constitucionales en cada bloque y m y n indican el peso molecular de cada bloque en el 25 copolímero dibloque. Como sugiere en el esquema, en algunos casos, el número y la naturaleza de cada unidad constitucional se controla por separado por cada bloque. El esquema no pretende y no debe interpretarse para inferir cualquier tipo de relación entre el número de unidades constitucionales o el número de diferentes tipos de unidades constitucionales en cada uno de los bloques. Tampoco el esquema pretende describir ningún número en particular o disposición de las unidades constitucionales dentro de un bloque concreto. En cada bloque las unidades 30 constitucionales pueden disponerse en configuraciones puramente aleatorias, una aleatoriedad alternada, una aleatoriedad regular, un bloque regular o un bloque aleatorio a menos que se indique expresamente lo contrario. Una configuración puramente aleatoria, por ejemplo, puede tener la forma no limitante: x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z... Una configuración aleatoria alternada no limitante de ejemplo puede tener la forma no limitante: x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z..., y una configuración alterna regular de ejemplo puede tener la forma no limitante: x-y-z-x-y-z-x-y-z... Una configuración de 35 bloque regular de ejemplo puede tener la siguiente configuración no limitante: ... x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x- ..., mientras que una configuración de bloque al azar de ejemplo puede tener la configuración no limitante: ...x-x-x-z-z-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z... En un polímero en gradiente, el contenido de una o más unidades monoméricas aumenta o disminuye de manera gradiente desde el extremo alfa del polímero al extremo omega. En ninguno de los ejemplos genéricos precedentes la yuxtaposición particular de unidades o bloques constitucionales individuales o el número de unidades 40 constitucionales en un bloque o el número de bloques destinados es ni debe interpretarse de ningún modo que lleva o limita la estructura real de copolímeros de bloque que forman una micela aquí descrita. Como se usa en este documento, los corchetes que encierran las unidades constitucionales no pretenden ni deben interpretarse en el sentido de que las propias unidades constitucionales forman bloques. Es decir, las unidades constitucionales dentro de los corchetes pueden combinarse de cualquier manera con las otras unidades constitucionales dentro del bloque, es decir, 45 configuraciones puramente aleatoria, aleatoria alterna, alterna regular, de bloques regular o de bloques al azar. Los copolímeros de bloques descritos en el presente documento son, opcionalmente, copolímeros alternados, en gradiente o de bloques al azar. En algunas realizaciones, los copolímeros de bloque son copolímeros dendrímeros, estrella o injerto.

50 **[0032]** Monómero catiónico, unidad monomérica catiónica o unidad de repetición catiónica: a menos que se indique lo contrario, un "monómero catiónico", "unidad monomérica catiónica" o "unidad de repetición catiónica" es un monómero o una unidad monomérica o de repetición (los términos "unidad monomérica" y "unidad de repetición" se utilizan indistintamente) que lleva un catión o un resto capaz de tener una carga catiónica tras la adición de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H⁺)).

55 **[0033]** Especies cargables, grupo cargable o unidad monomérica cargable: a menos que se indique lo contrario, una "especie cargable", "grupo cargable" o "unidad monomérica cargable" es una especie, grupo o unidad monomérica en un estado cargado o no cargado. En ciertos casos, una "unidad monomérica cargable" es una que se puede convertir en un estado cargado (ya sea en estado cargado aniónico o catiónico) mediante la adición o eliminación de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H⁺), por ejemplo de una manera dependiente del pH). El uso de cualquiera de los términos "especie cargable", "grupo cargable", o "unidad monomérica cargable" incluye la divulgación de cualquier otro de una "especie cargable", "grupo cargable", o "unidad monomérica cargable" a menos que se indique lo contrario. Una "especie cargable" que está "cargada o es cargable a anión" o "cargada o cargable a una especie aniónica" es una especie o grupo que está en un estado cargado aniónico o un estado no cargado, pero en el estado no cargado es capaz de convertirse en un estado cargado aniónico, por ejemplo, por la eliminación de un electrófilo, tal como un protón 60 (H⁺). Una "especie cargable" que está "cargada o es cargable a catión" o "cargada o cargable a una especie catiónica"

es una especie o grupo que está en un estado cargado catiónico o un estado no cargado, pero en el estado no cargado es capaz de convertirse en un estado cargado catiónico, por ejemplo, por la adición de un electrófilo, tal como un protón (H⁺). "Unidades monoméricas cargables" descritas en el presente documento se utilizan indistintamente con los "residuos monoméricos cargables".

5

[0034] Copolímero: a menos que se indique lo contrario, el término "copolímero" significa que el polímero es el resultado de la polimerización de dos o más monómeros diferentes.

10

[0035] La concentración micelar crítica y CMC: a menos que se indique lo contrario, la "concentración micelar crítica" o "CMC" es la concentración a la que una micela se autoensambla.

15

[0036] Sustrato dicer: a menos que se indique lo contrario, un "sustrato dicer" es un sustrato para el miembro de la familia de ARNasa III Dicer en las células, poseyendo el sustrato al menos aproximadamente 25 pares de bases de ARN de doble cadena. Los sustratos Dicer se escinden para producir aproximadamente 21 pares de bases de ARN interferente pequeño de doble cadena (siRNA) que evocan un efecto de interferencia de ARN que da lugar al silenciamiento génico por eliminación de ARNm.

20

[0037] Alterado/a: a menos que se indique lo contrario, una micela está "alterada" si no funciona de manera idéntica, sustancialmente similar o de manera similar y/o posee características físicas y/o químicas idénticas, similares o sustancialmente similares como lo haría una micela estable. La "alteración" de una micela se puede determinar de cualquier manera adecuada. En un caso, una micela está "alterada" si no tiene un tamaño de partícula hidrodinámico que sea inferior a 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces, 1,8 veces, 1,6 veces, 1,5 veces, 1,4 veces, 1,3 veces, 1,2 veces, o 1,1 veces el tamaño de partícula hidrodinámica de una micela que comprende los mismos copolímeros en bloque y se forma en una solución acuosa a un pH de 7,4, o se forma en el suero humano. En un caso, una micela está "alterada" si no tiene una concentración de ensamblaje que sea inferior a 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces, 1,8 veces, 1,6 veces, 1,5 veces, 1,4 veces, 1,3 veces, 1,2 veces, o 1,1 veces la concentración de ensamblaje de una micela que comprende los mismos copolímeros en bloque y se forma en una solución acuosa a un pH de 7,4, o se forma en suero humano.

25

30

[0038] Endosoma perturbador y endosomolítico: a menos que se indique lo contrario, una composición es "perturbadora de endosoma", también se referida a veces como "endosomolítica" si el efecto de la composición sobre el endosoma es aumentar la permeabilidad de la membrana endosomal.

35

[0039] Heteroalquilo: a menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquilo" significa un grupo alquilo en el que al menos uno de los átomos de carbono de cadena principal se sustituye por un heteroátomo.

40

[0040] Heteroarilo: a menos que se indique lo contrario, el término "heteroarilo" significa un grupo arilo en el que al menos uno de los miembros del anillo es un heteroátomo, y preferiblemente 5 o 6 átomos en cada anillo. El grupo heteroaromático tiene preferiblemente 1 o 2 átomos de oxígeno, 1 ó 2 átomos de azufre, y/o 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, y puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los heteroaromáticos de ejemplo incluyen furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo, quinolinilo, o isoquinolinilo y similares. Los sustituyentes de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto (es decir, =O), hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

45

[0041] Heteroátomo: a menos que se indique lo contrario, el término "heteroátomo" significa un átomo distinto de hidrógeno o carbono, tales como un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo, boro, arsénico, selenio o silicio.

50

[0042] Heterociclo: a menos que se indique lo contrario, los términos "heterociclo" y "heterocíclico", tal como se usa aquí solo o como parte de otro grupo, indican grupos aromáticos o no aromáticos, monocíclicos o bicíclicos, completamente saturados o insaturados, opcionalmente sustituidos, que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo, y preferiblemente 5 o 6 átomos en cada anillo. El grupo heterociclo tiene preferiblemente 1 o 2 átomos de oxígeno, 1 o 2 átomos de azufre, y/o 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, y puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los heterociclo de ejemplo incluyen compuestos heteroaromáticos, tales como furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo, quinolinilo, o isoquinolinilo y similares. Los sustituyentes de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto, hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

55

60

[0043] Heterohidrocarbilo: a menos que se indique lo contrario, el término "heterohidrocarbilo" significa un grupo hidrocarbilo en el que al menos uno de los átomos de carbono de la cadena se sustituye por un heteroátomo.

65

[0044] Hidrocarburo o hidrocarbilo: a menos que se indique lo contrario, los términos "hidrocarburo" y "hidrocarbilo", tal como se usa aquí, describen compuestos o radicales orgánicos que consisten exclusivamente en los elementos carbono e hidrógeno. Estos restos incluyen alquilo, alquenilo, alquinilo, y arilo. Estos restos también incluyen alquilo, alquenilo, alquinilo, y arilo sustituidos con otros grupos hidrocarbonados alifáticos o cíclicos, tales como alcarilo, alquenarilo y alquinarilo. A menos que se indique lo contrario, estos restos comprenden preferiblemente 1 a 20 átomos de carbono.

[0045] Hidrófobo: a menos que se indique lo contrario, los términos "hidrófobos" y "hidrofobicidad" son términos de la técnica que describen una propiedad física de una composición medida por la energía libre de transferencia de la composición entre un disolvente no polar y agua (Hydrophobicity regained. Karplus PA, Protein Sci, 1997, 6: 1302-1307). La hidrofobicidad de una composición se puede medir por su valor logP, el logaritmo de un coeficiente de reparto (P), que se define como la relación de concentraciones de un compuesto en las dos fases de una mezcla de dos disolventes inmiscibles, por ejemplo, octanol y agua. Los métodos experimentales de determinación de la hidrofobicidad, así como los métodos de cálculo asistido por ordenador de los valores de logP son conocidos por los expertos en la técnica. Las especies hidrófobas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, grupos alifático, heteroalifático, arilo, y heteroarilo.

[0046] Núcleo hidrófobo: a menos que se indique lo contrario, un "núcleo hidrófobo" comprende restos hidrófobos. En ciertos casos, un "núcleo hidrófobo" es sustancialmente no cargado (por ejemplo, la carga neta es sustancialmente neutra).

[0047] Unidad de repetición hidrófoba: a menos que se indique lo contrario, una "unidad de repetición hidrófoba" o una "unidad de monomérica hidrófoba" es una unidad de repetición o unidad monomérica de un polímero que posee un sustituyente hidrófobo.

[0048] Especie hidrófoba: a menos que se indique lo contrario, los términos "especies hidrófobas" y "resto para aumento de la hidrofobicidad" es un resto, tal como un sustituyente, residuo o un grupo que, cuando se une covalentemente a una molécula, tal como un monómero o una polímero, aumenta la hidrofobicidad de la molécula.

[0049] La inhibición, silenciamiento, atenuación o eliminación ("Knock-Down"): a menos que se indique lo contrario, los términos "inhibición", "silenciamiento" y "atenuación", tal como se usa aquí, se refieren a una reducción medible en la expresión de un ARNm diana o la proteína correspondiente en comparación con la expresión del ARNm diana o la proteína correspondiente en ausencia de un agente knockdown. "Knockdown", o la reducción en la expresión del ARNm diana o la proteína correspondiente, se puede evaluar mediante la medición de los niveles de ARNm utilizando técnicas bien conocidas en el sector, tales como amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), hibridación en solución de ARN, protección de nucleasa, transferencia e hibridación Northern, y la expresión génica que se monitoriza con un microarray; y en el caso de las proteínas mediante técnicas bien conocidas en el sector, tales como SDS-PAGE, unión a anticuerpo, análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis de células activadas por fluorescencia e inmunocitoquímica.

[0050] Inhibir la expresión génica: a menos que se indique lo contrario, la frase "inhibir la expresión génica" significa causar cualquier reducción medible en la cantidad de un producto de expresión del gen. El producto de expresión puede ser un ARN transcrito a partir del gen (por ejemplo, un ARNm) y/o un polipéptido traducida de un ARNm transcrito a partir del gen. El nivel de expresión puede determinarse usando técnicas estándar para la medición de ARNm o proteína.

[0051] Polímero desestabilizador de membrana o bloque desestabilizador de membrana: a menos que se indique lo contrario, un "polímero desestabilizador de membrana" o un "bloque desestabilizador de membrana" pueden provocar directa o indirectamente un cambio (por ejemplo, un cambio de permeabilidad) en una estructura de membrana celular (por ejemplo, una membrana endosomal) a fin de permitir que un agente (por ejemplo, polinucleótido), en asociación con o independiente de una micela (o un polímero constituyente de la misma), pase a través de dicha estructura de la membrana, por ejemplo, para entrar en una célula o para salir de una vesícula celular (por ejemplo, un endosoma). Un polímero desestabilizador de membrana puede ser (pero no es necesariamente) un polímero perturbador de membrana. Un polímero perturbador de membrana puede provocar directa o indirectamente la lisis de una vesícula celular o, en cualquier caso, alterar una membrana celular (por ejemplo, como se observa para una fracción sustancial de una población de membranas celulares). Generalmente, las propiedades perturbadoras o desestabilizadoras de membrana de polímeros o micelas pueden evaluarse por diversos medios. En un enfoque no limitante, se puede observar un cambio en una estructura de membrana celular mediante la evaluación en ensayos que miden (directa o indirectamente) la liberación de un agente (por ejemplo, polinucleótido) de las membranas celulares (por ejemplo, membranas endosomales), por ejemplo, mediante la determinación de la presencia o ausencia de dicho agente, o una actividad de dicho agente, en un entorno externo a dicha membrana. Otro enfoque no limitante implica la medición de la lisis de glóbulos rojos (hemólisis), por ejemplo, como un ensayo sustituto para una membrana celular de interés. Dichos ensayos se pueden realizar a un solo valor de pH o en un intervalo de valores de pH.

[0052] Micela: a menos que se indique lo contrario, una "micela" es una partícula que comprende un núcleo y una envoltura hidrófila, en el que el núcleo se mantiene unido al menos parcialmente, predominantemente o sustancialmente a través de interacciones hidrófobas. La micela puede ser, por ejemplo, una nanopartícula multicomponente que comprende al menos dos dominios, el dominio interior o núcleo, y el dominio exterior o envoltura. Las partículas de micelas descritas en este documento pueden tener cualquier diámetro adecuado o deseado, por ejemplo, de menos de 1000 nanómetros (nm). En general, la micela debe tener unas dimensiones lo suficientemente pequeñas para permitir su absorción por las células eucariotas. Habitualmente, la micela tiene una dimensión lateral más larga, también conocida como el diámetro, de 200 nm o menos. En algunas realizaciones, la micela tiene un diámetro de 100 nm o

menos. Micelas más pequeñas, por ejemplo, con diámetros de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm, o de 50 nm o menos, por ejemplo, 5 nm-30 nm, se utilizan en algunas realizaciones. El tamaño de partícula de las micelas se puede determinar de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de permeación en gel (GPC), dispersión de luz dinámica (DLS), técnicas de microscopía electrónica (por ejemplo, TEM), y otros métodos.

[0053] Las unidades de repetición no cargadas: a menos que se indique lo contrario, una "unidad de repetición no cargada" es una unidad de repetición que no es ni una unidad de repetición aniónica ni una unidad de repetición catiónica.

[0054] Nucleósido: a menos que se indique lo contrario, el término "nucleósido" se utiliza para describir una composición que comprende un monosacárido y una base. El monosacárido incluye, pero sin limitación, monosacáridos de pentosa y hexosa. El monosacárido también incluye miméticos de monosacáridos y monosacáridos modificados mediante la sustitución de grupos hidroxilo con halógenos, metoxi, hidrógeno o grupos amino, o mediante esterificación de grupos hidroxilo adicionales.

[0055] Nucleótido: a menos que se indique lo contrario, el término "nucleótido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que sea o se pueda incorporar en una cadena de polinucleótido (por ejemplo, oligonucleótido). En algunas realizaciones, un nucleótido es un compuesto y/o sustancia que es o puede incorporarse en un polinucleótido (por ejemplo, oligonucleótido) de la cadena a través de un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "nucleótido" se refiere a residuos individuales de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos). En ciertas realizaciones, "al menos un nucleótido" se refiere a uno o más nucleótidos presentes; en diversas realizaciones, dicho uno o más nucleótidos son nucleótidos discretos, están unidos no covalentemente el uno a otro, o están unidos covalentemente el uno al otro. Por tanto, en ciertos casos, "al menos un nucleótido" se refiere a uno o más polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótido). En algunas realizaciones, un polinucleótido es un polímero que comprende dos o más unidades monoméricas de nucleótidos.

[0056] Oligonucleótido: a menos que se indique lo contrario, el término "oligonucleótido" se refiere a un polímero que comprende 7-200 unidades monoméricas de nucleótidos. En algunas realizaciones, "oligonucleótido" abarca ARN de cadena simple y/o doble cadena, así como ADN de cadena simple y/o doble cadena. Además, los términos "nucleótidos", "ácido nucleico", "ADN", "ARN", y/o términos similares incluyen análogos de ácidos nucleicos, es decir, análogos que tienen un esqueleto modificado, incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosfono-PNA, ácidos morfolinonucleicos, o ácidos nucleicos con grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos, fosfonatos, enlaces 5'-N-fosforamidita). Los nucleótidos se pueden purificar a partir de fuentes naturales, se pueden producir usando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente se purifican, se sintetizan químicamente, etc. En algunas realizaciones, un nucleótido es o comprende un nucleósidofosfato natural (por ejemplo adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidinafosfato). En algunas realizaciones, la base incluye cualquier base de origen natural en diversos ácidos nucleicos, así como otras modificaciones que imitan o se asemejan a dichas bases de origen natural. Ejemplos no limitantes de bases modificadas o derivatizadas incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, 2-aminoadenina, pirrolpirimidina, y 2,6-diaminopurina. Las bases de nucleósidos también incluyen nucleobases universales, tales como difluorotolilo, nitroindolilo, nitropirrolilo o nitroimidazolilo. Los nucleótidos también incluyen nucleótidos que albergan una etiqueta o contienen monómeros abásicos, es decir, que carecen de una base. Una secuencia de ácido nucleico se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. Un nucleótido se puede unir a otro nucleótido en una manera específica de secuencia a través de enlaces de hidrógeno mediante pares de bases Watson-Crick. Dichas pares de bases se dice que son complementarias entre sí. Un oligonucleótido puede ser monocatenario, bicatenario o de triple cadena.

[0057] Modulador de la expresión génica de oligonucleótidos: tal como se usa aquí, un "modulador de la expresión génica de oligonucleótido" es un agente oligonucleótido capaz de inducir una modulación selectiva de la expresión génica en una célula viva mediante mecanismos, incluyendo, pero sin limitación, un mecanismo antisentido o por medio de

[0058] mecanismo mediado por ARN de interferencia (ARNi) que puede incluir (i) la inactivación de la transcripción; (ii) la degradación o secuestro del ARNm; (iii) la inhibición o la atenuación de la transcripción o (iv) la inhibición o la atenuación de la traducción. Los moduladores de la expresión génica de oligonucleótido incluyen, ARN regulador (incluyendo prácticamente cualquier ARN regulador), tal como, pero sin limitación a, oligonucleótidos antisentido, miARN, siARN, ARNi, shARN, aptámeros y cualquier análogo o precursor de los mismos.

5 **[0059]** El agente oligonucleótido knockdown: a menos que se indique lo contrario, un "agente oligonucleótido knockdown" es una especie de oligonucleótido que puede inhibir la expresión génica mediante el reconocimiento y la unión de un ácido nucleico intracelular de una manera específica de secuencia. Ejemplos no limitantes de agentes oligonucleótidos knockdown incluyen siARN, miARN, shARN, sustratos dicer, oligonucleótidos antisentido, ADN o ARN señuelo, oligonucleótidos antígenos y cualquier análogo y precursor de los mismos.

10 **[0060]** Desestabilizadores de membrana dependientes del pH: a menos que se indique lo contrario, un grupo o bloque "desestabilizador de membrana dependiente del pH" es un grupo o bloque que es al menos parcialmente, predominantemente, o sustancialmente hidrófobo y es desestabilizador de membrana de una forma dependiente de pH. En ciertos casos, un bloque de polímero desestabilizador de membrana dependiente del pH es un segmento polimérico hidrófobo de un copolímero de bloques y/o comprende una pluralidad de especies hidrófobas; y comprende una pluralidad de especies cargables. En algunas realizaciones, la especie cargable es aniónica. En algunas realizaciones, la especie cargable aniónica es aniónica a pH aproximadamente neutro. En realizaciones adicionales o alternativas, la especie cargable aniónica no está cargada a un pH inferior, por ejemplo, endosomal. En algunas realizaciones, e hidrófobo cargable desestabilizador de membrana comprende una pluralidad de especies catiónicas. El hidrófobo cargable desestabilizador de membrana dependiente del pH comprende un esqueleto de polímero no peptídico y no lipídico. Por ejemplo, un bloque desestabilizador de membrana dependiente del pH puede poseer unidades de repetición aniónicas, los sustituyentes de las cuales están predominantemente ionizadas (aniones) en un pH, por ejemplo, pH 7,4, y predominantemente neutros a un pH menor, por ejemplo, pH 5,0 mediante lo cual el grupo o bloque desestabilizador de membrana dependiente del pH se vuelve cada vez más hidrófobo en función de la caída del pH de 7,4 a 5,0.

25 **[0061]** Agente ARNi: a menos que se indique lo contrario, el término "agente ARNi" se refiere a un oligonucleótido que puede mediar en la inhibición de la expresión génica a través de un mecanismo de ARNi e incluye, pero no se limita a, siARN, microARN (miARN), ARN de horquilla corta (shRNA), ARN de interferencia asimétrica (aiARN), sustrato dicer y precursores de los mismos

30 **[0062]** ARN de interferencia (ARNi): a menos que se indique lo contrario, el término "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere a la inhibición específica de secuencia de la expresión génica y/o reducción de ARNm diana y los niveles de proteína mediados por una ARN al menos parcialmente de doble cadena, que comprende también una parte que es sustancialmente complementaria a un ARN diana.

35 **[0063]** ARN de horquilla corta (shARN): a menos que se indique lo contrario, "ARN de horquilla corta" o "shARN" se refiere a un oligonucleótido que tiene al menos dos partes complementarias hibridadas o capaz de hibridarse entre sí para formar una estructura de doble cadena (duplex) y al menos una parte de una sola cadena.

40 **[0064]** ARN corto de interferencia (siARN): a menos que se indique lo contrario, "ARN corto de interferencia" o "siARN" se refiere a un agente ARNi que tiene aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud y, opcionalmente, comprende, además, de cero a dos salientes monocatenarios. Una cadena del siARN incluye una parte que se hibrida con un ARN diana de una manera complementaria. En algunas realizaciones, pueden existir uno o más desajustes entre el siARN y la parte reconocida del ARN diana. En algunas realizaciones, los siARN median la inhibición de la expresión génica al causar la degradación de transcritos diana.

45 **[0065]** Estable: a menos que se indique lo contrario, una micela descrita en este documento es "estable" si el ensamblaje no se disocia o se desestabiliza. En ciertos casos, un ensamblaje micélico estable es aquel que tiene un tamaño de partícula hidrodinámico que está dentro de aproximadamente el 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, o 10% del tamaño de partícula hidrodinámico de un ensamblaje micélico que comprende los mismos copolímeros de bloque formados inicialmente en una solución acuosa a un pH de 7,4 (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4). En algunos casos, un ensamblaje micélico estable es aquel que tiene una concentración de formación/ensamblaje que está dentro de aproximadamente 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, o 10% de la concentración de formación/ensamblaje de un ensamblaje micélico que comprende los mismos copolímeros de bloque inicialmente en una solución acuosa a un pH de 7,4 (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4).

55 **[0066]** Bloque sustancialmente no cargado: a menos que se indique lo contrario, el término "bloque sustancialmente no cargado" significa un bloque polimérico que tiene una carga neutra, o una carga casi neutra. Por ejemplo, menos de aproximadamente 10% molar de las unidades de repetición en un bloque serán unidades de repetición aniónicas, catiónicas o zwitteriónicas en un bloque sustancialmente no cargado. A modo de ejemplo adicional, menos de aproximadamente 5% molar de las unidades de repetición en un bloque serán unidades de repetición aniónicas, catiónicas o zwitteriónicas en un bloque sustancialmente no cargado.

60 **[0067]** Sustituido u opcionalmente sustituido: a menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" y "opcionalmente sustituido" significa que el grupo de referencia es o puede estar sustituido con uno o más grupos adecuados, que pueden seleccionarse de forma individual e independientemente entre acetales, acilo, aciloxi, alquenoxi, alcoxi, alquiltio, alquinoxí, amido, amino, arilo, ariloxi, ariltio, carbonilo, carboxamido, carboxilo, ciano, ésteres, éteres, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidroalquilo sustituido, cicloalquilo, halógeno,

heteroalíclico, heteroarilo, hidroxilo, isocianato, isotiocianato, cetales, ceto, mercapto, nitro, perhaloalquilo, sililo, sulfonamido, sulfonilo, tiocarbonilo, tiocianato, tiol, y/o los derivados protegidos de los mismos.

5 **[0068]** Agente terapéutico: a menos que se indique lo contrario, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, órgano, tejido, o célula tiene un efecto terapéutico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

10 **[0069]** Cantidad terapéuticamente eficaz: a menos que se indique lo contrario, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o afección a tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección.

15 **[0070]** El monómero zwitteriónico, unidad monomérica zwitteriónica o unidad de repetición zwitteriónica: a menos que se indique lo contrario, un "monómero zwitteriónico", "unidad monomérica zwitteriónica" o "unidad de repetición zwitteriónica" es un monómero o una unidad monomérica o de repetición (los términos "unidad monomérica" y "unidad de repetición" se utilizan indistintamente) que lleva (i) un catión o un resto capaz de tener una carga catiónica tras la adición de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H⁺)) y (ii) un anión o un resto capaz de tener una carga aniónica tras la eliminación de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H⁺)).

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25 **[0071]** Un aspecto de la presente descripción es un copolímero que comprende tres bloques poliméricos discretos, cada uno teniendo características algo diferentes o proporcionando una función algo diferente. Uno de estos bloques es un bloque polimérico hidrófilo, a veces referido en este documento como el "primer bloque", el "bloque de protección", el "bloque de protección hidrófilo" o simplemente el "bloque hidrófilo." Como se describe en mayor detalle en otra parte en el presente documento, el primer bloque puede ser usado para contribuir a la solubilidad en agua del copolímero, para ayudar en la formación de micelas, para dirigir el copolímero a una diana biológica celular o de otro tipo, para proteger a un agente terapéutico que se asocia con el copolímero, o una combinación de dos o más de los mismos. El segundo de estos bloques, a veces denominado en este documento como el "segundo bloque" o el "bloque portador", está unido a un agente terapéutico, o al menos posee un grupo funcional para unir un agente terapéutico al copolímero. El tercero de estos bloques es un bloque polimérico hidrófobo, a veces referido en el presente documento como el tercer bloque o simplemente el "bloque hidrófobo". Como se describe en mayor detalle en otra parte en el presente documento, el tercer bloque puede ser utilizado para disminuir la solubilidad en agua del copolímero, para ayudar en la formación de micelas, para desestabilizar una membrana celular u otra diana biológica, o una combinación de dos o más de los mismos. El copolímero puede poseer opcionalmente bloques poliméricos adicionales que amplifican la función del primero, segundo y tercer bloques de los copolímeros de la presente descripción, o que introducen otras funcionalidades o propiedades al copolímero. Independientemente del número de bloques, se prefiere generalmente que el bloque portador se encuentre entre el primer bloque (hidrófilo) y el tercer bloque (hidrófobo). Además, el peso molecular promedio en número del primero, segundo y tercer bloque, en combinación es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000 daltons. Además, en una realización, el potencial Zeta de una solución polimérica que contiene un copolímero de bloques de la presente descripción (sin un polinucleótido asociado) es entre ± 6 mV (milivoltios). En una realización preferida, el potencial zeta de la solución polimérica (sin un polinucleótido asociado) es entre ± 5 mV. En una realización preferida, el potencial zeta de la solución polimérica (sin un polinucleótido asociado) es entre ± 2 mV.

45 **[0072]** En general, las propiedades del primer, segundo y tercer bloque pueden ajustarse mediante la selección de los residuos monoméricos que constituyen cada uno de los tres bloques o las fracciones molares relativas. Por ejemplo, el primer bloque es hidrófilo y el tercer bloque es hidrófobo y esta diferencia en la hidrofiliidad se puede conseguir mediante la polimerización de diferentes conjuntos de monómeros para el primer y tercer bloque; alternativamente, el mismo conjunto de monómeros puede usarse para los dos bloques, pero el primer bloque contendrá un porcentaje relativamente mayor de residuos monoméricos hidrófilos para proporcionar al primer bloque un carácter hidrófilo general, mientras que el tercer bloque contendrá un porcentaje relativamente mayor de residuos monoméricos hidrófobos para proporcionar el bloque hidrófobo un carácter hidrófobo general. Del mismo modo, el segundo bloque está unido al polinucleótido. Con respecto al primer y tercer bloque, por lo tanto, el bloque portador comprenderá los residuos de un conjunto diferente de monómeros con respecto al primer y tercer bloque, o al menos un porcentaje diferente de residuos monoméricos que se utilizan para unir el agente terapéutico al bloque portador. El primer, segundo, y tercer bloques poseen así propiedades o funciones algo diferentes entre sí como resultado de las diferencias de composición entre los respectivos bloques.

60 **[0073]** Aunque el bloque portador está situado entre el bloque hidrófilo y el bloque hidrófobo, no está necesariamente inmediatamente adyacente a cada uno. Dicho de otra manera, el bloque portador puede estar acoplado de forma covalente al bloque hidrófilo a través de un resto de unión polimérico o no polimérico. Alternativamente, o adicionalmente, el bloque portador puede estar acoplado de forma covalente al bloque hidrófobo a través de un resto de unión polimérico o no polimérico. Por ejemplo, el bloque portador puede estar acoplado al bloque hidrófilo y/o al bloque hidrófobo mediante una serie de residuos de aminoácidos, residuos de sacarido, residuos de ácido nucleico, etc., para introducir un punto de escisión u otra funcionalidad entre los respectivos bloques. A modo de ejemplo adicional, el bloque portador puede estar acoplado de forma covalente al bloque hidrófilo y/o al bloque hidrófobo mediante un resto

escindible, tal como un resto de unión disulfuro, una hidrazida, un éster, un acetal, o fosfodiéster. En general, se prefiere actualmente que el bloque portador sea inmediatamente adyacente al bloque hidrófilo. También se prefiere actualmente que el bloque portador esté inmediatamente adyacente al bloque hidrófobo.

5 **[0074]** Se proporcionan en ciertas realizaciones en el presente documento, un copolímero de bloques descrito en el presente documento, o una micela que comprende una pluralidad de dichos copolímeros de bloque, comprende un bloque de protección hidrófilo, un bloque portador y un bloque hidrófobo. El bloque portador está entre el bloque de protección hidrófilo y el bloque hidrófobo.

10 **[0075]** Se proporcionan copolímeros de bloques que comprenden al menos tres bloques y micelas de los mismos. Los copolímeros de bloque comprenden al menos tres bloques. En algunas realizaciones, los polímeros descritos en este documento comprenden al menos un bloque hidrófobo y al menos dos bloques hidrófilos. Los polímeros descritos en este documento comprenden al menos un bloque hidrófobo, al menos un bloque hidrófilo, y al menos un bloque asociado con un polinucleótido, estando el bloque asociado con un polinucleótido entre el bloque hidrófilo e hidrófobo.

15 **[0076]** En algunas realizaciones, al menos uno de los bloques hidrófilos comprende una pluralidad de especies cargadas (es decir, es policatiónico, polianiónico, o ambos), y/o está asociado con una molécula que comprende una pluralidad de especies cargadas (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido). En realizaciones específicas, al menos uno de los bloques hidrófilos comprende una pluralidad de especies que están cargadas a pH aproximadamente neutro (es decir, es policatiónico, polianiónico, o ambos a pH aproximadamente neutro). En ciertas realizaciones, al menos uno de los bloques hidrófilos es un bloque de protección. En realizaciones específicas, el bloque de protección no está cargado, por ejemplo, a pH aproximadamente neutro.

20 **[0077]** Se prefiere generalmente que uno o más de los bloques de polímero sea un bloque de copolímero y que el bloque de copolímero sea un bloque de copolímero al azar. Así, por ejemplo, generalmente se prefiere que al menos uno del primero, segundo o tercer bloque sea un copolímero aleatorio que comprende dos o más residuos monoméricos de composición diferente. En un ejemplo, el primer bloque (es decir, el bloque hidrófilo) es un bloque de copolímero aleatorio que comprende dos o más residuos monoméricos de composición diferente. Adicionalmente o alternativamente, el segundo bloque (es decir, el bloque portador) puede ser un copolímero aleatorio que comprende dos o más residuos monoméricos de composición diferente. Adicionalmente o alternativamente, el tercer bloque (es decir, el bloque hidrófobo) puede ser un copolímero aleatorio que comprende dos o más residuos monoméricos de composición diferentes. En algunas realizaciones, el primero o segundo bloque de los polímeros descritos en este documento son bloques de homopolímero. Por ejemplo, en una realización, el primer bloque es un homopolímero y el segundo y tercer bloque son copolímeros aleatorios. A modo de ejemplo adicional, en una realización, el primer y segundo bloque son homopolímeros de composición diferente y el tercer bloque es un copolímero aleatorio. A modo de ejemplo adicional, en una realización, los tres bloques son homopolímeros de composición diferente. A modo de ejemplo adicional más, en una realización, los tres bloques son copolímeros aleatorios de composición diferente.

25 **[0078]** El primero, segundo y tercer bloque comprenden átomos de cadena y grupos colgantes acoplados covalentemente a los átomos de la cadena. Preferiblemente, los átomos de la cadena son carbono o una combinación de (i) átomos de carbono y (ii) azufre y/u oxígeno. Así, por ejemplo, las unidades de repetición del primero, segundo y tercer bloque se seleccionan independientemente del grupo que consiste en unidades de repetición de alqueno sustituido, alquilenglicol sustituido, alquiletioglicol sustituido y tioglicol, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, los átomos de la cadena del primer, segundo y tercer bloque son de carbono. En otra realización, los átomos de la cadena del primero y segundo bloque son independientemente carbono o una combinación de átomos de carbono, oxígeno y azufre, y los átomos de la cadena del tercer bloque son carbono. En otra realización, los átomos de la cadena del primero y segundo bloque son independientemente carbono o una combinación de átomos de carbono y oxígeno, y los átomos de cadena del tercer bloque son carbono. En otra realización, los átomos de cadena del primer y segundo bloque son independientemente carbono o una combinación de átomos de carbono y azufre, y los átomos de la cadena del tercer bloque son carbono. En otra realización, los átomos de cadena del primer bloque son una combinación de átomos de carbono y oxígeno, y los átomos de cadena del segundo y tercer bloque son de carbono. Independiente de la selección de los átomos de la cadena, los grupos colgantes se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, carbonilo sustituido y heterociclo.

30 **[0079]** En una realización preferida, los copolímeros de bloque de la presente descripción se preparan mediante un método diferente de las estrategias de acoplamiento por etapas que implican una secuencia de múltiples reacciones individuales (por ejemplo, tal como se conoce en la técnica para la síntesis de péptidos o para la síntesis de oligonucleótidos). Por ejemplo, en una realización, al menos uno del primer, segundo y tercer bloque se forma por polimerización con crecimiento en cadena, a veces referido como polimerización de adición. A modo de ejemplo adicional, en una realización, al menos dos del primer, segundo y tercer bloques se forman por polimerización con crecimiento en cadena. A modo de ejemplo adicional, en una realización, cada uno del primero, segundo y tercer bloque se forma por polimerización con crecimiento de cadena. Por tanto, el primero, segundo y tercer bloques son no lipídicos.

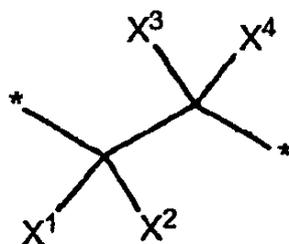
35 **[0080]** Aunque cada uno de los bloques pueden contener unidades de repetición unidas por enlaces amida, formadas por ejemplo, por la reacción de condensación de los aminoácidos o por la reacción de condensación de especies distintas de aminoácidos (por ejemplo, diaminas y ácidos dicarboxílicos), se prefiere en general que la mayoría

5 sustancial de los residuos que constituyen el primer, segund y tercer bloque no sean peptídicos. Dicho de otra manera, se prefiere generalmente que la mayoría sustancial de los residuos del primer, segundo y tercer bloque sean distintos de los residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Por ejemplo, en una realización, al menos el 90% de los residuos que constituyen el primer bloque son distintos de los residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. A modo de ejemplo adicional, en una realización, al menos 90% de los residuos que constituyen el segundo bloque son distintos de los residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. A modo de ejemplo adicional, en una realización, al menos el 90% de los residuos que constituyen el tercer bloque son distintos de los residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. A modo de ejemplo adicional, en una realización, se prefiere que al menos el 90% de los residuos que constituyen el primero, segundo, y tercer bloque, considerados colectivamente, sean distintos de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. A modo de ejemplo adicional, en una realización, se prefiere que al menos el 90% de los residuos que constituyen cada uno del primer, segundo, y tercer bloque sea distinto de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Preferiblemente, cada bloque es un polímero sustancialmente no peptídico (consiste en un polímero que no es un polímero de aminoácidos).

15 **[0081]** En cambio, para mayor claridad, no obstante y sin perjuicio de lo anterior, los restos de reconocimiento y/u otros agentes biomoleculares de la descripción pueden ser un polímero de aminoácidos (por ejemplo, un péptido) o un polímero de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) o un polisacárido. En una realización preferida, los péptidos, sacáridos, o residuos de ácido nucleico están unidos, como grupos colgantes, a las unidades de repetición para aumentar la solubilidad en agua, proporcionar protección, dirigir, o como agentes terapéuticos, u otros grupos hidrófilos o de reconocimiento están unidos como grupos colgantes a las unidades de repetición. Cuando se unen como grupos colgantes, sin embargo, los péptidos, sacáridos y ácidos nucleicos no proporcionan enlaces peptídicos, glucosídicos o fosfodiéster a lo largo del esqueleto del bloque de polímero que lo harían si se incorporan como unidades de repetición.

25 **[0082]** Convenientemente, el primer, segundo y tercer bloque se pueden preparar a partir de monómeros fácilmente polimerizables. Por ejemplo, en una realización, las unidades de repetición son residuos de monómero o monómeros etilénicamente insaturados. En otra, el primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición derivadas independientemente de monómeros de ácido acrílico opcionalmente sustituidos, monómeros de vinil arilo opcionalmente sustituidos, monómeros de acrilamida opcionalmente sustituidos, monómeros de acrilato opcionalmente sustituidos y combinaciones de los mismos.

30 **[0083]** En una realización preferida, el primer bloque, el segundo bloque o el tercer bloque comprende unidades de repetición de Fórmula 1



45 **Formula 1**

en el que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1 a otras unidades de repetición; cada X¹ y X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterociclo, y carbonilo sustituido, a condición, sin embargo, X¹ y X² no se seleccionan, en la misma unidad de repetición, del grupo que consiste en arilo, heteroarilo, carbonilo heterosustituido, y combinaciones de los mismos; cada X³ es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, y cada X⁴ es independientemente carbonilo heterosustituido, arilo o heteroarilo. Por ejemplo, en una de tales realizaciones, el primer, segundo o tercer bloque comprenden unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 en la que X⁴ es arilo o heteroarilo. En otra de dichas realizaciones, el primer, segundo o tercer bloque comprenden unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 en la que X⁴ es -C(O)OX⁴⁰, -C(O)SX⁴⁰, o -C(O)NX⁴⁰X⁴¹, y X⁴⁰ y X⁴¹ son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En otra de tales realizaciones, dos del primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 en la que X⁴ es -C(O)OX⁴⁰, -C(O)SX⁴⁰, o -C(O)NX⁴⁰X⁴¹, y X⁴⁰ y X⁴¹ son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En otra de tales realizaciones, el primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, en la que X⁴ es -C(O)OX⁴⁰, -C(O)SX⁴⁰, o -C(O)NX⁴⁰X⁴¹, y X⁴⁰ y X⁴¹ son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En otra de tales realizaciones, el primer, segundo o tercer bloque comprenden unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, en la que X⁴ es C(O)OX⁴⁰ o -C(O)NX⁴⁰X⁴¹ y X⁴⁰ y X⁴¹ son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo.

50

55

60

65

BLOQUE HIDRÓFILO

5 **[0084]** El primer bloque del copolímero de la presente descripción puede usarse para contribuir con una gama de propiedades o funciones al copolímero. Por ejemplo, el número y la composición de las unidades constituyentes del primer bloque se pueden seleccionar para impartir el grado deseado de solubilidad en agua/dispersabilidad al copolímero. Alternativamente o adicionalmente, en aquellas realizaciones en las que los polímeros de la presente descripción se incorporan en las micelas, el número y la composición de las unidades constituyentes del primer bloque se pueden seleccionar para proporcionar micelas que tienen un tamaño deseado, la concentración crítica de micela u otra propiedad. Independientemente de la formación de micelas, el número y la composición de las unidades constituyentes del primer bloque pueden seleccionarse para dirigir el polímero a una diana biológica celular u otra. Alternativamente o adicionalmente, el número y la composición de las unidades constituyentes del primer bloque se pueden seleccionar para proteger a un agente terapéutico que se asocia con el copolímero.

15 **[0085]** Dependiendo de las propiedades y funcionalidad deseadas, el primer bloque puede ser un bloque homopolímero o un bloque de copolímero. En aquellas realizaciones en las que es un bloque de copolímero, es preferentemente un bloque de copolímero al azar. Por ejemplo, el primer bloque puede ser un bloque de copolímero que comprende dos o más residuos monoméricos de composición diferente. A modo de ejemplo adicional, el primer bloque puede ser un bloque de copolímero que comprende unidades de repetición cargadas (es decir, unidades de repetición catiónicas, unidades de repetición aniónicas, unidades de repetición zwitteriónicas o una combinación de los mismos), unidades de repetición no cargadas, o una combinación de los mismos. En una realización específica, el primer bloque comprende unidades de repetición cargadas. En otra realización específica, el primer bloque comprende unidades de repetición catiónicas. En aún otra realización, el primer bloque comprende unidades de repetición catiónicas y unidades de repetición no cargadas. En aún otra realización, el primer bloque comprende unidades de repetición zwitteriónicas y unidades de repetición no cargadas. En aún otra realización, el primer bloque comprende unidades de repetición exclusivamente no cargadas y el bloque está no cargado a pH neutro. Además, en aquellas realizaciones en las que el primer bloque comprende unidades de repetición catiónicas, el primer bloque puede comprender una combinación de dos o más unidades de repetición catiónicas de composición distinta; en aquellas realizaciones en las que el primer bloque comprende unidades de repetición aniónicas, el primer bloque puede comprender una combinación de dos o más unidades de repetición aniónicas de composición distinta; en aquellas realizaciones en las que el primer bloque comprende unidades de repetición zwitteriónicas, el primer bloque puede comprender una combinación de dos o más unidades de repetición zwitteriónicas de composición distinta; y en aquellas realizaciones en las que el primer bloque comprende unidades de repetición no cargadas, el primer bloque puede comprender una combinación de dos o más unidades de repetición no cargadas de composición distinta.

35 **[0086]** En general, el primer bloque hidrófilo puede contener unidades de repetición aniónicas, unidades de repetición catiónicas, unidades de repetición zwitteriónicas, una combinación de dos o más unidades de repetición cargadas (por ejemplo, unidades de unidades de repetición aniónicas y catiónicas, unidades de repetición aniónicas y zwitteriónicas, unidades de repetición catiónicas y zwitteriónicas, o unidades de repetición aniónicas, catiónicas y zwitteriónicas), unidades de repetición sustancialmente no cargadas, o una combinación de los mismos, siempre que su carácter general sea hidrófilo. Dicho de otra manera, el primer bloque hidrófilo puede contener cualquier amplia gama de unidades de repetición, hidrófilos o incluso hidrófobos, a condición de que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición comprendidas por el primer bloque proporcionan un bloque que tiene un carácter hidrófilo general. Cuando las unidades de repetición contienen grupos ionizables, la contribución de una unidad de repetición individual a la hidrofiliidad global del bloque de la que es constituyente puede variar en función de su pKa en relación con el pH del medio en el que se encuentra. Por ejemplo, unidades de repetición de ácido propil acrílico, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{COOH})$, se ionizan predominantemente a pH 7, pero no a pH 5 y por lo tanto, la contribución hidrófoba de unidades de repetición de ácido propilacrílico a un bloque es significativamente mayor a pH 5 que a pH 7. En general, por lo tanto, cuando el primer bloque comprende unidades de repetición catiónicas ionizables o unidades de repetición aniónicas ionizables, se prefiere que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición que constituyen el primer bloque sea tal que el carácter general del bloque sea hidrófilo a pH fisiológico. Por ejemplo, en una realización, se prefiere que el primer bloque sea hidrófilo en el rango de pH desde pH 5,0 a pH 7,5.

55 **[0087]** En algunas realizaciones, el primer bloque hidrófilo es un bloque sustancialmente no cargado. En realizaciones específicas, el primer bloque hidrófilo es sustancialmente no cargado y protege un segundo bloque cargado y/o un agente terapéutico cargado asociado con un segundo bloque. Por ejemplo, el primer bloque puede ser un bloque de polisacárido. En algunas otras realizaciones, el primer bloque hidrófilo es un polizwitteriónico (es decir, que comprende una pluralidad de especies tanto catiónicas como aniónicas o residuos monoméricos a pH aproximadamente neutro) o bloque polianiónico (es decir, que comprende una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos a pH aproximadamente neutro). En cualquiera de estas realizaciones, el primer bloque hidrófilo puede comprender al menos un residuo monomérico conjugables o funcionable que se puede utilizar, por ejemplo, para enlazar un grupo de reconocimiento, un grupo solubilizante en agua, u otro grupo funcional al bloque de polímero, después de la polimerización.

65 **[0088]** En una realización preferida, el primer bloque hidrófilo es un bloque de polímero hidrófilo adecuado para (capaz de/eficaz para) protección estérica del polinucleótido. En esta realización, el primer bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos que tienen una especie de protección, y las especies de protección son efectivas

para la protección estérica de un polinucleótido asociado con el polímero o una micela que comprende el polímero. Por ejemplo, la especie de protección puede ser eficaz para mejorar la estabilidad del polinucleótido contra la digestión enzimática en el plasma. Adicionalmente o alternativamente, las especies de protección pueden ser eficaces para reducir la toxicidad de un polímero o micela descrito (por ejemplo, mediante la protección de un segundo bloque hidrófilo cargado y la reducción de la carga superficial efectiva de un polímero o micela). Adicionalmente o alternativamente, las especies de protección son eficaces para mantener las propiedades superficiales deseables de una micela que comprende el polímero. Adicionalmente o alternativamente, las especies de protección pueden ser eficaces para aumentar el tiempo de circulación en o disminuir su tasa de depuración por los riñones.

5

10

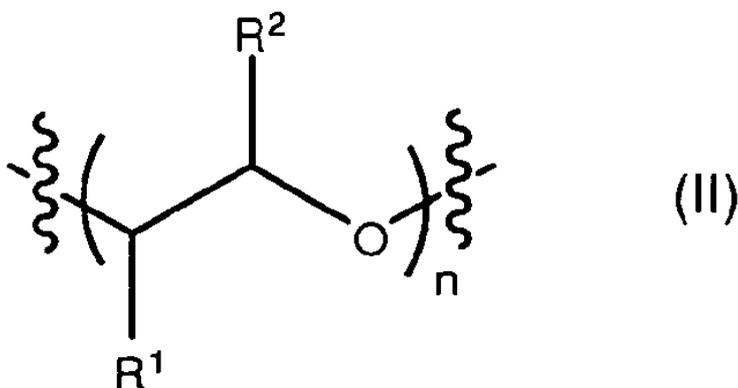
15

[0089] Dependiendo de las propiedades deseadas, la especie de protección de un polímero o micela se puede seleccionar de un conjunto de restos. Por ejemplo, la especie de protección puede ser un alcohol, un fenol, un tiol, un alquilo polioxilado (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o similares), un éter, un tio-éter, o similares. En algunas realizaciones, el primer bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos que tienen un grupo colgante que comprende un oligómero de protección (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o similares). En realizaciones específicas, la especie de protección de un polímero o micela descrito en el presente documento es un alquilo polioxilado con la estructura de Fórmula II:

20

25

30



35

40

en la que cada R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido, y n es un número entero. En una realización preferida, el número de unidades de repetición, n, proporcionará una especie de protección que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 a aproximadamente 2000 daltons. En realizaciones específicas, n será de aproximadamente 2-20; por ejemplo, n puede ser aproximadamente 3-10 y, dependiendo del polímero, aproximadamente 4-5, 8-9, o similares. En algunas realizaciones, la especie de protección corresponde a la Fórmula II y tiene un peso molecular de aproximadamente 40 a aproximadamente 2.000 dalton, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 dalton.

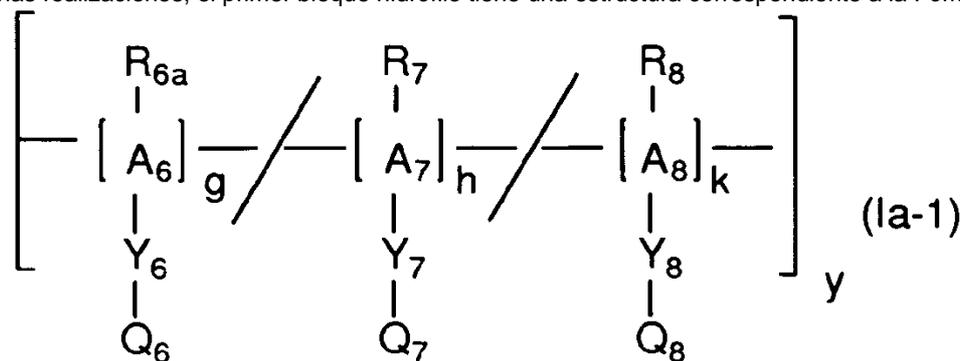
40

[0090] En algunas realizaciones, el primer bloque hidrófilo tiene una estructura correspondiente a la Fórmula Ia-1:

45

50

55



en la que:

cada uno de A₆, A₇, y A₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de -C-C-, -C-, -C(O)(C)_aC(O)O-, -O(C)_aC(O) - y -O(C)_bO-;

60

a es de 1-4;

b es 2-4;

cada uno de Y₆, Y₇, y Y₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, (1C-10C)alquilo, (3C-6C)cicloalquilo, O-(1C-10C)alquilo, -C(O)O(2C-10C)alquilo, -OC(O)(1C-10C)alquilo, -O(2C-10C)alquilo, -S(2C-10C)alquilo, -C(O)NR₆(2C-10C)alquilo, y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido;

65

átomos de carbono tetraivalentes de A₆-A₈ que no están totalmente sustituidos con R_{6a}, R₇, R₈ e Y₆-Y₈ se completan con un número apropiado de átomos de hidrógeno;

cada R_{6a} , R_7 , y R_8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -CN, alquilo, alquino, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

5 Q_6 es un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos que son hidrófilos a pH fisiológico y son sustancialmente no cargados a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares);

10 Q_7 es un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos que son hidrófilos a pH fisiológico, y están al menos parcialmente cargados positivamente a aproximadamente pH neutro (por ejemplo, amino, alquilamino, amonio, alquilamónio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); al menos parcialmente cargados negativamente a pH aproximadamente neutro pero que experimenta protonación a pH inferior (por ejemplo, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); al menos parcialmente zwitteriónicos a pH fisiológico (por ejemplo, un residuo monomérico que comprende un grupo fosfato y un grupo de amonio a pH fisiológico), o hidrógeno;

15 Q_8 se selecciona de un grupo que consiste en un residuo conjugable o funcionable (por ejemplo, residuos que comprenden un grupo reactivo, por ejemplo, azida, alquino, éster de succinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de p-nitrofenil, disulfuro de piridilo, aldehído, cetona, amina, o similares) o un agente de reconocimiento (por ejemplo, residuo de azúcar, folato, péptido, o similares);

g es de 0 a 1;

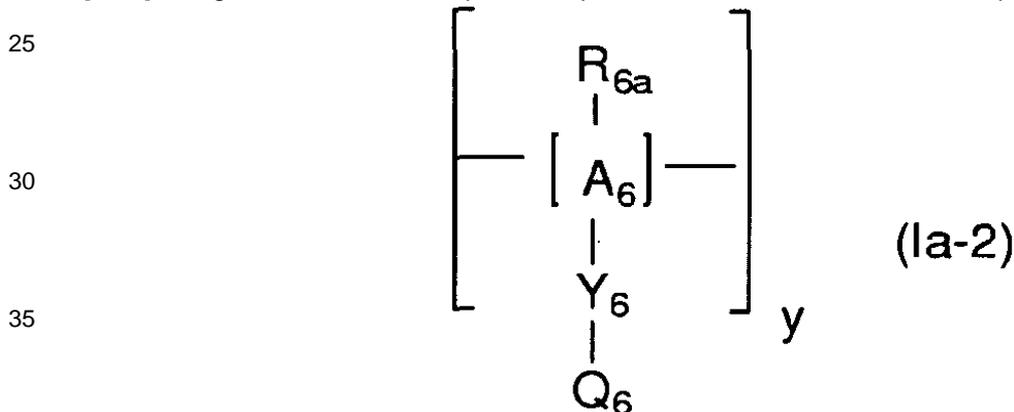
h es de 0 a menos de 1;

k es de 0 a 1;

20 en la que $g + h + k = 1$; y

y es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 kDa, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 kDa.

[0091] En algunas realizaciones, el primer bloque hidrófilo tiene una estructura correspondiente a la Fórmula la-2:



en la que:

A_6 se selecciona del grupo que consiste de $-C-C-$, $-C-$, $-C(O)(C)_aC(O)O-$, $-O(C)_aC(O)-$ y $-O(C)_bO-$;

a es de 1 - 4;

b es 2 - 4;

45 R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, y C_1-C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

Y_6 se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, (1C-10C) alquilo, (3C-6C)cicloalquilo, O-(1C-10C) alquilo, $-C(O)O(2C-10C)$ alquilo, $-OC(O)(1C-10C)$ alquilo, $-O(2C-10C)$ alquilo, $-S(2C-10C)$ alquilo, $-C(O)NR_6(2C-10C)$ alquilo, y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido;

50 átomos de carbono tetravalentes de A_6 que no están totalmente sustituidos con R_{6a} e Y_6 se completa con un número apropiado de átomos de hidrógeno;

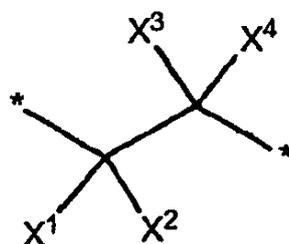
cada R_{6a} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -CN, alquilo, alquino, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor;

55 Q_6 es un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos que son hidrófilos a pH fisiológico y son sustancialmente no cargados a pH fisiológico (por ejemplo, hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similar); y

y es de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 kDa.

60 [0092] En algunas realizaciones, el primer bloque hidrófilo es un copolímero que comprende residuos monoméricos de la fórmula la, y otros residuos monoméricos. En realizaciones preferidas, los otros residuos monoméricos son no cargados. En algunas realizaciones, los otros residuos monoméricos son no hidrófobos. En ciertas realizaciones, los otros residuos monoméricos no afectan significativamente a la hidrofiliidad global del primer bloque hidrófilo.

65 [0093] En una realización preferida, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondiente a la Fórmula 1

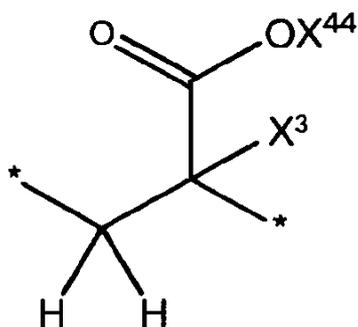


Formula 1

en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1 a otras unidades de repetición; cada X^1 y X^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterociclo, y carbonilo sustituido, a condición, sin embargo, X^1 y X^2 no se seleccionen, en la misma unidad de repetición, del grupo que consiste en arilo, heteroarilo, carbonilo heterosustituido, y combinaciones de los mismos; cada X^3 es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, y cada X^4 es independientemente carbonilo, arilo, o heteroarilo heterosustituido. Por ejemplo, en una de dichas realizaciones, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 y X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno. En otro ejemplo, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno y X^3 es hidrógeno o alquilo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, y cada X^4 es independientemente carbonilo heterosustituido. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^4 es $-C(O)OX^{40}$, $-C(O)SX^{40}$, o $-C(O)NX^{40}X^{41}$, y X^{40} y X^{41} son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^4 es $-C(O)OX^{40}$ o $-C(O)NX^{40}X^{41}$, y X^{40} y X^{41} son, independientemente, hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)OX^{40}$, y X^{40} es hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)OX^{40}$, X^{40} es $-(CH_2CH_2O)_tX^{400}$, t es un entero positivo, y X^{400} es alquilo, alquilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)OX^{40}$, X^{40} es $-(CH_2CH_2O)_tX^{400}$, t es un entero positivo, y X^{400} comprende un resto de reconocimiento. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 constituyen una mayoría del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 constituyen al menos el 75% del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 constituyen al menos el 90% del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo.

[0094] En una realización alternativa, el bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición de composición diferente, al menos uno de los cuales corresponde a la Fórmula 1. En otra realización alternativa, el bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición de composición distinta, cada una de las cuales corresponde a la Fórmula 1. Por ejemplo, el bloque hidrófilo puede ser un copolímero aleatorio que comprende (i) una primera unidad de repetición correspondiente a la Fórmula 1 en la que X^4 es $-C(O)OH$ y (ii) una segunda unidad de repetición de composición distinta correspondiente a la Fórmula 1. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo es un copolímero al azar que comprende al menos dos unidades de repetición de composición distinta, cada una de las cuales corresponde a la Fórmula 1, y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 constituyen una mayoría del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición de composición distinta, cada una de las cuales corresponde a la Fórmula 1, y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 constituyen al menos el 90% del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo.

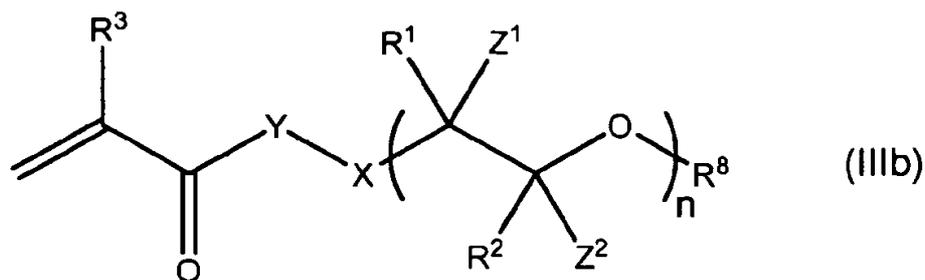
[0095] En otra realización preferida, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1ETS



Formula 1ETS

20 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1 ETS a otras unidades de repetición, X^3 es
 25 alquilo, y X^{44} es un resto de reconocimiento o de protección. Por ejemplo, X^{44} puede ser un poliol, una vitamina, un
 péptido, u otro resto que tiene una afinidad de unión para una diana celular o biológica. Por ejemplo, en una de dichas
 realizaciones, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 ETS y X^{44} es un
 poliol. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1
 ETS y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 ETS pueden constituir al menos un 2% del número
 total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo comprende unidades
 de repetición correspondientes a la Fórmula 1 ETS y las unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 ETS
 pueden constituir al menos el 5% del número total de unidades de repetición en el bloque hidrófilo. En un ejemplo
 adicional, el bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición, una
 correspondiente a la Fórmula 1 ETS y la otra es una unidad de repetición de composición distinta correspondiente a la
 Fórmula 1. En un ejemplo adicional, el bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos
 unidades de repetición, una correspondiente a la Fórmula 1 ETS y la otra correspondiente a la Fórmula 1 en la que X^4
 es -COOH.

35 **[0096]** En ciertas realizaciones, el bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos
 mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de Fórmula IIIb:

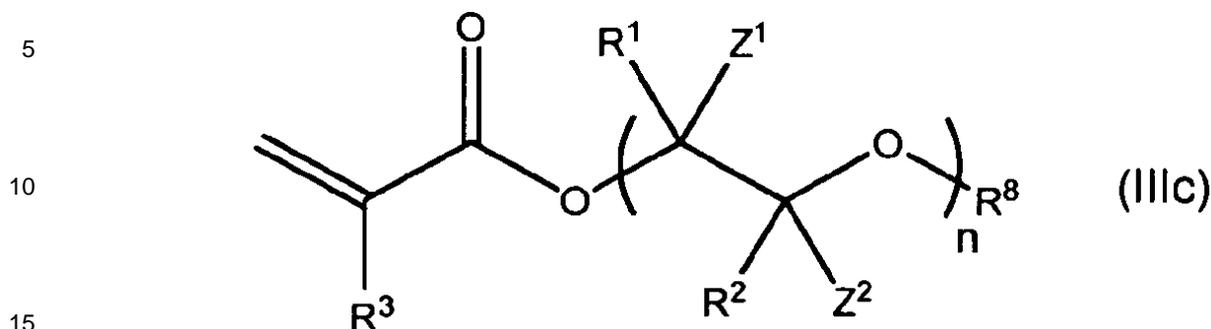


(IIIb)

50 en la que:
 n es un número entero que varía de 2 a 20;
 55 X es $-(CR^1R^2)_m-$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$,
 Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,
 cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y
 C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido,
 60 R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1 - C_6 alquilo opcionalmente sustituido,
 R^8 es hidrógeno o $(CR^1R^2)_mR^9$, en donde m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente
 sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y
 R^9 es hidrógeno, halógeno, C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido, poliol, vitamina, péptido, molécula pequeña que tiene
 un peso molecular de 200 a 1200 Daltons, o un grupo conjugable.

65

[0097] En ciertas realizaciones, el bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IIIC:



en la que:

n es un número entero que va de 2 a 20;

20 X es $(CR^1R^2)_m$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

25 R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1 - C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

R^8 es hidrógeno o $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

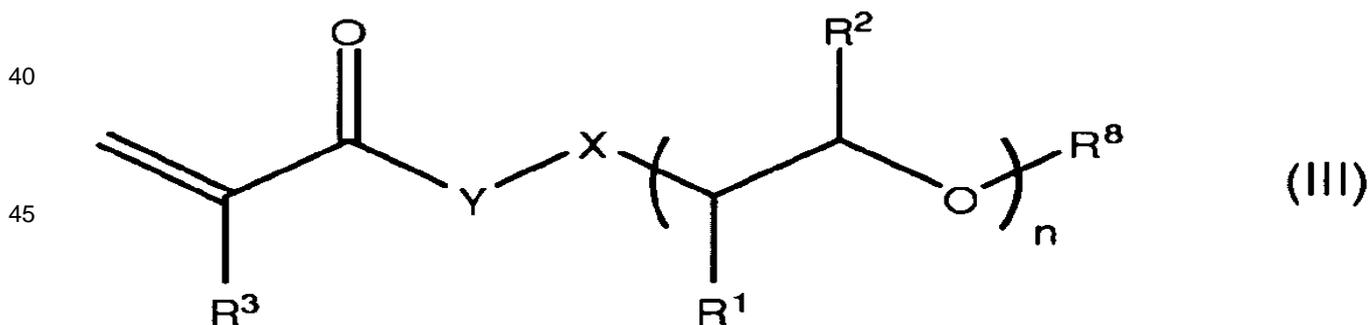
R^9 es hidrógeno, halógeno, C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido, polioli, vitamina, péptido, molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons, o un grupo conjugable.

30

[0098] Por ejemplo, en una realización, el primer bloque hidrófilo una pluralidad de residuos monoméricos correspondientes a la Fórmula IIIC, R^1 , R^2 , Z^1 y Z^2 son hidrógeno, R^3 es hidrógeno o C_1 - C_3 alquilo, n es 2-20 y R^9 es un polioli, vitamina, péptido, o molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons.

35

[0099] En ciertas realizaciones, el primer bloque hidrófilo o bloque hidrófilo de protección comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula III:



en la que:

X es $(CR^1R^2)_m$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

55 Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , y R^9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido, o un grupo de reconocimiento, tal como, pero sin limitación, galactosa, N-acetil galactosamina, folato, péptido RGD,

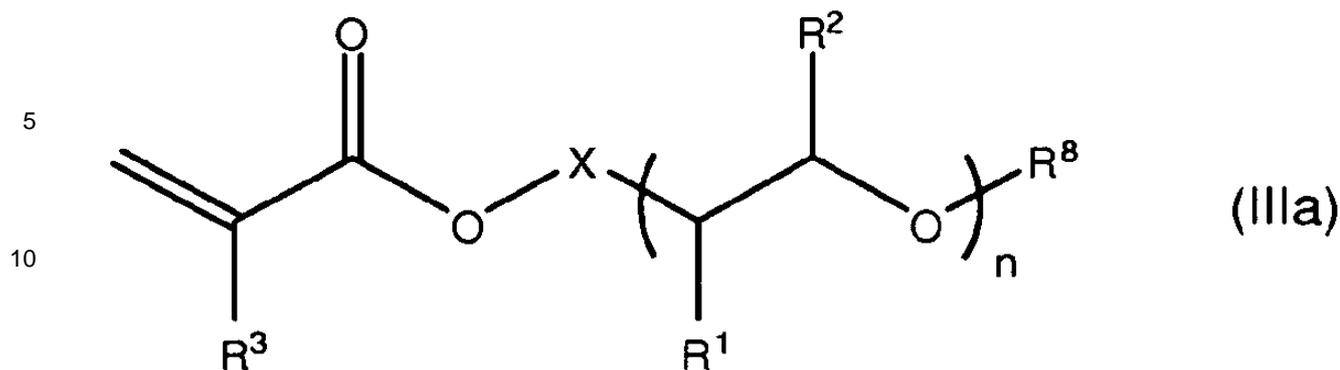
R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1 - C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

60 n es un número que varía de 2 a 20,

R^8 es $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$.

[0100] En realizaciones específicas, el primer bloque hidrófilo o bloque hidrófilo de protección comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IIIa:

65



en la que:

X es $(CR^1R^2)_m$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

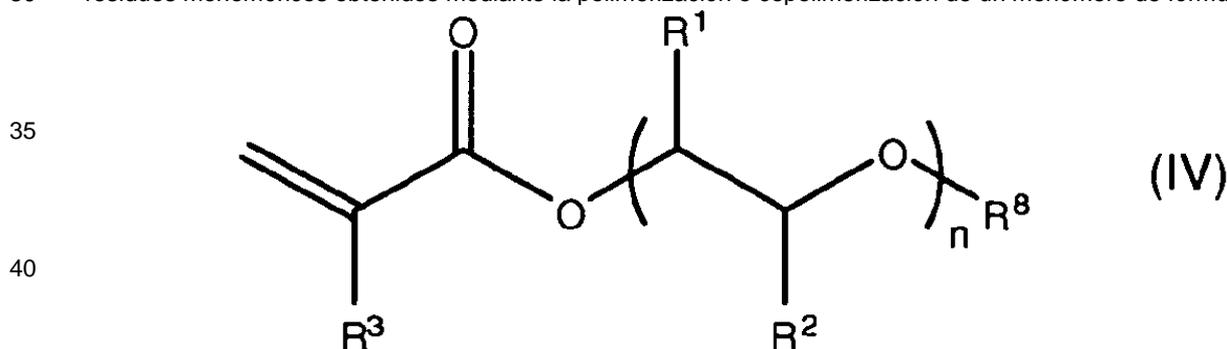
cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , y R^9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

n es un número que varía de 2 a 20,

R^8 es $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$

[0101] En una realización, el primer bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos correspondientes a la fórmula IIIa y R^3 es metilo (es decir, el monómero de fórmula III es un PEGMA).

[0102] En ciertas realizaciones, el primer bloque hidrófilo o bloque hidrófilo de protección comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IV:



en la que:

cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1 - C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

n es un número que varía de 2 a 20,

R^8 es $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$

[0103] En una realización, el primer bloque hidrófilo comprende una pluralidad de residuos monoméricos correspondientes a la Fórmula IV, R^3 es metilo y n es 2-20.

[0104] En general, el primer bloque hidrófilo comprende una pluralidad de unidades de repetición, es decir, al menos dos. En algunas realizaciones, un primer bloque hidrófilo de un polímero descrito en este documento tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton, de aproximadamente 2.000 Dalton a aproximadamente 30.000 Dalton, de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 20.000 Dalton, o de aproximadamente 7.000 Dalton a aproximadamente 15.000 Dalton. En realizaciones específicas, el bloque hidrófilo es de aproximadamente 7.000 Dalton, 8000 Dalton, 9000 Dalton, 10.000 Dalton, 11.000 Dalton, 12.000 Dalton, 13.000 Dalton, 14.000 Dalton, o 15.000 Dalton.

BLOQUE PORTADOR

65

- [0105]** El copolímero de bloques descrito en el presente documento comprende un segundo (es decir, bloque intermedio, o un bloque entre el primer bloque hidrófilo y el bloque hidrófobo), que está (i) asociado con un polinucleótido. Por ejemplo, el bloque portador puede poseer policationes para asociarse iónicamente con un polinucleótido. Alternativamente o adicionalmente, el bloque portador, puede contener un enlace disulfuro u otro resto para el acoplamiento divalente del polinucleótido al copolímero de bloques. En una realización, el portador (segundo) bloque es hidrófilo. En otra realización, el (segundo) bloque portador es hidrófobo. En una realización, el segundo bloque es policationico. En algunas realizaciones, el segundo bloque es hidrófilo y comprende una pluralidad de residuos monoméricos catiónicos (por ejemplo, a pH aproximadamente neutro). En otra realización, el (segundo) bloque portador es hidrófobo y comprende una pluralidad de residuos monoméricos catiónicos (por ejemplo, a pH aproximadamente neutro). En realizaciones específicas, el segundo bloque está iónicamente asociado con un polinucleótido. En ciertas realizaciones, el segundo bloque no está cargado o, está al menos sustancialmente no cargado, y está unido a un polinucleótido. En algunas realizaciones, el segundo bloque es hidrófilo, policationico y está unido tanto a través de enlace covalente como de interacciones iónicas a un polinucleótido.
- [0106]** En general, el bloque portador puede contener unidades de repetición aniónicas, unidades de repetición catiónicas, unidades de repetición zwitteriónicas, una combinación de dos o más unidades de repetición cargadas (por ejemplo, unidades de repetición aniónicas y catiónicas, unidades de repetición aniónicas y zwitteriónicas, unidades de repetición catiónicas y zwitteriónicas, o unidades de repetición aniónicas, catiónicas y zwitteriónicas), unidades de repetición sustancialmente no cargadas, o una combinación de los mismos. Dicho de otra manera, el bloque portador puede contener cualquiera de una amplia gama de unidades de repetición, hidrófilas o incluso hidrófobas. En una realización, la suma de las contribuciones de las unidades de repetición comprendidas por el bloque portador proporciona un bloque que tiene un carácter hidrófilo general. En una realización alternativa, la suma de las contribuciones de las unidades de repetición comprendidas por el bloque portador proporciona un bloque que tiene un carácter hidrófobo general. Cuando las unidades de repetición contienen grupos ionizables, la contribución de una unidad de repetición individual a la hidrofiliidad global del bloque de la que es un constituyente puede variar en función de su pKa en relación con el pH del medio en el que se encuentra. Por ejemplo, las unidades de repetición de ácido propilacrilico, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{COOH})-$, se ionizan predominantemente a pH 7, pero no a pH 5 y por lo tanto, la contribución hidrófoba de unidades de repetición de ácido propilacrilico a un bloque es significativamente mayor a pH 5 que a pH 7. En general, por lo tanto, cuando el bloque portador comprende unidades de repetición catiónicas ionizables o unidades de repetición aniónicas ionizables y se desea que el bloque portador sea hidrófilo, se prefiere que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición que constituyen el bloque portador sea tal que el carácter general del bloque es hidrófilo a pH fisiológico. Por ejemplo, en una realización, se prefiere que el bloque portador sea hidrófilo en el intervalo de pH de pH 5,0 a pH 7,5. Alternativamente, cuando el bloque portador comprende unidades de repetición catiónicas ionizables o unidades de repetición aniónicas ionizables y se desea que el bloque portador sea hidrófobo, se prefiere que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición que constituyen el bloque portador sea tal que el carácter general del bloque es hidrófobo a pH fisiológico. Por ejemplo, en una realización, el bloque portador puede ser hidrófobo en el intervalo de pH de pH 5,0 a pH 7,5.
- [0107]** En algunas realizaciones, el bloque portador comprende unidades de repetición derivadas de monómeros catiónicos que tienen un pKa que varía en cualquier punto entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 10,0, habitualmente entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 9,5, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5. Tras la incorporación del monómero en el bloque de polímero, el pKa del residuo tiende a disminuir en relación con el monómero no polimerizado; en general, por lo tanto, el pKa de las unidades de repetición incorporadas estará entre aproximadamente 6,0 y 10,0, habitualmente entre aproximadamente 6,2 y 9,0, y en algunas realizaciones, entre aproximadamente 6,5 y 8,0.
- [0108]** En ciertas realizaciones, el segundo bloque es hidrófilo y comprende una especie monomérica que comprende una amina acíclica (por ejemplo, una amina, una alquil amina, una dialquil amina, o similares), una imina acíclica (por ejemplo, una imina, una alquil imina, o similares), una amina cíclica (por ejemplo, piperidina), un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, piridina o quinolina), o similares. En realizaciones específicas, una especie catiónica utilizada en este documento incluye una amina acíclica protonada (por ejemplo, una amina, una alquil amina, una dialquil amina, o similares), una imina acíclica (por ejemplo, una imina, una alquil imina, o similares), una amina cíclica (por ejemplo, piperidina), un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, piridina o quinolina), o similares.
- [0109]** Los ejemplos no limitantes de aminas acíclicas incluyen metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, propilamina, isopropilamina, diisopropilamina, diisopropiletilamina, n-butilamina, sec-butilamina, terc-butilamina, pentilamina, neo-pentilamina, iso-pentilamina, hexanamina o similares. Los ejemplos no limitantes de iminas acíclicas incluyen metilimina, etilimina, propilimina, isopropilimina, n-butilimina, sec-butilimina, pentilimina, neo-pentilimina, iso-pentilimina, hexilimina o similares. Los ejemplos no limitantes de aminas cíclicas incluyen ciclopropilamina, ciclobutilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, cicloheptilamina, piperidina, pirazina, pirrolidina, homopiperidina, azabicycloheptano, diazabicycloundecano, o similares. Los ejemplos no limitantes de iminas cíclicas incluyen ciclopropilimina, ciclobutilimina, ciclopentilimina, ciclohexilimina, cicloheptilimina, o similares. Los ejemplos no limitantes de heteroarilos que contienen nitrógeno incluyen imidazolilo, pirrolilo, piridilo, indolilo, o similares.
- [0110]** En algunas realizaciones, el segundo bloque de un polímero descrito en este documento es hidrófilo y comprende una pluralidad de residuos monoméricos de amino(C₁-C₆)alquilo-etacrilato, amino (C₁-C₆)alquilo-metacrilato,

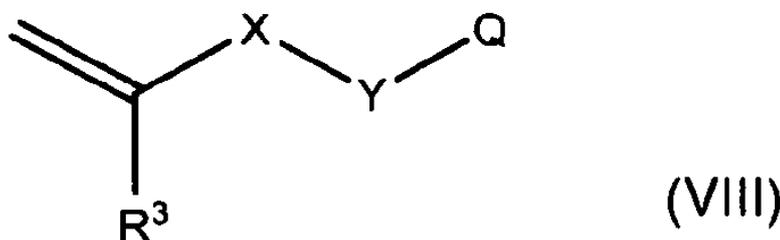
amino (C₁-C₆)alquil acrilato, N-(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquilo-etacrilato, N-(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquil-
 metacrilato, N-(C₁-C₆)alquil-amino (C₁-C₆) alquilo-acrilato, (N, N-di(C₁-C₆) amino alquil-(C₁-C₆) alquil-etacrilato, N,N-
 di(C₁-C₆)alquil-amino (C₁-C₆) alquil-metacrilato, N, N-di(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquil-acrilato, o una combinación de
 los mismos opcionalmente sustituidos. En realizaciones específicas, dichos residuos monoméricos constituyen un
 residuo monomérico catiónico a pH neutro tal como se describe aquí.

[0111] En una realización, el bloque portador comprende una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos. Los
 residuos monoméricos aniónicos pueden tener una especie cargada o cargable a un anión, incluyendo una especie
 aniónica protonable. Preferiblemente, la especie cargable puede ser aniónica a pH fisiológico del suero y
 sustancialmente neutro o no cargado en el pH de la membrana que se desestabiliza o altera, por ejemplo,
 preferiblemente a un pH endosomal. En algunas realizaciones, el bloque portador comprende una pluralidad de residuos
 monoméricos hidrófobos aniónicos, residuos monoméricos que comprenden ambas especies hidrófobas (por ejemplo,
 un sustituyente alquilo C₂-C₈) y especies cargadas o cargables a un anión.

[0112] El segundo bloque es un bioconjugado de polímero que comprende el polinucleótido covalentemente acoplado al
 segundo bloque. En algunas realizaciones, los conjugados covalentes se fabrican entre el polinucleótido y las cadenas
 laterales colgantes de monómeros en el polímero. En algunas realizaciones, el segundo bloque comprende el
 polinucleótido covalentemente acoplado al segundo bloque a través de un resto de unión. En ciertas realizaciones, el
 segundo bloque está acoplado covalentemente al extremo 3' del polinucleótido. En algunas realizaciones, el segundo
 bloque está acoplado covalentemente al extremo 5' del polinucleótido. En ciertas realizaciones, el resto de unión es un
 enlace covalente. En algunas realizaciones, el resto de unión se deriva de un resto multifuncional que comprende dos o
 más grupos funcionales reactivos. En ciertas realizaciones, el resto de unión es un resto lábil sensible al pH. En algunas
 realizaciones, el resto de unión es estable a pH del suero y lábil en medio ácido a pH endosomal. En algunas
 realizaciones, el resto de unión es estable a pH 7,4 y lábil en medio ácido a pH 6,0. En ciertas realizaciones, el resto de
 unión es un disulfuro.

[0113] En ciertas realizaciones, el segundo bloque comprende uno o más residuos monoméricos que comprenden una
 cadena lateral conjugable o conjugada (por ejemplo, un grupo colgante de un residuo monomérico). Una cadena lateral
 conjugada, tal como se usa en el presente documento, se entiende que incluye residuos monoméricos que cuando se
 polimeriza inicialmente poseen una cadena lateral conjugable, que más tarde se conjuga, por ejemplo, a un
 polinucleótido. En algunos casos, una cadena lateral conjugable es un grupo que lleva uno o más grupos reactivos que
 se puede utilizar para la introducción post-polimerización de funcionalidades adicionales a través de química conocida
 en el sector, por ejemplo, química "clic" (por ejemplo de reacciones "clic", ver Wu, P.; Fokin, V.V. Catalytic Azide-Alkyne
 Cycloaddition: Reactivity and Applications. Aldrichim Acta, 2007, 40, 7-17). En ciertas realizaciones, las cadenas
 laterales conjugables o funcionalizables proporcionadas en este documento comprenden uno o más de cualquier grupo
 funcional electrófilo o nucleófilo adecuado, tal como, pero sin limitación, éster de N-hidrosuccinimida (NHS), HOBt éster
 de (1-hidroxibenzotriazol), éster de p-nitrofenilo, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, grupo disulfuro de
 piridilo, maleimida, aldehído, cetona, anhídrido, tiol, amina, hidroxilo, haluro de alquilo, o similar. En realizaciones más
 específicas, el segundo bloque comprende uno o más de dichas cadenas laterales funcionalizables que se bioconjugan
 con un polinucleótido.

[0114] En ciertas realizaciones, el segundo bloque comprende residuos monoméricos derivados de la polimerización de
 monómeros conjugables que tienen la Fórmula VIII:



en la que:

X se selecciona de un grupo que consiste en un enlace covalente, C(O), un C₅-C₁₀ arilo divalente, y un heteroarilo C₂-
 C₁₀ divalente,

Y es un enlace covalente o un grupo de unión seleccionado entre C₁-C₂₀ alquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-
 C₂₀ heteroalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ alqueno divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀
 alquino divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ cicloalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀
 cicloheteroalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₅-C₁₀ arilo divalente opcionalmente sustituido, o C₃-C₁₀
 heteroarilo divalente opcionalmente sustituido,

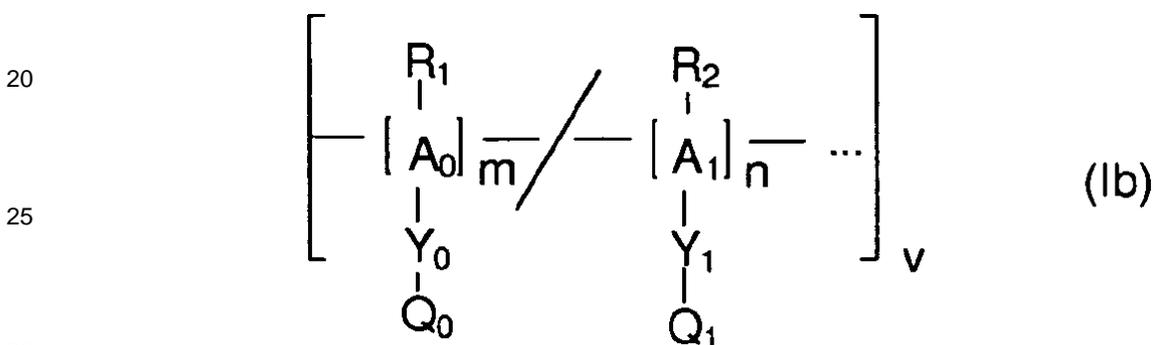
R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y el C₁-C₄ alquilo opcionalmente sustituido,

Q es el grupo conjugable tal como, pero sin limitación, éster de N-hidrosuccinimida (NHS), HOBt éster de (1-hidroxibenzotriazol), éster de p-nitrofenilo, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, grupo disulfuro de piridilo, maleimida, aldehído, cetona, anhídrido, tiol, amina, hidroxilo, haluro de alquilo, o similares.

5 [0115] En ciertas realizaciones, el segundo bloque hidrófilo comprende además una pluralidad de residuos monoméricos descritos en el bloque hidrófilo de la Fórmula 1a. En realizaciones específicas, el segundo bloque hidrófilo es un copolímero aleatorio que comprende al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40% en peso de residuos monoméricos (por ejemplo, PEGMA) que tiene un grupo colgante que comprende un oligómero de protección (por ejemplo, un polietilenglicol).

10 [0116] En realizaciones alternativas, en el que un agente terapéutico (por ejemplo, polinucleótido o péptido) se conjuga con el "segundo bloque hidrófilo", el segundo bloque puede estar opcionalmente sustituido con un bloque no hidrófilo (por ejemplo, un bloque hidrófobo), que está conjugado con el agente terapéutico.

15 [0117] En ciertas realizaciones, el bloque intermedia tiene la fórmula:



en la que:

A₀ y A₁ se seleccionan del grupo que consiste en -C-C-, -C-, -C(O)(C)_aC(O)O-, -O(C)_aC(O)- y -O(C)_bO-;

a es 1 - 4;

35 b es 2 - 4;

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

átomos de carbono tetravalentes de A₀-A₁ que no están totalmente sustituidos con R₁-R₂ e Y₀-Y₁ se completan con un número apropiado de átomos de hidrógeno;

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

45 Q₀ es un residuo seleccionado del grupo que consiste en residuos que son hidrófilos a pH fisiológico y están al menos parcialmente cargados positivamente a pH fisiológico (por ejemplo, amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); residuos conjugables o funcionalizables (por ejemplo, residuos que comprenden un grupo reactivo, por ejemplo, azida, alquino, éster de succinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de p-nitrofenilo, disulfuro de piridilo, o similares); o hidrógeno;

50 Q₁ es un residuo que es hidrófilo a pH fisiológico, y está al menos parcialmente cargado positivamente a pH fisiológico (por ejemplo, amino, alquilamino, amonio, alquilamonio, guanidina, imidazolilo, piridilo, o similares); al menos parcialmente cargado negativamente a pH fisiológico, pero experimenta protonación a pH inferior (por ejemplo, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, fosfato, o similares); sustancialmente neutro a pH fisiológico (por ejemplo, hidroxilo, alquilo polioxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, tiol, o similares); o al menos parcialmente zwitteriónico a pH fisiológico (por ejemplo, un residuo monomérico que comprende un grupo fosfato y un grupo amonio a pH fisiológico);

m es de 0 a menos de 1,0 (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 0,49);

55 n es mayor que 0 a 1,0 (por ejemplo, de aproximadamente 0,51 a aproximadamente 1,0); en el que

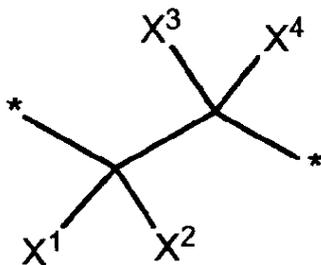
m + n = 1

v es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 kDa.

60 [0118] En ciertas realizaciones, el residuo conjugable o funcionalizable de Q₀ se conjuga con al menos un aminoácido o al menos un ácido nucleico.

[0119] En una realización preferida, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1

65



Formula 1

5

10

15

20

25

30

35

40

en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1 a otras unidades de repetición; cada X^1 y X^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterociclo, y carbonilo sustituido, a condición, sin embargo, X^1 y X^2 no se seleccionen, en la misma unidad de repetición, del grupo que consiste en arilo, heteroarilo, carbonilo heterosustituido, y combinaciones de los mismos; cada X^3 es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, y cada X^4 es independientemente carbonilo, arilo, o hidrocarbilo sustituido. Por ejemplo, en una de dichas realizaciones, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1 y X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno. En otro ejemplo, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno y X^3 es hidrógeno o alquilo. En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^4 es $-C(O)OX^{40}$, $-C(O)SX^{40}$, o $-C(O)NX^{40}X^{41}$, y X^{40} y X^{41} son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^4 es $-C(O)OX^{45}$, $-C(O)SX^{45}$, o $-C(O)NX^{41}X^{45}$, y X^{41} y X^{45} son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^4 es $-C(O)OX^{45}$ o $-C(O)NX^{41}X^{45}$, y X^{41} y X^{45} son independientemente hidrocarbilo, heterohidrocarbilo, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)OX^{45}$, y X^{45} es hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo. En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)OX^{45}$, X^{45} es un resto alquilo sustituido con disulfuro (por ejemplo, etilo sustituido con disulfuro de piridilo). En un ejemplo adicional, el bloque portador comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1, X^1 y X^2 son cada uno hidrógeno, X^3 es hidrógeno o alquilo, X^4 es $-C(O)NX^{41}X^{45}$, X^{41} es hidrógeno, y X^{45} es alquilo o alquilo sustituido.

45

50

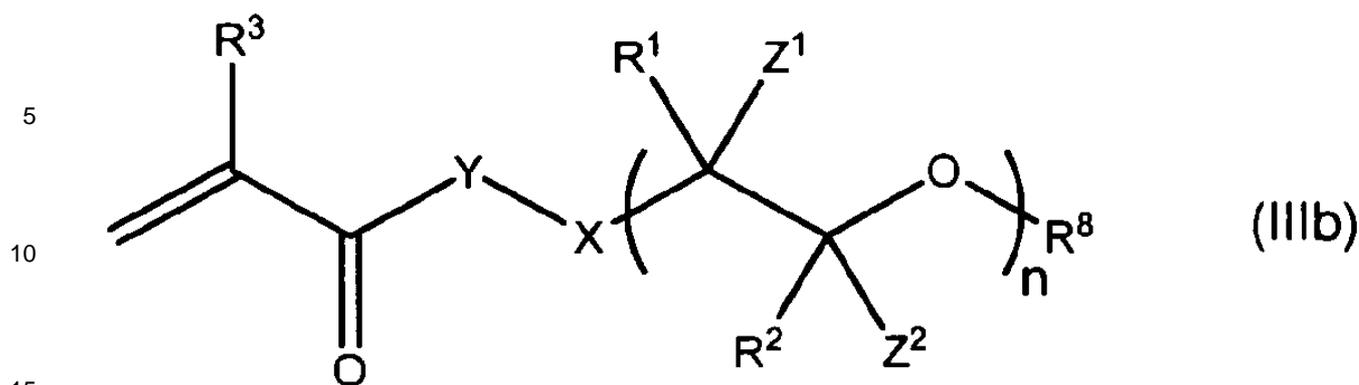
[0120] En una realización alternativa, el bloque portador es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición de composición distinta, cada una de las cuales corresponde a la Fórmula 1. Por ejemplo, el bloque portador puede ser un copolímero aleatorio que comprende (i) una primera unidad de repetición correspondiente a la Fórmula 1 en la que X^4 es $-C(O)OX^{45}$ y (ii) una segunda unidad de repetición correspondiente a la Fórmula 1 en la que X^4 es $-C(O)NX^{41}X^{45}$. Ventajosamente, cuando el bloque portador es un copolímero aleatorio que comprende al menos dos unidades de repetición de composición distinta, una de las unidades de repetición puede proporcionar un grupo funcional para unir un agente terapéutico tal como un ácido nucleico. De este modo, por ejemplo, el bloque portador puede comprender (i) una primera unidad de repetición correspondiente a la Fórmula 1 en la que X^4 es $-C(O)OX^{45}$, $-C(O)SX^{45}$, o $-C(O)NX^{41}X^{45}$ y un agente terapéutico tal como un ácido nucleico, está unido al bloque portador a través de X^{45} o X^{45} comprende un grupo funcional para unirse el agente terapéutico, y (ii) una unidad de repetición de composición distinta correspondiente a la Fórmula 1.

55

[0121] En ciertas realizaciones, el bloque portador comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IIIB:

60

65



en la que:

n es un número entero que varía de 2 a 20;

20 X es $-(CR^1R^2)_m-$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$,

Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

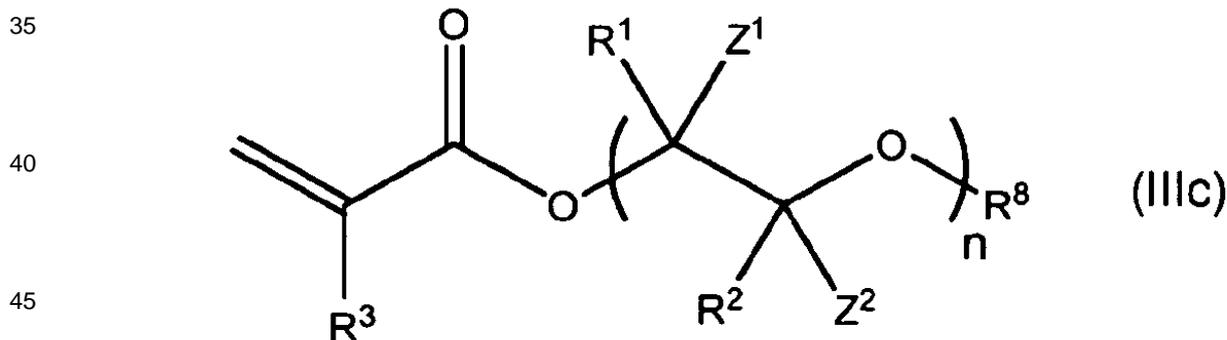
25 R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1-C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

R^8 es hidrógeno o $(CR^1R^2)_mR^9$, en donde m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

R^9 es hidrógeno, halógeno, C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido, poliol, vitamina, péptido, molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons, o un grupo conjugable.

30

[0122] En ciertas realizaciones, el bloque portador comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IIIC:



50

en la que:

n es un número entero que varía de 2 a 20;

X es $-(CR^1R^2)_m-$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$,

55 Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

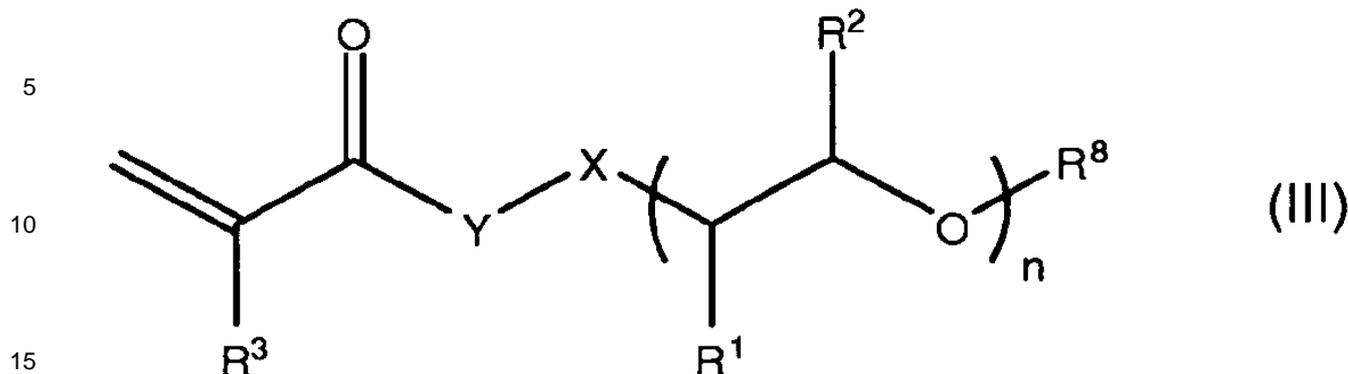
R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1-C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

60 R^8 es hidrógeno o $(CR^1R^2)_mR^9$, en donde m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

R^9 es hidrógeno, halógeno, C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido, poliol, vitamina, péptido, molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons, o un grupo conjugable.

65

[0123] En ciertas realizaciones, el bloque portador comprende una pluralidad de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula III:



en la que:

X es $(CR^1R^2)_m$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con -
 NR¹R², -OR¹ o -SR¹, y

Y es -O-, -NR⁴- o $-(CR^1R^2)-$,

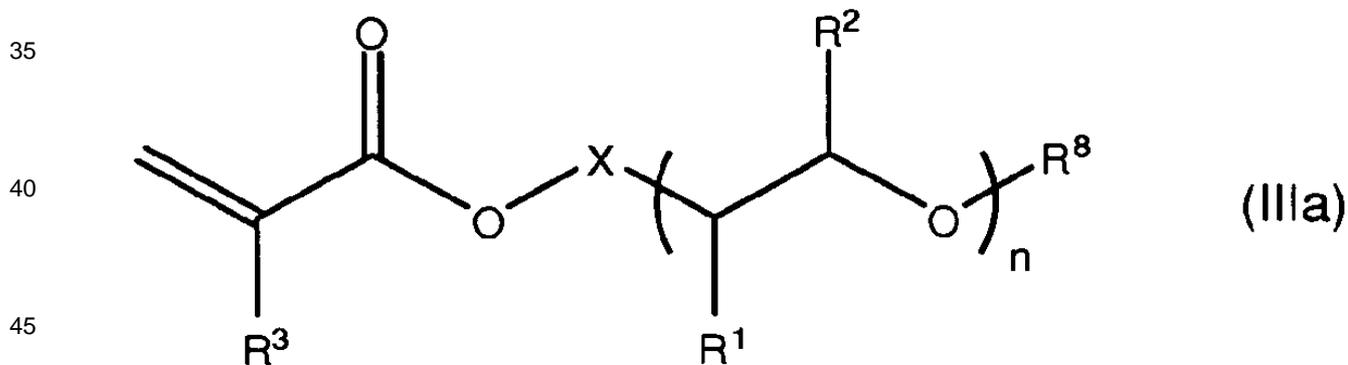
cada uno de R¹, R², R³, y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C₁-
 C₃alquilo opcionalmente sustituido, o un grupo de reconocimiento, tal como, pero sin limitación, galactosa, N-acetil
 galactosamina, folato, péptido RGD,

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C₁-C₆alquilo opcionalmente sustituido,

n es un número que varía de 2 a 20,

R⁸ es $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con -
 NR¹R², -OR¹ o -SR¹.

[0124] En realizaciones específicas, el primer bloque hidrófilo o bloque hidrófilo de protección comprende una pluralidad
 de residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IIIa:



en la que:

X es $(CR^1R^2)_m$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con -
 NR¹R², -OR¹ o -SR¹, y

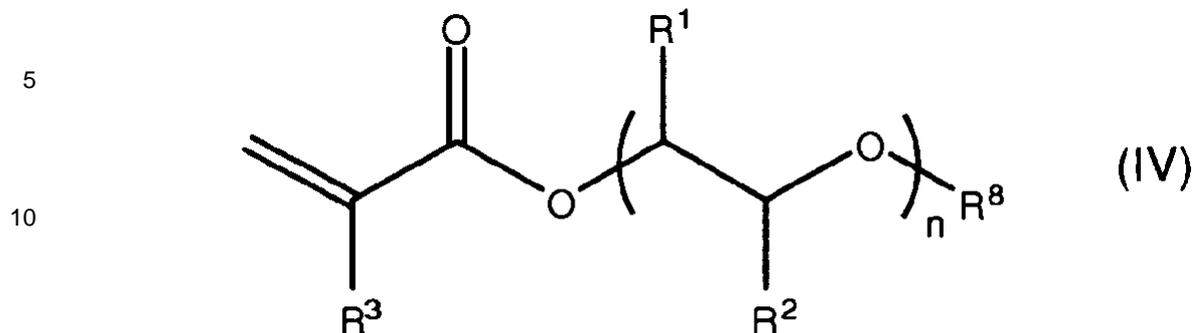
cada uno de R¹, R², R³, y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C₁-
 C₃alquilo opcionalmente sustituido,

n es un número que varía de 2 a 20,

R⁸ es $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con -
 NR¹R², -OR¹ o -SR¹.

[0125] En realizaciones específicas, R³ es metilo (es decir, el monómero de fórmula III es un PEGMA).

[0126] En ciertas realizaciones, el primer bloque hidrófilo o bloque hidrófilo de protección comprende una pluralidad de
 residuos monoméricos obtenidos mediante la polimerización o copolimerización de un monómero de fórmula IV:



20 en la que:
 cada uno de R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C₁-C₃alquilo opcionalmente sustituido,
 n es un número que varía de 2 a 20,
 R⁸ es (CR¹R²)_mR⁹, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR¹R²) están opcionalmente sustituidas con -NR¹R², -OR¹ o -SR¹

25 [0127] En general, el bloque portador comprende una pluralidad de unidades de repetición, es decir, al menos dos. En algunas realizaciones, un bloque portador o segundo bloque descrito en este documento tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton, de aproximadamente 2.000 Dalton a aproximadamente 30.000 Dalton, de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 20.000 Dalton, o de aproximadamente 7.000 Dalton a aproximadamente 15.000 Dalton. En realizaciones específicas, el bloque hidrófilo es de aproximadamente 7.000 Dalton, 8000 Dalton, 9000 Dalton, 10.000 Dalton, 1 1.000 Dalton, 12.000 Dalton, 13.000 Dalton, 14.000 Dalton, o 15.000 Dalton.

30 BLOQUE HIDRÓFOTO

35 [0128] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo de un polímero descrito en este documento es un bloque hidrófobo desestabilizador de membrana dependiente del pH. En algunas realizaciones, un bloque hidrófobo de un polímero descrito en este documento es o comprende un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos. En realizaciones específicas, la pluralidad de residuos monoméricos aniónicos es aniónico a pH aproximadamente neutro. En realizaciones más específicas, al menos el 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% de la pluralidad de residuos monoméricos aniónicos están no cargados a aproximadamente pH 5, a aproximadamente pH 5,5, a aproximadamente pH 5,7, a aproximadamente pH 6,0, a aproximadamente pH 6,2, a aproximadamente pH 6,5, o a aproximadamente pH endosomal (por ejemplo, tal como se calcula a partir del valor pKa del residuo monomérico dado).

45 [0129] En ciertas realizaciones, las especies hidrófobas o unidad monomérica hidrófoba tiene un valor π del bloque hidrófobo varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20. Se utiliza un valor π de un compuesto, que es una medida de su valor hidrófilo-lipófilo relativo (véase, por ejemplo, Cates, LA, "Calculation of Drug Solubilities by Pharmacy Students" Am J. Pharm Educ 45: 11 -13 (1981)), para describir la hidrofobicidad o hidrofiliidad del compuesto.

50 [0130] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende una pluralidad de especies hidrófobas (utilizado en este documento de forma intercambiable con "potenciadores de hidrofobicidad"). Las especies hidrófobas pueden incluir, a modo de ejemplo no limitante, alquilo (que, como se usa aquí, incluye grupos alquilo saturados e insaturados), aril-alquilo, alquil-arilo, alquil-aril-alquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, o similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En realizaciones específicas, la especie hidrófoba es un alquilo aril-alquilo, alquil-arilo, alquil-aril-alquilo, o arilo.

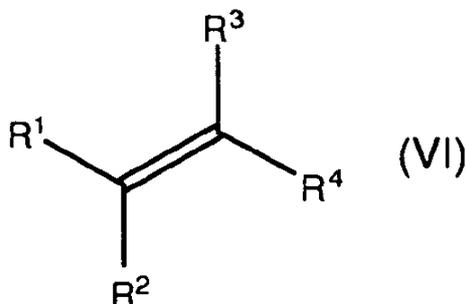
55 [0131] En algunas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos (es decir, sustancialmente libres de una carga global, o completamente libres de una carga global) no cargados. En realizaciones específicas, los residuos monoméricos hidrófobos comprenden al menos una especie hidrófoba. Las especies hidrófobas pueden incluir, a modo de ejemplo no limitante, alquilo (que, como se usa aquí, incluye grupos alquilo saturados e insaturados), aril-alquilo, alquil-arilo, alquil-aril-alquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, o similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En realizaciones específicas, la especie hidrófoba es un alquilo aril-alquilo, alquil-arilo, alquil-aril-alquilo, o arilo. En algunas realizaciones, las cadenas de polímero pueden comprender de forma independiente una pluralidad de residuos monoméricos que tienen una especie hidrófoba seleccionado de (C₂-C₈) alquilo, (C₂-C₈) alquenoilo, (C₂-C₈) alquinoilo, arilo, y heteroarilo (cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido). En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos monoméricos se puede derivar

de la polimerización de etacrilato de (C₂-C₈) alquilo, un metacrilato de (C₂-C₈) alquilo, o un acrilato de (C₂-C₈) alquilo (cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido).

[0132] El bloque hidrófobo comprende una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos. En general, se prefiere que el bloque hidrófobo comprenda decenas o incluso cientos de residuos monoméricos aniónicos. Por ejemplo, en una realización, el bloque hidrófobo comprende al menos 10 de dichos residuos. En otra realización, comprende al menos 20 de dichos residuos. En otra realización, comprende al menos 50 de dichos residuos. En otra realización, comprende al menos 100 de dichos residuos. En dichas realizaciones, el bloque hidrófobo comprenderá habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 residuos aniónicos. Los residuos monoméricos aniónicos pueden tener una especie cargada o cargable a un anión, incluyendo una especie aniónica protonable. Preferiblemente, la especie cargable puede ser aniónica en pH fisiológico de suero y sustancialmente menos cargada en el pH de la membrana que se desestabiliza o altera, por ejemplo, preferiblemente a un pH endosomal. En algunas realizaciones preferidas, el bloque hidrófobo comprende una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos hidrófobos, residuos monoméricos que comprenden ambas especies hidrófobos (por ejemplo, un sustituyente C₂-C₈ alquilo) y especies cargadas o cargables a un anión. El bloque hidrófobo es hidrófobo en el agregado.

[0133] Por lo tanto, el bloque hidrófobo puede contener unidades de repetición aniónicas, unidades de repetición catiónicas, unidades de repetición zwitteriónicas, una combinación de dos o más unidades de repetición cargadas (por ejemplo, unidades de repetición aniónicas y catiónicas, unidades de repetición aniónicas y zwitteriónicas, o unidades de repetición aniónicas, catiónicas y zwitteriónicas), unidades de repetición sustancialmente no cargadas, o una combinación de los mismos, siempre que su carácter general sea hidrófobo. Dicho de otra forma, el bloque hidrófobo puede contener cualquiera de una amplia gama de unidades de repetición, hidrófobas o incluso hidrófilas, siempre que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición comprendidas por el bloque hidrófobo proporcionen un bloque que tiene un carácter hidrófobo en general. Cuando las unidades de repetición contienen grupos ionizables, la contribución de una unidad de repetición individual a la hidrofiliidad global del bloque de la que es un constituyente puede variar en función de su pKa en relación con el pH del medio en el que se encuentra. Por ejemplo, las unidades de repetición de ácido propilacrilico, -CH₂C(CH₂CH₂CH₃)(COOH)-, se ionizan predominantemente a pH 7, pero no a pH 5 y por lo tanto, la contribución hidrófoba de unidades de repetición de ácido propilacrilico a un bloque es significativamente mayor a pH 5 que a pH 7. En general, por lo tanto, se prefiere que la suma de las contribuciones de las unidades de repetición que constituyen el bloque hidrófobo sea tal que el carácter general del bloque sea hidrófobo en pH que son inferiores a pH fisiológico. Por ejemplo, en una realización, la suma de las contribuciones es tal que el carácter general del bloque es hidrófobo a un pH de aproximadamente 5,0. A modo de ejemplo adicional, en una realización, la suma de las contribuciones es tal que el carácter general del bloque es hidrófobo a un pH de aproximadamente 5,5. A modo de ejemplo adicional, en una realización, la suma de las contribuciones es tal que el carácter general del bloque es hidrófobo a un pH de aproximadamente 6,0. A modo de ejemplo adicional, en una realización, la suma de las contribuciones es tal que el carácter general del bloque es hidrófobo a un pH de aproximadamente 6,8. A modo de ejemplo adicional, en una realización, la suma de las contribuciones de las unidades de repetición es tal que el carácter general del bloque hidrófobo es hidrófobo a un pH dentro del intervalo de aproximadamente 6,2 a 6,8.

[0134] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en el presente documento comprende residuos monoméricos resultantes de la polimerización o copolimerización de un monómero que comprende una especie hidrófoba. Los monómeros que comprenden una especie hidrófoba incluyen, a modo de ejemplo no limitante, etacrilato de (C₂-C₈) alquilo, metacrilato de (C₂-C₈) alquilo, acrilato de (C₂-C₈) alquilo, estireno, (C₂-C₈) alquilvinilo, o similares, opcionalmente sustituidos. En ciertas realizaciones, los monómeros que comprenden una especie hidrófoba incluyen, a modo de ejemplo no limitante, monómeros de fórmula VI:



en la que:

R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido;
 R³ es hidrógeno, halógeno, C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido, o -C(=O)R⁵;
 R⁴ es hidrógeno, halógeno, C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido;
 R⁵ es C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido, -SR⁶, -OR⁶, o -NR⁷R⁸;

R⁶ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido; R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido; o R⁷ y R⁸ junto con el nitrógeno al que están unidos forman un heterociclo opcionalmente sustituido.

[0135] En ciertas realizaciones, además de una especie hidrófoba, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende además una especie aniónica. En realizaciones específicas, la especie aniónica es aniónica a pH aproximadamente neutro. En realizaciones específicas, el bloque hidrófobo comprende un primer residuo de monómero que comprende una especie hidrófoba y un segundo residuo de monómeros que comprende una especie aniónica.

[0136] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos. En algunas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos cargables. En algunas realizaciones, los residuos monoméricos que son aniónicos, (1) son aniónico a aproximadamente pH neutro, un pH mayor que aproximadamente 7,2, o cualquier pH mayor que aproximadamente 7,4, y (2) son no cargados a un pH de menos de aproximadamente 6, menos de aproximadamente 5,8, menos de aproximadamente 5,7, menos de aproximadamente 5,6, menos de aproximadamente 5,5, menos de aproximadamente 5,4, menos de aproximadamente 5,2, menos de aproximadamente 5,0, o menos de aproximadamente 4,5. En algunas realizaciones, los residuos monoméricos tienen un pKa en cualquier punto entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,0, en cualquier punto entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, o en cualquier punto entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones, los monómeros que cuando se polimerizan proporcionan residuos monoméricos aniónicos tienen un pKa en cualquier punto entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,0, en cualquier punto entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, o en cualquier punto entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0.

[0137] En realizaciones específicas, las especies aniónicas que se pueden encontrar en los residuos monoméricos aniónicos descritos en este documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, grupos de ácido carboxílico, sulfonamida, ácido bórico, ácido sulfónico, ácido sulfínico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fosfínico, y ácido fosforoso, o las bases conjugadas o aniones de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo monomérico aniónico es un residuo de ácido (C₁-C₈) alquilacrílico, o ácido acrílico. En ciertas realizaciones, se utilizan monómeros tales como anhídrido maleico, (Scott M. Henry, Mohamed EH El-Sayed, Christopher M. Pirie, Allan S. Hoffman, y Patrick S. Stayton, pH-Responsive Poly(styren-alt-maleic anhydride) Alkylamide Copolymers for Intracellular Drug Delivery. Biomacromolecules 2006, 7, 2407-2414) para la introducción de especies aniónicas mediante hidrólisis después de la polimerización de las unidades monoméricas de anhídrido maleico.

[0138] En ciertas realizaciones, además de una especie hidrófoba, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende además una especie catiónica. En algunas realizaciones, además de una especie hidrófoba y una especie aniónica, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende además una especie catiónica. En ciertas realizaciones, además de un residuo monomérico hidrófobo, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende además un residuo monomérico catiónico. En algunas realizaciones, además de un residuo monomérico hidrófobo y un residuo monomérico aniónico, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende además un residuo monomérico catiónico. En algunas realizaciones, la especie y/o residuos monoméricos que son catiónicos son catiónicos a pH aproximadamente neutro.

[0139] En algunas realizaciones, un residuo monomérico catiónico descrito en este documento tiene un pKa que varía en cualquier punto entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 10,0, habitualmente entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 9,5, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5. Tras la incorporación del monómero en el bloque de polímero, el pKa del residuo tiende a disminuir en relación con el monómero no polimerizado; en general, por lo tanto, el pKa de las unidades de repetición incorporadas estará entre aproximadamente 6,0 y 10,0, habitualmente entre aproximadamente 6,2 y 9,0, y en algunas realizaciones, entre aproximadamente 6,5 y 8,0.

[0140] En ciertas realizaciones, el bloque hidrófobo comprende una especie monomérica que comprende una amina acíclica (por ejemplo, una amina, una alquil amina, una dialquil amina, o similares), una imina acíclica (por ejemplo, una imina, una alquil imina, o similares), una amina cíclica (por ejemplo, piperidina), un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, piridina o quinolina), o similares. En realizaciones específicas, una especie catiónica utilizada en este documento incluye una amina acíclica protonada (por ejemplo, una amina, una alquil amina, una dialquil amina, o similares), una imina acíclica (por ejemplo, una imina, una alquil imina, o similares), una amina cíclica (por ejemplo, piperidina), un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, piridina o quinolina), o similares.

[0141] Los ejemplos no limitantes de aminas acíclicas incluyen metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, propilamina, isopropilamina, diisopropilamina, diisopropiletilamina, n-butilamina, sec-butilamina, terc-butilamina, pentilamina, neo-pentilamina, iso-pentilamina, hexanamina o similares. Los ejemplos no limitantes de iminas acíclicas incluyen metilimina, etilimina, propilimina, isopropilimina, n-butilimina, sec-butilimina, pentilimina, neo-pentilimina, iso-pentilimina, hexilimina o similares. Los ejemplos no limitantes de aminas cíclicas incluyen ciclopropilamina,

ciclobutilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, cicloheptilamina, piperidina, pirazina, pirrolidina, homopiperidina, azabicycloheptano, diazabicycloundecano, o similares. Los ejemplos no limitantes de iminas cíclicas incluyen ciclopropilimina, ciclobutilimina, ciclopentilimina, ciclohexilimina, cicloheptilimina, o similares. Los ejemplos no limitantes de heteroarilos que contienen nitrógeno incluyen imidazolilo, pirrolilo, piridilo, indolilo, o similares.

5

[0142] En algunas realizaciones, un bloque hidrófobo de un polímero descrito en este documento comprende una pluralidad de residuos monoméricos de amino(C₁-C₆)alquilo-etacrilato, amino (C₁-C₆)alquilo-metacrilato, amino (C₁-C₆)alquil acrilato, (N-(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquilo-etacrilato, N-(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquil-metacrilato, N-(C₁-C₆)alquil-amino (C₁-C₆) alquilo-acrilato, (N, N-di(C₁-C₆) amino alquil-(C₁-C₆) alquil-etacrilato, N,N-di(C₁-C₆)alquil-amino (C₁-C₆) alquil-metacrilato, N, N-di(C₁-C₆) alquil-amino (C₁-C₆) alquil-acrilato, o una combinación de los mismos opcionalmente sustituidos. En realizaciones específicas, dichos residuos monoméricos constituyen un residuo monomérico catiónico a pH neutro tal como se describe aquí.

10

[0143] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo descrito en este documento comprende una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos, una pluralidad de residuos monoméricos catiónicos, y una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos.

15

[0144] En ciertas realizaciones específicas, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo tiene una carga global sustancialmente neutra. En realizaciones aún más específicas, una carga global sustancialmente neutra del bloque hidrófobo significa que al menos el 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de la carga de cualquiera de los residuos monoméricos catiónicos o los residuos monoméricos aniónicos son neutralizados por la carga de los otros residuos monoméricos catiónicos o los otros residuos monoméricos aniónicos. En otras palabras, en diversas realizaciones, la relación entre el número de unidades monoméricas en el bloque hidrófobo que son catiónicas a pH aproximadamente neutro con respecto al número de unidades monoméricas en el bloque hidrófobo que son aniónicas a pH aproximadamente neutro está entre aproximadamente 3:5 y aproximadamente 5:3, entre aproximadamente 7:10 y aproximadamente 10:7, entre aproximadamente 4:5 y aproximadamente 5:4, entre aproximadamente 9:10 y aproximadamente 10:9, entre aproximadamente 95:100 y aproximadamente 100:95, o entre aproximadamente 98:100 y aproximadamente 100:98. La determinación de las relaciones de carga se puede conseguir de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante el cálculo de la cantidad de especies cargadas utilizando el pKa y/o valores de pKb de los mismos.

20

25

30

[0145] En algunas realizaciones, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo comprende especies aniónicas y especies catiónicas en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, de aproximadamente 1:0 a aproximadamente 1:4 (especies aniónicas:especies catiónicas). En una realización preferida, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo comprende especies aniónicas y especies catiónicas en una relación de aproximadamente 1:1 (especies aniónicas:especies catiónicas). En algunas realizaciones, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo comprende residuos monoméricos aniónicos y residuos monoméricos catiónicos en una relación de aproximadamente 1:0 a aproximadamente 1:4 (residuos monoméricos aniónicos:residuos monoméricos catiónicos). En una realización preferida, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo comprende residuos monoméricos aniónicos y residuos monoméricos catiónicos en una relación de aproximadamente 1:1 (residuos monoméricos aniónicos:residuos monoméricos catiónicos).

35

40

[0146] En ciertas realizaciones, a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, a aproximadamente pH 7,4), el bloque hidrófobo comprende residuos monoméricos hidrófobos, residuos monoméricos catiónicos y residuos monoméricos aniónicos. En realizaciones específicas, la relación de residuos monoméricos hidrófobos con respecto a residuos monoméricos cargados (residuos monoméricos catiónicos más residuos monoméricos aniónicos), es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, o de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1, o de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 3:1, o de aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 1:2, o de aproximadamente 2:1.

50

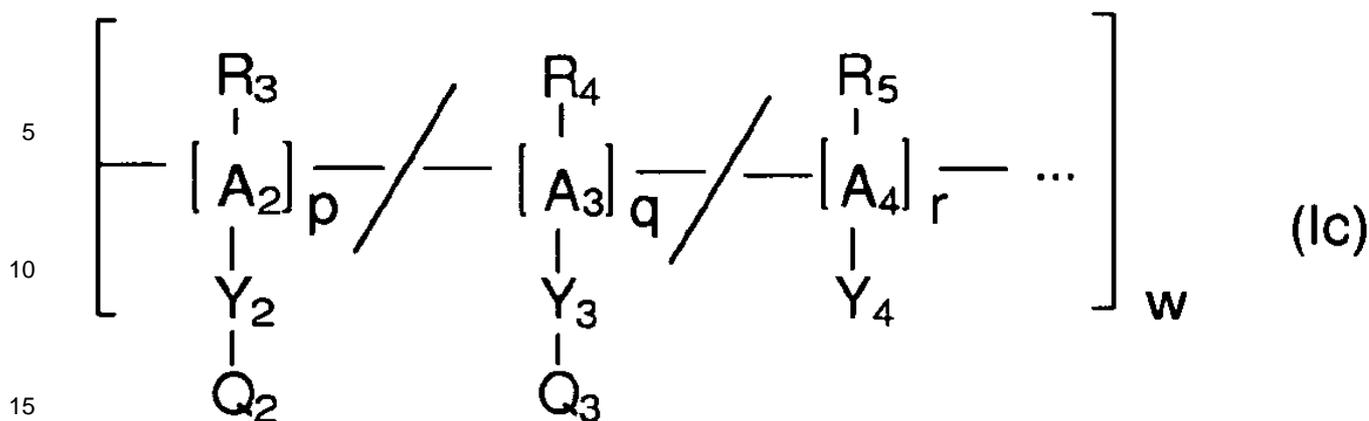
[0147] En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo, como se describe en el presente documento comprende una pluralidad de primeros residuos monoméricos derivados de un primer monómero polimerizable que tiene una especie aniónica protonable y una especie hidrófoba, y opcionalmente una pluralidad de segundos residuos monoméricos derivados de un segundo monómero polimerizable que tiene una especie de catión desprotonable.

55

[0148] En algunas realizaciones, un bloque hidrófobo, como se describe en el presente documento, comprende la estructura de Fórmula Ic:

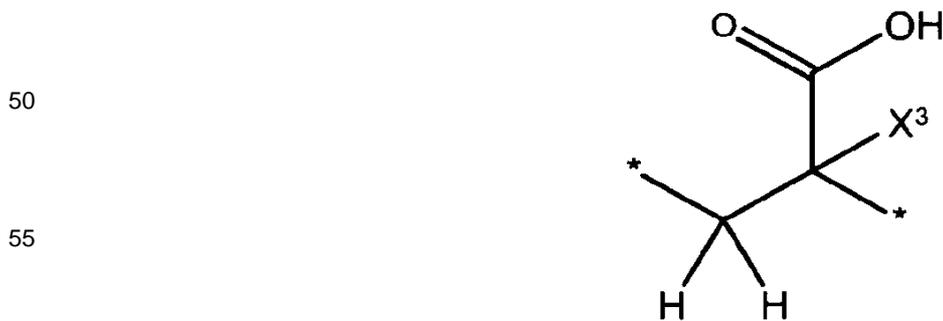
60

65



en la que
 A₂, A₃ y A₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de -C-C-, -C-, -C(O)(C)_aC(O)O-, -O(C)_aC(O)- y -O(C)_bO-; en la que,
 a es 1-4;
 b es 2-4;
 Y₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (1C-10C) alquilo, (3C-6C)cicloalquilo, O-(1C-10C) alquilo, -C(O)O(1C-10C) alquilo, C(O)NR₆(1C-10C) y arilo, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos de flúor;
 Y₂ se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, (1C-10C) alquilo, -C(O)O(2C-10C) alquilo, -OC(O)(1C-10C)alquilo, -O(2C-10C) alquilo- y -S(2C-10C) alquilo -C(O)NR₆(2C-10C)alquilo-;
 Y₃ se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente, (1C-10C) alquilo y (6C-10C) arilo; en el que los átomos de carbono tetravalentes de A₂-A₄ que no están totalmente sustituidos con R₃-R₅ e Y₂-Y₄ se completan con un número apropiado de átomos de hidrógeno;
 cada R₃, R₄, y R₅ se selecciona 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;
 Q₂ es un residuo que está cargado positivamente a pH fisiológico, incluyendo, pero sin limitación, amino, alquilamino, amonio, alquilamónio, guanidina, imidazolilo y piridilo;
 Q₃ es un residuo que está cargado negativamente a pH fisiológico, pero experimenta protonación a un pH inferior, incluyendo, pero sin limitación, carboxilo, sulfonamida, boronato, fosfonato, y fosfato;
 p es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (por ejemplo, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5);
 q es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 (por ejemplo, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5);
 en la que:
 r es 0 a aproximadamente 0,8 (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 0,6); en la que
 p + q + r = 1; y,
 w es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa.

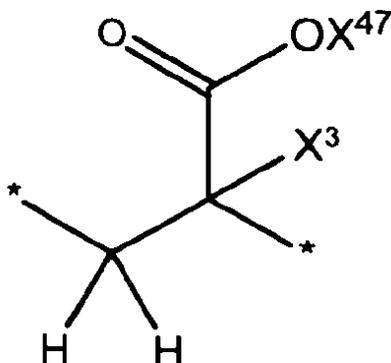
45 **[0149]** En una realización preferida, el bloque hidrófobo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A



60 **Formula 1A**

65 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1A a otras unidades de repetición; y X³ es alquilo. Los alquilos de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo y butilo. Habitualmente, X³ es etilo o propilo. En una realización preferida, X³ es propilo.

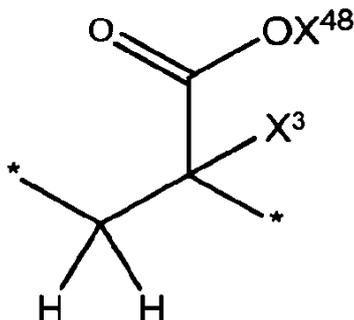
[0150] En una realización preferida, el bloque hidrófobo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1E



Formula 1E

en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1E a otras unidades de repetición; y X^3 y X^{47} son de forma independiente alquilo. Los alquilos de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo y butilo. Habitualmente, X^3 es metilo, etilo o propilo y X^{47} es independientemente metilo, etilo, propilo o butilo. En una realización preferida, X^3 es metilo y X^{47} es butilo.

[0151] En una realización preferida, el bloque hidrófobo comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1C



Formula 1C

en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1C a otras unidades de repetición; X^3 es alquilo, y X^{48} es alquilo sustituido con amino. Los alquilos de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo y butilo. Habitualmente, X^3 es etilo o propilo y X^{48} es N, N-dialquilaminoalquilo, por ejemplo, N, N-dimetilaminoetilo.

[0152] En una realización preferida, el bloque hidrófobo es un copolímero aleatorio que comprende (i) unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A y la Fórmula 1E, (ii) unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A y 1C, o (iii) unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A, 1C y 1E. En general, cuando el bloque hidrófobo es un copolímero aleatorio que comprende unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A y la Fórmula 1E (con o sin unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1C), la relación entre el número de unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A con respecto al número de unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1E en el tercer bloque es de entre aproximadamente 20:1 y 1:4, respectivamente. Por ejemplo, generalmente se prefiere que la relación del número de unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1A con respecto al número de unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1E en el tercer bloque es entre aproximadamente 3:1 y 1:3, respectivamente. Adicionalmente, se prefiere generalmente que el número de unidades de repetición correspondiente a la Fórmula 1A supere el número de unidades de repetición correspondientes a la Fórmula 1C.

[0153] En general, el bloque hidrófobo comprende una pluralidad de unidades de repetición, es decir, al menos dos. En ciertas realizaciones, un bloque hidrófobo de un polímero descrito en este documento tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 200.000 Dalton, de aproximadamente 1.000 Dalton a

aproximadamente 100.000 Dalton, de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 100.000 Dalton, de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton, de aproximadamente 10.000 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton, de aproximadamente 15.000 Dalton a aproximadamente 35.000 Dalton, o de aproximadamente 20.000 Dalton a aproximadamente 30.000 Dalton.

5

RELACIONES DE BLOQUES

[0154] En ciertas realizaciones, el copolímero de bloques tiene una relación de peso molecular promedio en número (con el peso molecular promedio en número del primer bloque, es decir, bloque hidrófilo, representado por $M_n^{1^\circ}$, el peso molecular promedio en número de segundo bloque o intermedio o portador terapéutico representado por $M_n^{2^\circ}$, y el peso molecular promedio en número del tercer bloque representado por $M_n^{3^\circ}$) de $(M_n^{1^\circ} + M_n^{2^\circ}) : (M_n^{3^\circ})$ de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:9. En algunas realizaciones, $(M_n^{1^\circ} + M_n^{2^\circ}) : (M_n^{3^\circ})$ es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3.

MONÓMEROS POLIMERIZABLES

[0155] En ciertas realizaciones, cada uno del primer, segundo, y tercer bloque del copolímero de bloques comprende residuos monoméricos derivados de un monómero polimerizable. Como se señaló anteriormente, el copolímero de bloques también puede comprender uno o más de otros bloques, además del primer, segundo y tercer bloque y, en esos casos, dicho al menos uno de los bloques adicionales también puede comprender residuos monoméricos derivados de un monómero polimerizable. En realizaciones específicas, cualquiera de los monómeros polimerizados o copolimerizados para proporcionar los bloques hidrófilos, intermedio o hidrófobos incluyen un monómero etilénicamente insaturado. En realizaciones más específicas, los monómeros etilénicamente insaturados incluyen, a modo de ejemplo no limitante, monómeros acrílicos, un monómero vinílico, y similares. En algunas realizaciones, el monómero etilénicamente insaturado es un monómero acrílico seleccionado, a modo de ejemplo no limitante, entre un ácido acrílico opcionalmente sustituido, una acrilamida opcionalmente sustituida, y un acrilato opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, el monómero etilénicamente insaturado se selecciona, a modo de ejemplo no limitante, entre ácido acrílico opcionalmente sustituido con C_1 - C_8 alquilo, una acrilamida opcionalmente sustituida con C_1 - C_8 alquilo y un acrilato opcionalmente sustituido con C_1 - C_8 alquilo.

30

[0156] En ciertas realizaciones, los copolímeros de bloques (por ejemplo, los copolímeros de bloques desestabilizantes de membrana) de las micelas proporcionados en este documento comprenden monómeros etilénicamente insaturados. El término "monómero etilénicamente insaturado" se define aquí como un compuesto que tiene al menos un doble enlace o triple enlace de carbono. Los ejemplos no limitantes de los monómeros etilénicamente insaturados son: un (alquil)acrilato de alquilo, un metacrilato, un acrilato, una alquilacrilamida, una metacrilamida, una acrilamida, un copolímero de estireno, una alilamina, un alilamonio, una dialilamina, una dialilamonio, una N-vinil formamida, un éter de vinilo, un sulfonato de vinilo, un ácido acrílico, una sulfobetaína, una carboxibetaína, una fosfobetaína, o anhídrido maleico.

[0157] En diversas realizaciones, se utiliza cualquier monómero adecuado para proporcionar los polímeros (incluyendo, por ejemplo, los copolímeros de bloque desestabilizantes de membrana) de las micelas descritos en este documento. En algunas realizaciones, los monómeros adecuados para su uso en la preparación de los polímeros (incluyendo, por ejemplo, los copolímeros de bloque desestabilizantes de membrana) de las micelas descritos en este documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, uno o más de los siguientes monómeros: metacrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de propilo (todos los isómeros), metacrilato de butilo (todos los isómeros), metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de isobornilo, ácido metacrílico, metacrilato de bencilo, metacrilato de fenilo, metacrilnitrilo, alfa-metil-estireno, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo (todos los isómeros), acrilato de butilo (todos los isómeros), acrilato de 2-etilhexilo, acrilato de isobornilo, ácido acrílico, acrilato de bencilo, acrilato de fenilo, acrilonitrilo, estireno, acrilatos y estirenos seleccionados de metacrilato de glicidilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de hidroxipropilo (todos los isómeros), metacrilato de hidroxibutilo (todos los isómeros), metacrilato de N, N-dimetilaminoetilo, metacrilato de N, N-dietilaminoetilo, metacrilato de trietilenglicol, anhídrido itacónico, ácido itacónico, acrilato de glicidilo, acrilato de 2-hidroxietilo, acrilato de hidroxipropilo (todos los isómeros), acrilato de hidroxibutilo (todos los isómeros), acrilato de N, N-dimetilaminoetilo, acrilato de N, N-dietilaminoetilo, acrilato de trietilenglicol, metacrilamida, N-metilacrilamida, N, N-dimetilacrilamida, N-terc-butylmetacrilamida, N,n-butylmetacrilamida, N-metilolacrilamida, N-etilolacrilamida, ácido vinil benzoico (todos los isómeros), dietilaminoestireno (todos los isómeros), ácido alfa-metilvinil benzoico (todos los isómeros), dietilamino alfa-metilestireno (todos los isómeros), ácido p-vinilbencenosulfónico, sal de sodio de p-vinilbenceno, metacrilato de trimetoxisililpropilo, metacrilato de trietoxisililpropilo, metacrilato de tributoxisililpropilo, metacrilato de dimetoximetilsililpropilo, metacrilato de dietoximetilsililpropilo, metacrilato de dibutoximetilsililpropilo, metacrilato de diisopropoximetilsililpropilo, metacrilato de dimetoxisililpropilo, metacrilato de dietoxisililpropilo, metacrilato de dibutoxisililpropilo, metacrilato de diisopropoxisililpropilo, acrilato de trimetoxisililpropilo, acrilato de trietoxisililpropilo, acrilato de tributoxisililpropilo, acrilato de dimetoximetilsililpropilo, acrilato de dietoximetilsililpropilo, acrilato de dibutoximetilsililpropilo, acrilato de diisopropoximetilsililpropilo, acrilato de dimetoxisililpropilo, acrilato de dietoxisililpropilo, acrilato de dibutoxisililpropilo, acrilato de diisopropoxisililpropilo, acetato de vinilo, butirato de vinilo, benzoato de vinilo, cloruro de vinilo, fluoruro de vinilo, bromuro de vinilo, anhídrido maleico, N-arilmaleimida, N-fenilmaleimida, N-alquilmaleimida, N-butilmaleimida, N-vinilpirrolidona, N-vinilcarbazol, butadieno, isopreno, cloropreno, etileno, propileno, 1,5-hexadienos, 1,4-hexadienos, 1,3-butadienos, 1,4-pentadienos, alcohol

65

vinílico, vinilamina, N-alquilvinilamina, alilamina, N-alquilalilamina, dialilamina, N-alquildialilamina, alquilenimina, ácidos acrílicos, acrilatos de alquilo, acrilamidas, ácidos metacrílico, metacrilatos de alquilo, metacrilamidas, N-alquilacrilamidas, N-alquilmetacrilamidas, estireno, vinilnaftaleno, vinilpiridina, etilvinilbenceno, aminoestireno, vinilpiridina, vinilimidazol, vinilbifenilo, vinilanisol, vinilimidazolilo, vinilpiridinilo, vinilpolietilenglicol, dimetilaminometilestireno, etil metacrilato de trimetilamonio, etil acrilato de trimetilamonio, dimetilamino propilacrilamida, etil acrilato de trimetilamonio, etil metacrilato de trimetilamonio, trimetilamonio propil acrilamida, acrilato de dodecilo, acrilato de octadecilo, o monómeros de metacrilato de octadecilo, o combinaciones de los mismos.

[0158] En algunas realizaciones, se utilizan opcionalmente versiones funcionalizadas de estos monómeros. Un monómero funcionalizado, tal como se usa aquí, es un monómero que comprende un grupo funcional enmascarado o no enmascarado, por ejemplo, un grupo al que otros restos se pueden unir después de la polimerización. Los ejemplos no limitantes de tales grupos son grupos amino primarios, carboxilos, tioles, hidroxilos, azidas, y grupos ciano. Varios grupos de enmascaramiento adecuados están disponibles (véase, por ejemplo, TW Greene y PGM Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (segunda edición) J. Wiley & Sons, 1991. PJ Kocienski, Protecting groups, Georg Thieme Verlag, 1994).

[0159] Los polímeros descritos aquí se preparan de cualquier manera adecuada. Los métodos sintéticos adecuados usados para producir los polímeros proporcionados en este documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, polimerización catiónica, aniónica y por radicales libres. En algunos casos, cuando se utiliza un proceso catiónico, el monómero se trata con un catalizador para iniciar la polimerización. Opcionalmente, se utilizan uno o más monómeros para formar un copolímero. En algunas realizaciones, dicho catalizador es un iniciador, incluyendo, por ejemplo, ácidos protónicos (ácido de Bronsted) o ácidos de Lewis, en el caso de utilizar ácido de Lewis también se utilizan opcionalmente algunos promotores, tales como agua o alcoholes, En algunas realizaciones, el catalizador es, a modo de ejemplo no limitante, yoduro de hidrógeno, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, fluoruro de hidrógeno, ácido clorosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, tricloruro de aluminio, cloruros de alquilo aluminio, complejos de trifluoruro de boro, tetracloruro de estaño, pentacloruro de antimonio, cloruro de zinc, tetracloruro de titanio, pentacloruro de fósforo, oxiclóruo de fósforo, u oxiclóruo de cromo. En ciertas realizaciones, la síntesis de polímeros se lleva a cabo pura o en cualquier disolvente adecuado. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, pentano, hexano, diclorometano, cloroformo o dimetilformamida (DMF). En ciertas realizaciones, la síntesis de polímeros se lleva a cabo a cualquier temperatura de reacción adecuada, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente -50°C a aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 0°C a aproximadamente 70°C.

[0160] En ciertas realizaciones, los polímeros se preparan mediante una polimerización con radicales libres. Cuando se utiliza un proceso de polimerización con radicales libres, se proporcionan (i) el monómero, (ii) opcionalmente, el comonómero, y (iii) una fuente opcional de radicales libres para desencadenar un proceso de polimerización con radicales libres. En algunas realizaciones, la fuente de radicales libres es opcional debido a que algunos monómeros pueden autoiniciarse después del calentamiento a alta temperatura. En ciertos casos, después de formar la mezcla de polimerización, la mezcla se somete a condiciones de polimerización. Las condiciones de polimerización son aquellas condiciones que hacen que al menos un monómero forme al menos un polímero, tal como se discute en el presente documento. Tales condiciones pueden opcionalmente variarse para cualquier nivel adecuado e incluyen, a modo de ejemplo no limitante, la temperatura, la presión, la atmósfera, las proporciones de los componentes de partida utilizados en la mezcla de polimerización y tiempo de reacción. La polimerización se lleva a cabo de cualquier manera adecuada, incluyendo, por ejemplo, en solución, dispersión, suspensión, emulsión o en masa.

[0161] En algunas realizaciones, los iniciadores están presentes en la mezcla de reacción. Se utiliza opcionalmente cualquier iniciador adecuado si es útil en los procesos de polimerización descritos en el presente documento. Dichos iniciadores incluyen, a modo de ejemplo no limitante, uno o más peróxidos de alquilo, peróxidos de alquilo sustituidos, peróxidos de arilo, peróxidos de arilo sustituidos, peróxidos de acilo, hidroperóxidos de alquilo, hidroperóxidos de alquilo sustituidos, hidroperóxidos de arilo, hidroperóxidos de arilo sustituidos, peróxidos de heteroalquilo, peróxidos de heteroalquilo sustituidos, hidroperóxidos de heteroalquilo, hidroperóxidos de heteroalquilo sustituidos, peróxidos de heteroarilo, peróxidos de heteroarilo sustituidos, hidroperóxidos de heteroarilo, hidroperóxidos de heteroarilo sustituidos, perésteres de alquilo, perésteres de alquilo sustituidos, perésteres de arilo, perésteres de arilo sustituidos, o compuestos azo. En realizaciones específicas, se utilizan como iniciadores peróxido de benzoilo (BPO) y/o AIBN.

[0162] En algunas realizaciones, los procedimientos de polimerización se llevan a cabo en un modo en vivo, de cualquier manera adecuada, tal como, pero sin limitación a polimerización por transferencia radical atómica (ATRP), vivir polimerización con radicales libres mediada por nitróxido (NMP), polimerización con apertura de anillo (ROP), transferencia degenerativa (DT), o reversible Transferencia con Adición-Fragmentación reversible (RAFT). Utilizando métodos de polimerización convencionales y/o en vivo/controlados, se pueden producir diversas arquitecturas de polímero, tal como, pero sin limitación copolímeros de bloque, injerto, estrella y gradiente, mediante lo cual las unidades de monómero se distribuyen ya sea estadísticamente o de una manera con gradiente a través de la cadena o se homopolimerizan en la secuencia de bloque o injertos colgantes. En otras realizaciones, los polímeros se sintetizan por diseño Macromolecular a través de la transferencia de cadenas mediante 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, et al., Macromolecular Rapid Communications, 22, No. 18, 1497-1503 (2001)).

[0163] En ciertas realizaciones, se utiliza transferencia de cadenas por adición-fragmentación reversible o RAFT en la síntesis de polímeros de cadena principal etilénica de esta descripción. RAFT es un procedimiento de polimerización en vivo. RAFT comprende un proceso de transferencia de cadena degenerativa con radicales libres. En algunas realizaciones, los procedimientos RAFT para la preparación de un polímero descrito en este documento emplea compuestos de tiocarbonilito, tales como, sin limitación, ditiocarbonatos, tritiocarbonatos y xantatos para mediar en la polimerización mediante un mecanismo de transferencia de cadena reversible. En ciertos casos, la reacción de un radical polimérico con el grupo C=S de cualquiera de los compuestos anteriores conduce a la formación de productos intermedios radicales estabilizados. Por lo general, estos productos intermedios radicales estabilizados no se someten a las típicas reacciones de terminación de la polimerización radical estándar, sino que reintroducen un radical capaz de la reiniciación o propagación con monómero, reformando el enlace C=S en el proceso. En la mayoría de casos, este ciclo de adición al enlace C=S seguido de la fragmentación del radical subsiguiente continúa hasta que todo el monómero se ha consumido o se detiene la reacción. En general, la baja concentración de radicales activos en un tiempo determinado limita las reacciones normales de terminación.

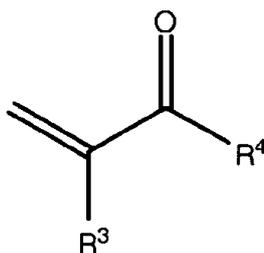
[0164] En algunas realizaciones, los polímeros (por ejemplo, copolímeros de bloques desestabilizadores de membrana) utilizados en las micelas proporcionados en este documento tienen un bajo índice de polidispersidad (PDI) o diferencias en la longitud de la cadena. El índice de polidispersidad (PDI) se puede determinar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, dividiendo el peso molecular promedio en peso de las cadenas de polímero por su peso molecular promedio en número. El peso molecular promedio en número es la suma de los pesos moleculares de las cadenas individuales dividido por el número de cadenas. El peso molecular promedio en peso es proporcional al cuadrado del peso molecular dividido por el número de moléculas de ese peso molecular. Puesto que el peso molecular promedio en peso es siempre mayor que el peso molecular promedio en número, la polidispersidad es siempre mayor o igual a uno. A medida que los números se van acercando para ser el mismo, es decir, a medida que la polidispersidad se aproxima a un valor de uno, el polímero se acerca a ser monodisperso en el que cada cadena tiene exactamente el mismo número de unidades constitucionales. Los valores de polidispersidad que se acercan a uno se pueden lograr utilizando polimerización radicalaria in vivo. Los métodos de determinación de polidispersidad, tales como, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión de luz dinámica, cromatografía de desorción/ionización láser asistida por matriz y la cromatografía de masas por electrospray son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los copolímeros de bloques (por ejemplo, copolímeros de bloque desestabilizadores de membrana) de las micelas proporcionadas en este documento tienen un índice de polidispersidad (PDI) de menos de 2,0, o menos de 1,8, o menos de 1,6, o menos de 1,5, o menos de 1,4, o menos de 1,3, o menos de 1,2.

[0165] Los procesos de polimerización descritos en el presente documento se realizan opcionalmente en cualquier disolvente adecuado o mezcla de los mismos. Los disolventes adecuados incluyen agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, butanol), tetrahidrofurano (THF) dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona, acetonitrilo, hexametilfosforamida, ácido acético, ácido fórmico, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, dioxano, cloruro de metileno, éter (por ejemplo, éter dietílico), cloroformo y acetato de etilo. En un aspecto, el disolvente incluye agua y mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles en agua tales como DMF.

[0166] En ciertas realizaciones, poli(DMAEMA) y otras entidades poliméricas usadas en el presente documento (por ejemplo, copolímeros o bloques de copolímero de BMA, DMAEMA y PAA) se preparan de cualquier manera adecuada. En una realización, el poli (DMAEMA/PEGMA) se prepara mediante copolimerización de DMAEMA y PEGMA en presencia de la CTA RAFT, ECT, y un iniciador de radicales. En algunas realizaciones, se utiliza un bloque, poli(DMAEMA/PEGMA) macroCTA para preparar una serie de copolímeros tribloque u otros copolímeros multibloque donde el bloque hidrófobo contiene BMA, DMAEMA y PAA. En otras realizaciones específicas, la orientación de los bloques en el polímero tribloque o multibloque se invierte, de manera que tras el autoensamblaje, el extremo w del polímero está expuesto en el segmento hidrófilo de la micela. En diversas realizaciones, esto se consigue de cualquier manera adecuada, incluyendo un número de maneras de forma sintética. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la síntesis de los copolímeros de bloques descritos en el presente documento comienza con la preparación del bloque hidrófobo que forma el núcleo PAA/BMA/DMAEMA, y se añade el bloque cargado hidrófilo que forma la cubierta en la segunda etapa sintética sometiendo el PAA/BMA/ DMAEMA macroCTA resultante a una segunda etapa de polimerización RAFT. Los enfoques alternativos incluyen la reducción de PAA/BMA/DMAEMA macroCTA para formar un extremo tiol y a continuación la unión covalente de un polímero cargado hidrófilo preformado al tiol formado. Este enfoque sintético proporciona un método para la introducción de un grupo reactivo en el extremo ω de la cadena polimérica expuesta a la superficie de la micela proporcionando así enfoques alternativos para la conjugación química de la micela.

[0167] En algunas realizaciones, los copolímeros de bloque se sintetizan mediante la conjugación química de varios bloques de polímero que se preparan mediante procedimientos de polimerización separados.

[0168] En ciertas realizaciones, el monómero etilénicamente insaturado se selecciona de, a modo de ejemplo no limitante:



en el que

R³ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo, o C₁-C₃ alquilo opcionalmente sustituido;

R⁴ es -SR⁵, -OR⁵, -NR⁶R⁷, o

R⁴ es C₁-C₄₀ alquilo o C₁-C₄₀ alquilo polioxilado, opcionalmente sustituido por halógeno, ciano, hidroxilo, alcoxi, tiol, alquiltio, sililalquilo, sililarilo, -NR⁹R¹⁰, cicloalquilo, heterocicloalquilo, -C(=O)OR⁹, -S(=O)OR⁹, -S(=O)₂OR⁹, -C(=O)NR⁹NR¹⁰, -S(=O)NR⁹R¹⁰, -S(=O)₂NR⁹R¹⁰, un grupo escindible o un grupo funcionalizable;

R⁵ es C₁-C₄₀ alquilo, C₁-C₄₀ alquilo polioxilado, C₁-C₄₀ alquenoilo, C₁-C₄₀ alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido por halógeno, ciano, hidroxilo, alcoxi, tiol, alquiltio, sililalquilo, sililarilo, -NR⁹R¹⁰, cicloalquilo, heterocicloalquilo, -C(=O)OR⁹, -S(=O)OR⁹, -S(=O)₂OR⁹, -C(=O)NR⁹NR¹⁰, -S(=O)NR⁹R¹⁰, -S(=O)₂NR⁹R¹⁰, un grupo escindible o un grupo funcionalizable;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente hidrógeno, C₁-C₄₀ alquilo, C₁-C₄₀ alquilo polioxilado, C₁-C₄₀ alquenoilo, C₁-C₄₀ alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido por halógeno, ciano, hidroxilo, alcoxi, tiol, alquiltio, sililalquilo, sililarilo, -NR⁹R¹⁰, cicloalquilo, heterocicloalquilo, -C(=O)OR⁹, -S(=O)OR⁹, -S(=O)₂OR⁹, -C(=O)NR⁹NR¹⁰, -S(=O)NR⁹R¹⁰, -S(=O)₂NR⁹R¹⁰, un grupo escindible o un grupo funcionalizable

R⁶ y R⁷, junto con el nitrógeno al que están unidos forman un heterociclo opcionalmente sustituido;

R⁹ y R¹⁰ son cada uno independientemente hidrógeno, C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o R⁹ y R¹⁰ forman junto con el nitrógeno al que están unidos un heterociclo.

COPOLÍMEROS TRIBLOQUE

[0169] En ciertas realizaciones, se proporciona en este documento copolímeros de tres bloques (tribloque) representados por la Fórmula I:



[0170] En ciertas realizaciones, [A1 -A2] es el primer copolímero de bloque, compuesto de residuos monoméricos A1 y A2, en el que A1 es un residuo monomérico hidrófilo, y [A1 -A2] es hidrófilo en general. En algunas realizaciones, [A'1 -A'2] es el segundo copolímero de bloque, compuesto de residuos monoméricos A'1 y A'2. En ciertas realizaciones, [B1 -B2-B3] es el tercer copolímero de bloque, compuesto de los monómeros B1, B2, B3. x, y, z definen la composición de polímero en % en moles de los monómeros individuales. Mn es el peso molecular de cada uno de los bloques de polímero

[0171] En otras realizaciones, el copolímero tribloque se selecciona de los siguientes tribloques:

[PEGMA₇₀ -MAA(NHS)₃₀] - [DMAEMA] - [BPD] (I-1)

[DMAEMA₇₀ -MAA(NHS)₃₀] - [DMAEMA] - [BPD] (I-2)

[Gal] - [HPMA-PDSMA] - [BPD] (I-3)

[Gal-MAA] - [HPMA-PDSMA-MAA] - [BPD] (I-4)

[NACGal] - [HPMA-PDSMA] - [BPD] (I-5)

[NACGal-MAA] - [HPMA-PDSMA-MAA] - [BPD] (I-6)

[Gal] - [D] - [BPD] (I-7)

[NACGal] - [D] - [BPD] (I-8)

[Gal-MAA] - [D] - [BPD] (I-9)

[NACGal-MAA] - [D] - [BPD] (I-10)

[Gal-D] - [D] - [BPD] (I-11)

[NACGal-D] - [D] - [BPD] (I-12)

[Gal] - [PA] - [BPD] (I-13)

[Gal] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-14)

[Gal-MAA] - [PA] - [BPD] (I-15)

[Gal-MAA] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-16)

[Gal-D] - [PA] - [BPD] (I-17)

[Gal-D] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-18)

[NACGal] - [PA] - [BPD] (I-19)

[NACGal] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-20)

[NACGal-MAA] - [PA] - [BPD] (I-21)

[NACGal-MAA] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-22)
 [NACGal-D] - [PA] - [BPD] (I-23)
 [NACGal-D] - [HPMA-PA] - [BPD] (I-24)
 [BA PAA] - [HPMA PDSMA] - [folato] (I-25)
 5 [BA PAA] - [HPMA MAA PDSMA] - [folato] (I-26)
 Folato- [PEG] - [HPMA-PDSMA] - [PAD] (I-27)
 Folato- [PEG] - [HPMA-MAA-PDSMA] - [DBP] (I-28)

10 en los que B es el residuo monomérico de metacrilato de butilo; P es el residuo monomérico de ácido propilacrílico; D es el residuo monomérico de DMAEMA es metacrilato de dimetilaminoetilo; PEGMA es el residuo monomérico de metacrilato de polietilenglicol, donde, por ejemplo, w = 4-5 o 7-8 unidades de óxido de etileno, HPMA es el residuo monomérico de N-(2-propil)metacrilamida o metacrilato de N-propilo (incluyendo todos los isómeros), PA es un residuo monomérico que contiene un grupo amino primario, NACGal es el residuo monomérico derivado del monómero N-acetil galactosa-PEG-vinilo, Gal es el residuo monomérico derivado del monómero galactosa-PEG-vinilo, PDSMA es el residuo monomérico derivado de 2-(2-piridinildisulfanil) metacrilato de etilo o 2-(2-piridinildisulfanil)etil metacrilamida, y
 15 MAA (NHS) es el residuo monomérico derivado de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido metilacrílico. El folato es un residuo de ácido fólico que puede conjugarse a un grupo colgante de un residuo monomérico, incorporado en un CTA, o conjugado con el tiol derivado de la reducción del grupo terminal ω del polímero. Además, se debe entender que HPMA-E (metacrilato de 2-hidroxi-propilo o residuo monomérico derivado del mismo) puede sustituirse por HPMA en cada uno de los ejemplos anteriores en los que aparece HPMA, es decir, I-3 a I-5, I-14, I-16, I-18, I-20, I-22 y I-24 a I-28; únicamente en interés de la brevedad, este tipo de estructuras adicionales no se repiten, pero se considerarán parte de esta descripción.

MICELAS

25 **[0172]** En ciertas realizaciones, las micelas se forman a partir de una pluralidad de polímeros que comprenden un bloque hidrófilo, un bloque portador, y un bloque hidrófobo tal como se describe en este documento. En ciertas realizaciones, una micela descrita en este documento comprende una pluralidad de copolímeros de bloque, comprendiendo la micela un núcleo y una cubierta. En realizaciones específicas, el núcleo de la micela comprende los bloques hidrófobos de la pluralidad de copolímeros de bloque y la cubierta comprende los bloques hidrófilos de los copolímeros de bloque. Además, en realizaciones más específicas, la cubierta comprende una capa interior y una capa exterior (respecto a la otra; también son posibles capas adicionales), formando primer bloque hidrófilo la capa exterior y formando el segundo bloque hidrófilo la capa interior de la cubierta de la micela.

35 **[0173]** En ciertas realizaciones, el primer bloque hidrófilo está en la superficie (o al menos cerca de la superficie de la micela en relación con el segundo bloque hidrófilo o asociado a agente terapéutico). En ciertas realizaciones, el primer bloque hidrófilo protege (por ejemplo, a través de interacciones estéricas y/o interacciones estáticas) una parte interior de la micela (por ejemplo, una capa de una micela formada por el segundo bloque hidrófilo y/o asociado a agente terapéutico, o un agente terapéutico, tal como un polinucleótido, asociado con el segundo bloque).

40 **[0174]** En realizaciones específicas, una pluralidad de una cualquiera o más del polímero descrito en este documento se ensambla en una micela. En realizaciones específicas, dicha micela es estable a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, es estable en un medio acuoso a un pH de aproximadamente 7,4).

45 **[0175]** En algunas realizaciones, una micela descrita en el presente documento comprende cualquier número de polímeros descritos en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 de los copolímeros descritos en el presente documento por micela, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 de los copolímeros descritos en el presente documento por micela.

50 **[0176]** En una realización, una micela descrita en el presente documento (sin un agente terapéutico auxiliar, tal como un polinucleótido) tiene un potencial zeta que es entre ± 6 mV (milivoltios). En una realización preferida, una micela descrita en el presente documento (sin un agente terapéutico auxiliar, tal como un polinucleótido) tiene un potencial Zeta que es entre ± 5 mV. En una realización preferida, una micela descrita en el presente documento (sin un agente terapéutico auxiliar, tal como un polinucleótido) tiene un potencial Zeta que es entre ± 2 mV.

55 **[0177]** En ciertas realizaciones, la micela descrita en este documento tiene una concentración micelar crítica, CMC, que varía de aproximadamente 0,2 ug/ml a aproximadamente 20 ug/ml. En realizaciones específicas, la micela tiene una concentración micelar crítica, CMC, que varía de aproximadamente 0,5 ug/ml a aproximadamente 10 ug/ml. En ciertas realizaciones, una micela descrita en este documento comprende una pluralidad de copolímeros de bloque descritos en el presente documento, teniendo la pluralidad de copolímeros de bloque descritos en el presente documento un índice de polidispersidad (PDI) de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,7, o de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,4. En algunas realizaciones, una micela comprende una pluralidad de copolímeros descritos en el presente documento en el que el primer bloque, bloque segundo y tercer bloque del copolímero de bloques tienen un índice de polidispersidad de no más de 1,5.

65

5 [0178] En ciertas realizaciones, una micela descrita en el presente documento comprende una pluralidad de copolímeros, tal como se describen en el presente documento, en la que al menos uno o más de la pluralidad de copolímeros está covalentemente reticulado al segundo polímero, mediante lo cual la micella polimérica es una micela polimérica reticulada. En realizaciones específicas, el segundo polímero es también un copolímero tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el copolímero de bloques está reticulado covalentemente al bloque hidrófobo del segundo polímero. En realizaciones específicas, los bloques hidrófobos de dos copolímeros descritos en este documento están reticulados entre sí. En ciertas realizaciones, el copolímero de bloques comprende una pluralidad de residuos monoméricos derivados de la polimerización radical controlada de un monómero etilénico, siendo al menos uno de dichos monómero un monómero reticulante bis-funcional.

10 [0179] En algunas realizaciones, una micela proporcionada en este documento se caracteriza por uno o más de los siguientes: (1) la micela se forma por la autoasociación espontánea de copolímeros de bloques para formar conjuntos organizados (por ejemplo, micelas) tras la dilución de un disolvente miscible en agua (tal como, pero sin limitación, etanol) a disolventes acuosos (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4); (2) la micela es estable a la dilución (por ejemplo, hasta una concentración de polímero de 100 ug/ml, 50 ug/ml, 10 ug/ml, 5 ug/ml o 1 ug/ml, lo que constituye la concentración de estabilidad crítica o la concentración micelar crítica (CMC)); (3) la micela es estable a alta fuerza iónica de los medios circundantes (por ejemplo, 0,5 M de NaCl); y/o (4) la micela tiene una inestabilidad creciente a medida que aumenta la concentración de disolvente orgánico, dichos disolventes orgánicos incluyendo, pero sin limitación, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), y dioxano. En algunas realizaciones, una micela proporcionada en este documento se caracteriza por tener al menos dos de las propiedades mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, una micela proporcionada en este documento se caracteriza por tener al menos tres de las propiedades mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, una micela proporcionada en este documento se caracteriza por tener todas las propiedades mencionadas anteriormente.

25 [0180] En algunas realizaciones, una micela proporcionada en este documento se autoensambla en cualquier concentración adecuada. En ciertas realizaciones, una micela proporcionada en el presente documento se autoensambla (por ejemplo, tiene una concentración micelar crítica (CMC), o la concentración mínima a la que se forma una micela) de aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 60 µg/ml, aproximadamente 70 µg/ml, aproximadamente 80 µg/ml, aproximadamente 90 µg/ml, aproximadamente de 100 µg/ml, o mayor. En ciertas realizaciones, una micela proporcionada de este documento se autoensambla al menos en una concentración entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 100 µg/ml.

35 [0181] En algunas realizaciones, las micelas proporcionadas en este documento se preparan mediante autoensamblaje espontáneo de los polímeros descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, los polímeros descritos en el presente documento se ensamblan en las micelas proporcionadas en este documento tras la dilución de una solución del polímero en disolvente orgánico miscible en agua en medios acuosos. En algunas realizaciones, las micelas proporcionadas en este documento se forman espontáneamente tras la disolución del polímero directamente en medios acuosos. En algunas realizaciones, las micelas no requieren la presencia de un polinucleótido para la formación de micelas.

45 [0182] En algunas realizaciones, las micelas son estables a la dilución en una solución acuosa. En realizaciones específicas, las micelas son estables a la dilución a pH fisiológico (incluyendo el pH de la sangre que circula en un ser humano) con una concentración de estabilidad crítica (por ejemplo, una concentración micelar crítica (CMC)) de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 µg/ml, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg/ml, o menos de 10 µg/ml. Como se usa en este documento, "desestabilización de una micela" significa que las cadenas poliméricas que forman una micela se desagregan al menos parcialmente, se alteran estructuralmente (por ejemplo, se expanden en tamaño y/o cambian de forma), y/o pueden formar estructuras supramoleculares amorfas (por ejemplo, estructuras supramoleculares no micélicas).

55 [0183] En algunas realizaciones, una micela proporcionada en el presente documento es estable en un medio acuoso. En ciertas realizaciones, una micela proporcionada en este documento es estable en un medio acuoso a un pH seleccionado, por ejemplo, aproximadamente pH fisiológico (por ejemplo, el pH de la circulación de plasma humano). En realizaciones específicas, una micela proporcionada en este documento es estable a aproximadamente pH neutro (por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7,4) en un medio acuoso. En realizaciones específicas, el medio acuoso es suero animal (por ejemplo, humano) o plasma animal (por ejemplo, humano). En ciertas realizaciones, una micela proporcionada en este documento es estable en suero humano y/o plasma humano. En realizaciones específicas, la micela es estable en plasma humano circulante. Debe entenderse que la estabilidad de la micela no se limita a un pH designado, sino que es estable a valores de pH que incluyen, como mínimo, el pH designado. En realizaciones específicas, una micela descrita en este documento es sustancialmente menos estable a un pH ácido que a un pH que es aproximadamente neutro. En realizaciones más específicas, una micela descrita en este documento es sustancialmente menos estable a un pH de aproximadamente 5,8 que a un pH de aproximadamente 7,4.

[0184] En realizaciones específicas, la micela es estable a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml, o mayor (por ejemplo, a aproximadamente pH neutro). En algunas realizaciones, la micela es estable a una concentración de aproximadamente 100 µg/mL, o mayor (por ejemplo, aproximadamente pH neutro).

5 **[0185]** En una realización, la micela es una micela polimérica heterogénea que comprende un copolímero de bloque de la presente descripción y al menos un polímero de composición distinta adicional. Otros polímeros de composición distinta incluyen, por ejemplo, otros copolímeros de bloque que comprenden un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo. Ventajosamente, el bloque hidrófobo del otro copolímero o copolímeros de bloque se puede asociar con el bloque hidrófobo del copolímero de la presente descripción a través de interacciones hidrófobas para formar un núcleo hidrófobo. Preferiblemente la micela heterogénea es estable en medio acuoso a un pH fisiológicamente relevante (por ejemplo, pH 7,4). En algunas realizaciones, la micela polimérica heterogénea comprende uno o más polímeros adicionales de composición distinta, tales como un tercer polímero que tiene una composición distinta de cada uno del primer polímero y el segundo polímero. Generalmente, cada bloque de un copolímero de bloques (por ejemplo, del primer polímero y/o el segundo polímero) puede ser un homopolímero o un copolímero aleatorio, en cada caso lineal o no lineal (por ejemplo, ramificado), y en cada caso reticulado o no reticulado, y pueden generalmente comprender uno o más residuos monoméricos derivados de la polimerización de un monómero polimerizable (por ejemplo, usando enfoques de polimerización por radicales controlada en vivo).

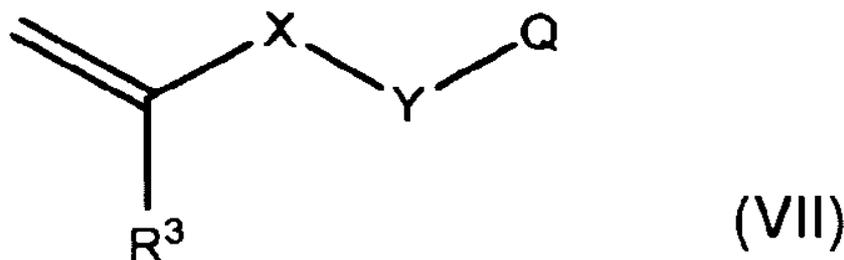
RECONOCIMIENTO ("TARGETING")

20 **[0186]** En ciertas realizaciones, los polímeros o micelas descritos en este documento comprenden al menos un resto de reconocimiento (por ejemplo, un resto que reconoce una célula específica o tipo de célula). En casos específicos, los polímeros y micelas proporcionados en este documento son útiles para la administración de agentes terapéuticos a células de un individuo específicamente marcadas. En ciertos casos, la eficiencia de la captación celular de los polímeros o las micelas se ve reforzada por incorporación de restos de reconocimiento en los polímeros o micelas, o en o sobre la superficie de las micelas. Un "resto de reconocimiento" (usado de forma intercambiable con "agente de reconocimiento") reconoce la superficie de una célula (por ejemplo, una célula de selección). En algunas realizaciones, los restos de reconocimiento reconocen un antígeno de superficie celular o se unen a un receptor en la superficie de la célula diana. En ciertas otras realizaciones, los polímeros o micelas descritos en este documento comprenden una pluralidad de segundas unidades monoméricas además de una pluralidad de unidades monoméricas que llevan restos de reconocimiento, donde la segunda unidad monomérica sirve como unidad espaciadora eue permite a los grupos de restos de reconocimiento colocarse espacialmente para maximizar su unión a un receptor multivalente o diana. Los restos de reconocimiento adecuados incluyen, a modo de ejemplo no limitante, anticuerpos, moléculas similares a anticuerpos, o péptidos, tales como péptidos de unión a integrinas, tales como péptidos que contienen RGD, o moléculas pequeñas, vitaminas, por ejemplo, folato, azúcares tales como lactosa, galactosa, N-acetil amino galactosa u otras moléculas pequeñas. Los antígenos de superficie celular incluyen una molécula de superficie celular, tal como una proteína, azúcar, lípido u otro antígeno en la superficie celular. En realizaciones específicas, el antígeno de superficie celular experimenta internalización. Ejemplos de antígenos de superficie celular reconocidos por restos de reconocimiento de las micelas proporcionadas en este documento incluyen, pero no se limitan, al receptor de transferrina tipo 1 y 2, el receptor de EGF, HER2/Neu, receptores de VEGF, integrinas, NGF, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD33, CD43, CD38, CD56, CD69, y el receptor de asialoglicoproteína.

45 **[0187]** Los restos de reconocimiento (con o sin unidades espaciadoras) están unidos, en diversas realizaciones, a cualquier extremo de un polímero (por ejemplo, copolímero de bloque) de la micela, o a una cadena lateral de una unidad monomérica, o están incorporados en un bloque de polímero. La unión del resto de reconocimiento al polímero se consigue de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por uno cualquiera de un número de estrategias de conjugación química, incluyendo pero sin limitación, enlazadores amina-carboxilo, enlazadores amina-sulfhidrilo, enlazadores amina-carbohidratos, enlazadores amina-hidroxilo, enlazadores amina-amina, enlazadores carboxilo-sulfhidrilo, enlazadores carboxilo-carbohidratos, enlazadores carboxilo-hidroxilo, enlazadores carboxilo-carboxilo, enlazadores sulfhidrilo-carbohidrato, enlazadores sulfhidrilo-hidroxilo, enlazadores sulfhidrilo-sulfhidrilo, enlazadores hidroxilo-carbohidratos, enlazadores carbohidratos-carbohidratos, y enlazadores hidroxilo-hidroxilo. En realizaciones específicas, se utiliza química "click" para unir el ligando de reconocimiento de los copolímeros de bloques que forman las micelas proporcionados en este documento (por ejemplo, de reacciones "clic", véase Wu, P.; Fokin, V.V. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. Aldrichim. Acta 2007, 40, 7-17). Se utilizan opcionalmente una gran variedad de químicas de conjugación (ver, por ejemplo, Bioconjugation, Aslam y Dent, Eds, Macmillan, 1998 y capítulos en el mismo, y Hermanson, GT (2008) Bioconjugate Techniques: 2ª Edición Nueva York: Academic Press). En algunas realizaciones el enlazador es fisiológicamente lábil o contiene un enlace fisiológicamente lábil.

60 **[0188]** En algunas realizaciones, los ligandos de reconocimiento están unidos a un monómero y el compuesto resultante se usa entonces en la síntesis por polimerización de un polímero descrito en este documento (por ejemplo, copolímero de bloques) utilizado en una micela descrita en este documento. En ciertas realizaciones, los monómeros que llevan dichos ligandos de reconocimiento son monómeros vinílicos. En algunos casos, los monómeros que llevan dichos ligandos de reconocimiento tienen la siguiente fórmula VII:

65



[0189] En ciertas realizaciones:

X se selecciona de un grupo que consiste en un enlace covalente -C(O)O-, -C(O)NH-, un C₅-C₁₀arilo divalente, y un C₂-C₁₀heteroarilo divalente,

Y es un enlace covalente o un grupo de unión divalente seleccionado entre C₁-C₂₀ alquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ heteroalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ alqueno divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ alquino divalente opcionalmente sustituido, C₃-C₂₀ cicloalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₁-C₂₀ cicloheteroalquilo divalente opcionalmente sustituido, C₅-C₁₀ arilo divalente opcionalmente sustituido o C₃-C₁₀ heteroarilo divalente opcionalmente sustituido

R³ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno y C₁-C₄ alquilo opcionalmente sustituido,

Q es el grupo de reconocimiento seleccionado del grupo que comprende un residuo de azúcar, un péptido, una vitamina, o una molécula pequeña (PM de menos de 1,5 KDa) que tiene una afinidad por un receptor de la superficie celular o antígeno.

[0190] En algunas realizaciones, los restos de reconocimiento están unidos a un bloque de un copolímero de primer bloque, o a un bloque de un copolímero de segundo bloque en una micela mixta. En algunas realizaciones, el ligando de reconocimiento está unido a la cadena sentido o antisentido de siRNA unida a un polímero o un polímero de la micela. En ciertas realizaciones, el agente de reconocimiento está unido a un extremo 5' o 3' de la cadena sentido o antisentido.

[0191] En ciertas realizaciones, los polímeros o micelas descritos en este documento comprenden al menos un resto de reconocimiento en el extremo alfa del polímero. En ciertas realizaciones, los grupos de reconocimiento se pueden incluir en el extremo alfa del polímero mediante la construcción de un CTA (agente de transferencia de cadena) que incorpora el grupo o grupos de reconocimiento. En ciertas otras realizaciones, el grupo o grupos de reconocimiento incorporados están unidos lejos del centro reactivo del CTA a través de un grupo enlazador, por ejemplo, un polietilenglicol. En ciertas otras realizaciones, un CTA que comprende un residuo de ácido fólico se utiliza como CTA de RAFT para la preparación de polímeros descritos en el presente documento. Alternativamente, se pueden incluir grupos de reconocimiento en el extremo alfa del polímero mediante la modificación de un grupo químico en un macro-CTA con un resto que posee un grupo de reconocimiento, por ejemplo mediante, pero sin limitación, la reacción de un ácido carboxílico en un macro-CTA con un alcohol que posee un grupo de reconocimiento.

[0192] En ciertas realizaciones, los polímeros o micelas descritos en este documento comprenden al menos un resto de reconocimiento en el extremo omega del polímero. En ciertas realizaciones, los grupos de reconocimiento se pueden incluir en el extremo omega del polímero mediante la síntesis de un bloque de polímero adicional, teniendo el bloque adicional polimerizado con un monómero de vinilo un grupo de reconocimiento. En ciertas otras realizaciones, los grupos de reconocimiento se pueden incluir en el extremo omega del polímero mediante la síntesis de un bloque de polímero adicional, el bloque adicional polimerizado con un monómero de vinilo para unirse al grupo de reconocimiento. En ciertas otras realizaciones, los grupos de reconocimiento se pueden incluir en el extremo omega del polímero mediante la síntesis de un bloque de polímero adicional, teniendo el bloque adicional polimerizado con un monómero de vinilo el grupo de reconocimiento. En ciertas otras realizaciones, la polimerización se termina mediante la adición de un monómero maleimido, en el que el monómero maleimido incorpora el grupo o grupos de reconocimiento. En ciertas otras realizaciones, la polimerización se termina mediante la adición de un monómero maleimido, en el que el monómero maleimido incorpora la funcionalidad para unir el grupo o grupos de reconocimiento, por ejemplo, tal como se describe por Henry et al (End-Functionalized Polymers and Junction-Functionalized Diblock Copolymers Via RAFT Chain Extension with Maleimido Monomers. Scott M. Henry, Anthony J, Convertine, Danielle SW Benoit. Allan S. Hoffman y Patrick S. Stayton. Bioconjugate Chem., 2009, 20 (6), páginas 1122-1128). En aún otras realizaciones, los grupos de reconocimiento se pueden incluir en el extremo omega del polímero mediante modificación sintética del grupo Z en la macro CTA, por ejemplo, la reducción de un grupo tritiocarbonilo a un grupo tiol, seguido de la conjugación del grupo de reconocimiento al tiol en el polímero.

[0193] En ciertas realizaciones, una micela o polímeros descrito en este documento comprenden un mecanismo para dirigir el polímero, micela, o agente terapéutico a una célula seleccionada. En algunas realizaciones, el dirigimiento del polímero, micela, o agente terapéutico se consigue proporcionando un copolímero descrito en el presente documento, o una micela que comprende dicho copolímero, que comprende un resto de reconocimiento. En algunas realizaciones, el

resto de reconocimiento es un ligando que tiene afinidad por uno o más receptores efectivos para mediar la endocitosis. En realizaciones específicas, el resto de reconocimiento se acopla covalentemente al primer bloque.

DESESTABILIZACIÓN DE MEMBRANA

5

[0194] En algunas realizaciones, un polímero o micela descritos en este documento (incluyendo las partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) desestabiliza la membrana a un pH de aproximadamente 6,5 o inferior, preferiblemente a un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5, o a un pH de aproximadamente 6,2 o inferior, preferiblemente a un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,2, o a un pH de aproximadamente 6,0 o inferior, preferiblemente a un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. Por ejemplo, en una realización, el polímero o micela desestabiliza la membrana a un pH de o inferior a aproximadamente 6,2, o que aproximadamente 6,5, o inferior a aproximadamente 6,8, o inferior a aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones, la desestabilización de la membrana es de cualquier membrana celular, tal como, a modo de ejemplo no limitante, una membrana extracelular, una membrana intracelular, una vesícula, un orgánulo, un endosoma, un liposoma, o un glóbulo rojo. En algunas realizaciones, los polímeros desestabilizadores de membrana (por ejemplo, copolímeros) o copolímeros de bloque desestabilizadores de membrana proporcionados en este documento son desestabilizadores de membrana (por ejemplo, en un medio acuoso) a un pH endosomal.

[0195] En algunas realizaciones, un polímero o micela descritos en este documento (incluyendo las partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) es hemolítico a pH de o inferior a aproximadamente 6,2, o inferior a aproximadamente 6,5, o inferior a aproximadamente 6,8, de o inferior a aproximadamente 7,0. En realizaciones adicionales o alternativas, el polímero o micela (incluyendo partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) es sustancialmente no hemolítico a un pH mayor que aproximadamente 7,0. En realizaciones específicas, un polímero o micela (incluyendo partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) descritos en este documento es hemolítico a una concentración determinada y un pH de aproximadamente 6,2, y sustancialmente no hemolítico a la misma concentración y a un pH mayor que aproximadamente 7,0. En realizaciones más específicas, la concentración es de entre 2 y 18 ug/ml, donde existe un 50-100% de hemólisis a pH 5,8 y poca o ninguna hemólisis significativa a pH 7,4. En ciertas realizaciones, la naturaleza hemolítica de un polímero o micela (incluyendo partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) descritos en el presente documento se determina de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante el uso de cualquier ensayo de hemólisis estándar, tal como un ensayo de hemólisis in vitro.

[0196] En ciertas realizaciones, un polímero o micela descritos en este documento (incluyendo las partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) altera el endosoma. En algunas realizaciones, un polímero o micela descritos en este documento (incluyendo las partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) altera el endosoma a pH de o menos de aproximadamente 6,2, o inferior a aproximadamente 6,5, o inferior a aproximadamente 6,8, o inferior a aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones, un polímero En ciertas realizaciones, la naturaleza de alteración de un polímero o micela (incluyendo partes, tales como subunidades de polímero, de los mismos) descritos en el presente documento se determina de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante el uso de cualquier ensayo de hemólisis estándar, tal como un ensayo de endosomolisis in vitro, o un ensayo de endosomolisis in vivo en un mamífero no humano.

40

AGENTES TERAPÉUTICOS

[0197] En ciertas realizaciones se proporciona un polímero o micela, tal como se describen en el presente documento, en combinación con un agente terapéutico. En realizaciones específicas, el agente terapéutico es un polinucleótido (por ejemplo, oligonucleótido) o un péptido. El agente terapéutico puede ser utilizado de forma profiláctica como una vacuna o para tratar una afección médica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está asociado iónicamente y/o bioconjugado con el bloque intermedio o segundo bloque de un copolímero descrito en este documento.

[0198] En diversas realizaciones, reactivos de investigación, agentes de diagnóstico, y/o agentes terapéuticos están unidos al copolímero de bloques o una micela que contiene los copolímeros de bloques de cualquier manera adecuada. En realizaciones específicas, la unión se logra a través de enlaces covalentes, interacciones no covalentes, interacciones estáticas, interacciones hidrófobas, o similares, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los reactivos de investigación, agentes de diagnóstico, y/o agentes terapéuticos están unidos a un bloque intermedio o segundo bloque de copolímeros de bloque, o micelas de los mismos. En ciertas realizaciones, los reactivos de investigación, agentes de diagnóstico, o agentes terapéuticos forman el bloque intermedio o segundo bloque de un copolímero de bloque, o micela del mismo. En algunas realizaciones, los reactivos de investigación, agentes de diagnóstico, o agentes terapéuticos están en la cubierta de la micela.

[0199] En algunas realizaciones, se proporciona en este documento una micela que comprende un primer agente terapéutico en la cubierta de la micela y un segundo agente terapéutico en el núcleo de la micela. En realizaciones específicas, el primer agente terapéutico es un polinucleótido. Y el segundo agente terapéutico es un fármaco hidrófobo. En ciertas realizaciones, se proporciona en este documento una micela que comprende un fármaco hidrófobo (por ejemplo, fármaco hidrófobo de molécula pequeña) en el núcleo de la micela.

65

[0200] En ciertas realizaciones, se proporciona en este documento una micela que comprende al menos 1 -5, 5-250, 5-1000, 250-1000, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 50 polímeros con agentes terapéuticos unidos. En algunas realizaciones, se proporciona en este documento una composición que comprende una pluralidad de micelas descritas en el presente documento, en el que las micelas en las mismas comprenden, de promedio, al menos 1 -5, 5-250, 5-1000, 250-1000, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 50 polímeros con agentes terapéuticos unidos.

[0201] En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, etc., se seleccionan entre, a modo de ejemplo no limitante, al menos un nucleótido (por ejemplo, un polinucleótido), al menos un carbohidrato o al menos un aminoácido (por ejemplo, un péptido). En realizaciones específicas, el agente terapéutico es un polinucleótido, un oligonucleótido, un modulador de la expresión génica, un agente knockdown, un ARNs, un agente ARNi, un sustrato Dicer, un miARN, un shARN, un oligonucleótido antisentido, o un aptámero. En otras realizaciones específicas, el agente terapéutico es un aiARN (Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells. Xiangao Sun, Harry A Rogoff, Chiang J Li Nature Biotechnology 26, 1379-1382 (2008)). En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es una proteína, un péptido, una enzima, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un carbohidrato, o una molécula pequeña con un peso molecular de más de aproximadamente 500 Daltons.

[0202] En algunas realizaciones, un polinucleótido asociado con un polímero o micela descrito en el presente documento es un modulador de expresión de genes de oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un aptámero de oligonucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un agente knockdown de oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARN de interferencia. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un oligonucleótido seleccionado entre un siARN, un oligonucleótido antisentido, un sustrato dicer, un miARN, un aiARN o un shARN. En realizaciones específicas, el polinucleótido es un siARN.

[0203] En algunas realizaciones, el agente terapéutico (por ejemplo, oligonucleótido) comprende al menos una carga negativa (por ejemplo, comprende una estructura cargada negativamente) y se asocia con un bloque intermedio o segundo bloque de un polímero (por ejemplo, en una micela). En realizaciones específicas, el bloque intermedio o segundo bloque neutraliza al menos parcialmente las cargas negativas presentes en dicho uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, oligonucleótidos) unidos o presentes en el polímero o una micela que comprende el polímero. En ciertas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, uno o más oligonucleótidos, uno o más siARN, o una combinación de los mismos) forman una asociación (por ejemplo, un complejo) con los bloques intermedios o segundos bloques policatiónicos de la micela. En algunas realizaciones, la asociación (por ejemplo, complejo) entre el polímero o la micela y el agente terapéutico (por ejemplo, oligonucleótido o siARN) se forma a cualquier relación de carga deseada de copolímero de bloques con respecto a agente terapéutico (por ejemplo, oligonucleótido o siARN), por ejemplo, entre 1:1 y 16:1. En realizaciones específicas, el complejo entre la micela y si ARN se forma en la relación de carga de 2:1, 4:1 u 8:1. En otras palabras, en algunas realizaciones, la relación del número de cargas catiónicas presentes en la capa intermedia de la micela formada por los bloques intermedios de los polímeros descritos en el presente documento con respecto al número de cargas aniónicas presentes en el agente terapéutico es cualquier valor deseado, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 16:1, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 12:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 8:1. En algunas realizaciones, siARN es neutralizado en cargas por un bloque intermedio policatiónico de un copolímero de bloques que forma la micela. Por ejemplo, en algunas realizaciones específicas, un polinucleótido de 20 pares de bases (por ejemplo, oligonucleótido o siARN) que comprende 40 cargas negativas a pH fisiológico se asocia (por ejemplo, se compleja) con una micela que comprende un bloque intermedio o segundo bloque poliDMAEMA (80 unidades monoméricas de longitud, PM = 11.680) con un pKa de aproximadamente 7,4. A este pH, el poliDMAEMA contiene 40 cargas negativas, lo que da lugar a una asociación (por ejemplo, complejo) de bloques intermedios de polinucleótido que es unja carga neta sustancialmente neutra. En ciertos casos, evitando un gran número de exceso de cargas positivas se ayuda a reducir la toxicidad in vitro e in vivo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo, oligonucleótido o siARN) se asocia espontáneamente con una cubierta cargada positivamente de una micela proporcionada en este documento.

[0204] En algunas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo, oligonucleótido) se conjuga químicamente al polímero o a la micela y/o a uno o más polímeros de la micela mediante cualquier técnica de conjugación química adecuada. En algunas realizaciones, las micelas que contienen un agente ARNi se forman por conjugación del agente ARNi con una micela ya formada que comprende una pluralidad de polímeros (por ejemplo, copolímeros de bloque). En otras realizaciones, las micelas que contienen un agente ARNi se forman por conjugación del agente ARNi con un polímero (por ejemplo, un copolímero de bloque desestabilizador de membrana) y, posteriormente, la formación de la micela de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por autoensamblaje de los conjugados resultantes en una micela que comprende el agente ARNi. En diversas realizaciones, dicha micela opcionalmente comprende además polímeros no conjugados (por ejemplo, copolímeros de bloques) que son similares, idénticos, o diferentes de los conjugados con el agente ARNi. El enlace covalente entre un polímero y un agente terapéutico de una micela descrito en el presente documento es, opcionalmente, no escindible o escindible. En ciertas realizaciones, un precursor de uno o más agentes ARNi (por ejemplo, un sustrato dicer) está unido a la micela o a las unidades poliméricas de la micela por un enlace no escindible. En algunas realizaciones, uno o más agentes ARNi están unidos a través de un enlace escindible. En ciertas realizaciones, los enlaces escindibles utilizados en las micelas descritas en este documento incluyen, a modo de

ejemplo no limitante, enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro que se disocian en el medio reductor del citoplasma). En algunas realizaciones, la asociación covalente entre una micela (incluyendo los componentes de la misma) y un agente terapéutico (por ejemplo, un oligonucleótido o siARN) se logra a través de cualquier método de conjugación química adecuada, incluyendo, pero sin limitación a enlazadores amina-carboxilo, enlazadores amina-sulfhidrilo, enlazadores amina-carbohidrato, enlazadores amina-hidroxilo, enlazadores amina-amina, enlazadores carboxilo-sulfhidrilo, enlazadores carboxilo-carbohidratos, enlazadores carboxilo-hidroxilo, enlazadores carboxilo-carboxilo, enlazadores sulfhidrilo-carbohidratos, enlazadores sulfhidrilo-hidroxilo, enlazadores sulfhidrilo-sulfhidrilo, enlazadores hidroxilo-carbohidratos, enlazadores carbohidratos-carbohidratos, y enlazadores hidroxilo-hidroxilo. En algunas realizaciones, la conjugación también se realiza con enlaces y enlazadores sensibles al pH, incluyendo, pero sin limitación, enlaces hidrazona y acetal. Cualquier otro método de conjugación adecuada se utiliza opcionalmente también, por ejemplo, están disponibles una gran variedad de químicas de conjugación (véase, por ejemplo, Bioconjugation, Aslam y Dent, Eds, Macmillan, 1998 y capítulos en el mismo).

[0205] En realizaciones específicas, el agente liberado mediante polímero o la micela proporcionada en este documento es un agente de diagnóstico. En algunas realizaciones, el agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico por imagen, por ejemplo, un agente útil en la formación de imágenes del sistema vascular de mamífero que incluye pero no se limita a agentes para tomografía por emisión de positrones (PET), agentes para tomografía computerizada (TC), agentes para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), agentes de formación de imágenes magnéticas nucleares (NMI), agentes de fluoroscopia y agentes de contraste de ultrasonidos. Dichos agentes de diagnóstico incluyen radioisótopos de elementos tales como yodo (I), incluyendo ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , etc., bario (Ba), gadolinio (Gd), tecnecio (Tc), incluyendo ^{99}Tc , fósforo (P), incluyendo ^{31}P , hierro (Fe), manganeso (Mn), talio (Tl), cromo (Cr), incluyendo ^{51}Cr , carbono (C), incluyendo ^{14}C , o compuestos similares, marcados con fluorescencia, o sus complejos, quelatos, aductos y conjugados. En otras realizaciones, el agente de diagnóstico es un gen marcador que codifica proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula (incluyendo, pero sin limitación a, beta-galactosidasa, proteína verde fluorescente, luciferasa, y similares) y sondas de ácido nucleico marcadas (por ejemplo, sondas marcadas con fluorescencia o radiomarcadas). En algunas realizaciones, la conjugación covalente de agentes de diagnóstico a los polímeros o las micelas proporcionadas en este documento se consigue de acuerdo a una variedad de procesos de conjugación. En otras realizaciones, el agente de diagnóstico está asociado no covalentemente con el polímero o la micela proporcionada en este documento por complejación con un residuo quelante (por ejemplo, un residuo ácido carboxílico) incorporado en el copolímero de bloques. En algunas realizaciones, un monómero radiomarcado (por ejemplo, un monómero marcado con ^{14}C) se incorpora en el esqueleto polimérico de la micela (por ejemplo, el bloque intermedio o segundo bloque). En algunas realizaciones, un polímero o una micela asociada con un agente de diagnóstico comprenden un resto de reconocimiento.

35 **MÉTODO PARA PREPARAR LA COMPOSICIÓN MICELAR**

[0206] En ciertas realizaciones, se proporcionan en el presente documento un método para preparar una composición que comprende una micela polimérica heterogénea y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo el método

- 40 a. proporcionar el copolímero de bloques en un primer medio de desnaturalización, comprendiendo el copolímero de bloques un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo,
- b. exponer el copolímero de bloques a un segundo medio acuoso.
- c. permitir que los bloques hidrófobos del copolímero de bloques se asocie en el medio acuoso para formar una micela que comprende el copolímero de bloques, y
- 45 d. asociar un polinucleótido con el segundo bloque del copolímero de bloques.

[0207] En algunas realizaciones, el método comprende además permitir que el polinucleótido forme un complejo iónico con el bloque hidrófilo del primer polímero. En ciertas realizaciones, el método comprende además acoplar covalentemente el polinucleótido, a través de un resto de unión, al segundo bloque a un resto de empalme entre el segundo bloque y el primer bloque o el tercer bloque. También se proporciona en el presente documento una composición preparada de acuerdo con dicho método.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

55 **[0208]** Las composiciones que comprenden un polímero o una micela polimérica y un polinucleótido, pueden ser una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica comprende un polímero o una micela polimérica, un polinucleótido, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 **[0209]** Las composiciones poliméricas y de micelas proporcionadas en este documento (por ejemplo, aquellas unidas a uno o más agentes terapéuticos ARNi, tales como uno o más oligonucleótidos) se proporcionan opcionalmente en una composición (por ejemplo, composición farmacéuticamente aceptable). En algunas realizaciones, una composición de polímero o micela proporcionada en este documento se administra a un paciente en cualquier forma adecuada, por ejemplo, con o sin estabilizantes, tampones, y similares, para formar una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición de polímero o micela proporcionadas en este documento se formula y utiliza en forma de comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones estériles, suspensiones o soluciones para la administración inyectable, y cualquier otra composición adecuada.

5 **[0210]** Se proporcionan formulaciones farmacéuticamente aceptables de una composición de polímero o micela que comprenden al menos un agente terapéutico ARNi descrito en este documento. Estas formulaciones incluyen sales de los compuestos anteriores, por ejemplo, sales de adición de ácido, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido acético, y ácido benceno sulfónico. Una composición o formulación farmacológica se refiere a una composición o formulación en una forma adecuada para la administración, por ejemplo, administración sistémica, en una célula o paciente, incluyendo por ejemplo un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, o por inyección. Por lo tanto, en realizaciones específicas en las que la composición de polímero o micela comprende y libera un polinucleótido, la formulación está en una forma que no impide que la composición del polímero o micela y, más específicamente, el polinucleótido (por ejemplo, oligonucleótido o siARN) alcance una célula diana con el polinucleótido intacto y/o funcional. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo son solubles y/o dispersables. Además, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son, preferiblemente, no tóxicas. En algunas realizaciones, en las que una composición de polímero o micela proporcionada en este documento se administra para el beneficio terapéutico, se administra una cantidad terapéutica eficaz de la composición que comprende un agente terapéutico ARNAi (por ejemplo, un polinucleótido, tal como un siARN). En una realización de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz incluye una cantidad suficiente de una composición de polímero o micela proporcionada en este documento para proporcionar aproximadamente 10 mg o menos de siARN por kg de individuo.

20 **[0211]** En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una composición de polímero o de micelas, que comprenden un agente terapéutico ARNA (por ejemplo, un polinucleótido, tal como un siARN), se administran sistémicamente. Tal como se usa en este documento, "administración sistémica" significa la absorción o acumulación de fármacos sistémica in vivo en el torrente sanguíneo seguido de distribución por todo el cuerpo. Las vías de administración que conducen a la absorción sistémica incluyen, sin limitación: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía tópica.

30 **[0212]** En algunas realizaciones, las composiciones se preparan para el almacenamiento o la administración e incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz del agente terapéutico que comprende una composición de polímero o micela proporcionados en este documento en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Cualquier vehículo o diluyente aceptables se utiliza opcionalmente en el presente documento. Los portadores y diluyentes específicos se describen, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., AR Gennaro ed., 1985. Por ejemplo, se añaden opcionalmente conservantes, estabilizantes, colorantes y agentes saborizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se usan opcionalmente antioxidantes y agentes de suspensión. Tal como se utiliza aquí, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un sólido, semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo, inertes y no tóxicos. Algunos ejemplos de materiales utilizados opcionalmente como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes tales como Tween 80; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; Solución de Ringer; alcohol etílico; y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se administran a seres humanos y/o a animales, por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intranasal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, cremas, ungüentos, o gotas), bucal, o como un pulverizador oral o nasal.

55 **[0213]** En diversas realizaciones, las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires. Además de los principios activos (es decir, los complejos de oligonucleótidos-micelas proporcionados en este documento), las formas de dosificación líquidas contienen además opcionalmente diluyentes o excipientes inertes, tales como, a modo de ejemplo no limitante, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también opcionalmente incluyen adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes.

60 **[0214]** En algunas realizaciones, las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se formulan de acuerdo a cualquier manera adecuada, por ejemplo, usando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril es, opcionalmente, una solución,

- suspensión o emulsión inyectable estéril, en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se emplean opcionalmente están agua, solución de Ringer, USP y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se emplea opcionalmente incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. En realizaciones adicionales, los ácidos grasos tales como ácido oleico se usan en la preparación de inyectables. En una realización específica, la composición de polímero o micela proporcionados en este documento se solubiliza en un fluido portador que comprende 1% (p/v) de carboximetil celulosa de sodio y 0,1% (v/v) de Tween 80.
- [0215]** En algunas realizaciones, las formulaciones inyectables se esterilizan, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se disuelven o dispersan opcionalmente en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.
- [0216]** En ciertas realizaciones, las composiciones para administración rectal o vaginal son supositorios. Los supositorios se preparan mezclando opcionalmente el agente terapéutico que comprende una composición de polímero o micela proporcionados en este documento con excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol, o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan una composición de polímero o micela proporcionados en este documento.
- [0217]** Las formas de dosificación sólidas adecuadas para administración oral incluyen, a modo de ejemplo no limitantes, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, una composición de polímero o micela proporcionados en este documento que comprende un agente terapéutico ARNi (por ejemplo, oligonucleótido) se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, c) humectantes, tales como glicerol, d) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.
- [0218]** Las composiciones sólidas de un tipo similar también se emplean opcionalmente como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.
- [0219]** En algunas realizaciones, las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se preparan con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos adecuados. Contienen opcionalmente agentes opacificantes. En ciertas realizaciones, son de una composición que libera el principio o principios activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión adecuados incluyen, a modo de ejemplo no limitante, sustancias poliméricas y ceras.
- [0220]** Las composiciones sólidas de un tipo similar se emplean opcionalmente como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.
- [0221]** Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de la invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos que comprenden una composición de polímero o micela proporcionados en este documento se mezclan en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o más conservantes, uno o más tampones, o una combinación de los mismos (por ejemplo, según se requiera). También se contemplan una formulación oftálmica, gotas para los oídos, y gotas oculares dentro del alcance de esta invención.
- [0222]** Los ungüentos, pastas, cremas y geles proporcionados en este documento contienen opcionalmente, además de la composición de polímero o micela proporcionados en este documento, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.
- [0223]** Los polvos y pulverizadores contienen opcionalmente, además de una composición de polímero o micela proporcionados en este documento, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. En algunas realizaciones, los pulverizadores contienen adicionalmente propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarbones.

5 [0224] Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar el suministro controlado de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se fabrican de cualquier manera adecuada, por ejemplo, disolviendo o dispensando las micropartículas o nanopartículas en un medio apropiado. Se utilizan opcionalmente potenciadores de absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad o dispersando una composición de polímero o micela proporcionados en este documento en una matriz polimérica o gel.

10 [0225] En algunos aspectos de la invención, una composición de polímero o micela proporciona algunas propiedades (por ejemplo, mecánica, térmica, etc.) que normalmente son realizadas por excipientes, disminuyendo así la cantidad de tales excipientes necesarios para la formulación.

USOS TERAPÉUTICOS

15 [0226] Las composiciones que comprenden polímeros o micelas poliméricas y un polinucleótido se pueden utilizar en varios métodos.

20 [0227] Generalmente, dichas composiciones se pueden usar por ejemplo en un método para la liberación intracelular de un polinucleótido. La composición que comprende un polímero o una micela polimérica y un polinucleótido asociado con los mismos puede estar expuesto a y en contacto con una superficie de la célula (por ejemplo, a través de un reconocimiento dirigido) en un medio a un primer pH. La composición se introduce en una membrana endosomal dentro de la célula, por ejemplo, a través de endocitosis y, en algunas realizaciones, a través de endocitosis mediada por receptor. La membrana endosomal se desestabiliza (por ejemplo, por un polímero constituyente o bloque del mismo, que es un polímero desestabilizador de membrana), liberando de esta forma la composición o el agente (por ejemplo, polinucleótido) al citosol de la célula. El medio puede ser un medio in vitro. El medio puede ser un medio in vitro tal como un medio fisiológico.

30 [0228] En general, por ejemplo, dichas composiciones pueden usarse para modular la actividad de una diana intracelular en una célula. El agente, tal como un polinucleótido, puede liberarse al citosol de una célula de acuerdo con el método descrito en el párrafo inmediatamente anterior. Se permite que el agente (por ejemplo, polinucleótido) interactúe con la diana intracelular, modulando así la actividad de la diana intracelular.

35 [0229] Más específicamente, por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden polímeros o micelas poliméricas (por ejemplo, micelas) proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de un sujeto en riesgo de o afectado por los trastornos asociados con y/o causados por niveles plasmáticos elevados de colesterol, apolipoproteína B, y/o colesterol LDL, por ejemplo, la hipercolesterolemia. En ciertas realizaciones, el tratamiento comprende proporcionar una micela polimérica y un agente terapéutico (por ejemplo, un agente oligonucleótido) asociado con la misma, en el que el agente terapéutico silencia (por ejemplo, por escisión) un gen o un producto génico que promueve dicha afección. En algunas realizaciones, el agente terapéutico (por ejemplo, un oligonucleótido o agente ARNi) silencia el gen de proproteína convertasa subtilisina/Kexin tipo 9 (PCSK9) responsable de la regulación de los niveles y función de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y, por tanto, se utilizan polímeros o micelas poliméricas que comprenden dichos agentes terapéuticos para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PCSK9, por ejemplo, trastornos asociados con y/o causados por unos niveles altos de plasma o colesterol, apolipoproteína B, y/o colesterol LDL, por ejemplo, la hipercolesterolemia. En algunas realizaciones, los polímeros o micelas poliméricas liberan un agente polinucleótido que silencia PCSK9 (por ejemplo, siARN) a una célula que expresa PCSK9. En algunas realizaciones, la célula es una célula de hígado.

50 [0230] En algunas realizaciones, los polímeros o micelas poliméricas (por ejemplo, micelas) proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de un sujeto en riesgo de o afectado por la proliferación celular no deseada (por ejemplo, la proliferación de células malignas o no malignas). El tratamiento comprende proporcionar una composición que comprende un polímero o una micela polimérica y un agente terapéutico (por ejemplo, un agente oligonucleótido), en el que el agente terapéutico puede silenciar (por ejemplo, por escisión) un gen o un producto génico que promueve la proliferación celular no deseada; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz del polímero o micela polimérica a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano.). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un polinucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido) que es homólogo a y puede silenciar (por ejemplo, por escisión) un gen.

60 [0231] En ciertas realizaciones, el gen es, pero no se limita a, un gen del factor de crecimiento o un gen del receptor del factor de crecimiento, una fosfatasa, un gen de quinasa, por ejemplo, una proteína tirosina, serina, o treonina quinasa, un gen de proteína adaptadora, un gen que codifica una molécula de la superfamilia de proteína G, o un gen que codifica un factor de transcripción. En algunos casos, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un polinucleótido que silencia un gen que se expresa en un tejido u órgano específico, incluyendo, pero sin limitación a, pulmón, páncreas, hígado, riñón, ovario, músculo, piel, de mama, colon, estómago, y similares.

65 [0232] En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia uno o más de los siguientes genes el gen de PDGF beta, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PDGF beta, por ejemplo, cáncer testicular y cáncer de pulmón; un gen de Erb-B (por

ejemplo, Erb-B-2 o Erb-B-3), y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erb-B, por ejemplo, cáncer de mama o de pulmón; el gen de Src, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Src, por ejemplo, cáncer de colon; el gen de CRK, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de CRK, por ejemplo, cáncer de colon y de pulmón; el gen de GRB2, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de GRB2, por ejemplo, carcinoma de células escamosas; el gen de RAS, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de RAS, por ejemplo, cáncer de páncreas, colon y pulmón y leucemia crónica; el gen de MEKK, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MEKK, por ejemplo, carcinoma de células escamosas, melanoma, o leucemia; el gen de JNK, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de JNK, por ejemplo, cáncer pancreático o de mama; el gen de la RAF, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de RAF, por ejemplo, cáncer de pulmón o leucemia; el gen de Erk1/2, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erk1/2, por ejemplo, cáncer de pulmón; el gen de PCNA(p21), y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión de PCNA no deseado, por ejemplo, cáncer de pulmón; el gen de MYB, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MYB, por ejemplo, cáncer de colon o leucemia mielógena crónica; el gen de c-MYC, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de c-MYC, por ejemplo, el linfoma de Burkitt o neuroblastoma; el gen de JUN y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de JUN por ejemplo, cáncer de ovario, de próstata o de mama; el gen de FOS, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de FOS, por ejemplo, cáncer de piel o de próstata; el gen de BCL-2, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de BCL-2, por ejemplo, cáncer de pulmón o próstata o el linfoma de no Hodgkin; el gen de la ciclina D, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Ciclina D, por ejemplo, cáncer de esófago y de colon; el gen de VEGF, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de VEGF, por ejemplo, cáncer de esófago y de colon; el gen de EGFR, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de EGFR, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de ciclina A, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Ciclina A, por ejemplo, cáncer de pulmón y de cuello uterino; el gen de la ciclina E, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Ciclina E, por ejemplo, cáncer de pulmón y de mama; el gen de WNT-1, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de WNT 1, por ejemplo, carcinoma de células basales; el gen de beta catenina, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de beta catenina, por ejemplo, adenocarcinoma o carcinoma hepatocelular; el gen de c-MET, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de c-MET, por ejemplo, carcinoma hepatocelular; el gen de PKC, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PKC, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de NFkB, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de NFkB, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de STAT3, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de STAT3, por ejemplo, cáncer de próstata; el gen de survivina, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión de no deseada de survivina, por ejemplo, cáncer de cuello uterino o pancreático; el gen de Her2/Neu, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Her2/Neu, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de la topoisomerasa I, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de la topoisomerasa I, por ejemplo, cáncer de ovario y de colon; el gen de la alfa topoisomerasa II, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de la topoisomerasa II, por ejemplo, cáncer de mama y de colon.

[0233] En otras realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia mutaciones en uno de los siguientes genes: el gen de p73, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p73, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal; el gen de p21 (WAF1/CIP1), y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p21 (WAF1/CIP1), por ejemplo, cáncer de hígado; el gen de p27 (KIP1), y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p27 (KIP1), por ejemplo, cáncer de hígado; el gen de PPM1 D, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PPM1 D, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de RAS, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de RAS, por ejemplo, cáncer de mama; el gen de la caveolina I, y por lo tanto se puede utilizar para tratar

un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de caveolina I, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de esófago; el gen de MIB I, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MIB I, por ejemplo, carcinoma de mama masculino (MBC); gen de MTAI, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MTAI, por ejemplo, carcinoma de ovario; el gen de M68, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de M68, por ejemplo, adenocarcinoma humanos de esófago, estómago, colon y recto.

[0234] En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia mutaciones en genes supresores de tumores y por lo tanto se puede utilizar como un método para promover la actividad apoptótica en combinación con agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el gen supresor de tumores se selecciona de uno o más de los siguientes genes supresores de tumores: el gen supresor del tumor p53, el miembro de la familia p53 DN p63, el gen supresor de tumor pRb, el gen supresor del tumor APC1, el gen supresor del tumor BRCA1, el gen supresor de tumor PTEN.

[0235] En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia uno de los siguientes genes de fusión: genes de fusión mLL, por ejemplo, mLL AF9, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión mLL, por ejemplo, leucemias agudas; el gen de fusión BCR/ABL, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión BCR/ABL, por ejemplo, leucemias agudas y crónicas; el gen de fusión TEL/AML1, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión TEL/AML1, por ejemplo, leucemia aguda infantil; el gen de fusión EWS/FLI1, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión EWS/FLI1, por ejemplo, sarcoma de Ewing; el gen de fusión TLS/, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión TLS/FUS1, por ejemplo, liposarcoma mixoide; el gen de fusión PAX3/FKHR, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión PAX3/FKHR, por ejemplo, liposarcoma mixoide; el gen de fusión AML1/ETO, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión AML1/ETO, por ejemplo, leucemia aguda.

[0236] En algunos aspectos del presente documento las composiciones que comprenden los polímeros o micelas poliméricas y un agente, tal como un polinucleótido, proporcionan agentes terapéuticos para el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o afectado por una enfermedad o trastorno que puede beneficiarse mediante la inhibición de la angiogénesis, por ejemplo, el cáncer o degeneración de la retina. El tratamiento comprende proporcionar un polímero o una micela polimérica que comprende un agente de oligonucleótido, en el que dicho agente de oligonucleótido es homólogo a y/o puede silenciar, por ejemplo, por escisión, un gen que media la angiogénesis (por ejemplo, VEGF R1, VEGFR2, o gen que codifica las proteínas de señalización de los mecanismos de estos receptores); y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho polímero o micela polimérica que comprende el agente oligonucleótido a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

[0237] En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia uno de los siguientes genes: el gen de la integrina alfa v, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por integrina alfa V no deseada, por ejemplo, tumores cerebrales o tumores de origen epitelial; el gen del receptor Flt-1, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por receptores de Flt-1 no deseados, por ejemplo, cáncer y la artritis reumatoide; el gen de la tubulina, y por lo tanto se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por tubulina no deseado, por ejemplo, cáncer y neovascularización retinal.

[0238] En algunos aspectos, la composición que comprende polímeros o micelas poliméricas y un agente de oligonucleótido se refiere a un método de tratamiento de un sujeto infectado con un virus o en riesgo de o afectado por un trastorno o enfermedad asociada con una infección viral. El método comprende proporcionar un polímero o una micela polimérica que comprende un agente de oligonucleótido, en el que dicho agente de oligonucleótido es homólogo a y/o puede silenciar, por ejemplo, por escisión, un gen viral o un gen celular que media la función viral, por ejemplo, la entrada o el crecimiento; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho agente de oligonucleótido a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

[0239] En algunas realizaciones, la composición que comprende polímeros o micelas poliméricas y un agente de oligonucleótido es útil en el tratamiento de sujetos infectados con el virus del papiloma humano (VPH) o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por HPV, por ejemplo, cáncer cervical.

[0240] En algunas realizaciones, se reduce una composición que comprende un polímero o una micela polimérica y un agente oligonucleótido que silencia la expresión de un gen de VPH. En algunas realizaciones, el gen de HPV se selecciona entre el grupo de E2, E6, o E7.

[0241] En otra realización se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VPH.

5 [0242] En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil en el tratamiento de pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por VIH, por ejemplo, de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen del VIH. En otras realizaciones, el gen del VIH es CCR5, Gag, o Rev. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VIH. En algunas realizaciones, el gen es CD4 o Tsg101.

10 [0243] En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados por el Virus de la Hepatitis B (VHB) o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por HBV, por ejemplo, cirrosis y carcinoma hepatocelular. En una realización, se reduce la expresión de un gen de HBV. En otra realización, el gen de HBV dirigido codifica uno de los grupos de la región de la cola de la proteína central del VHB, la región cregious (pre c), o la región cregious (c). En otras realizaciones, una secuencia de ARN de HBV dirigida se compone de la cola de poli(A). En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHB.

15 [0244] En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados con o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por un virus seleccionado de los siguientes virus: el virus de hepatitis (VHA); Hepatitis C (VHC); cualquiera del grupo de cepas virales de hepatitis que comprenden la hepatitis D, E, F, G o H; el Virus Respiratorio Sincitial (VRS); el herpes citomegalovirus (CMV); el virus herpes de Epstein Barr (EBV); Sarcoma asociado Virus herpes de Kaposi (HVSK); el virus JC (JCV); mixovirus (por ejemplo, virus causante de la gripe), rinovirus (por ejemplo, virus que causan el resfriado común), o coronavirus (por ejemplo, virus que causan el resfriado común); el flavivirus de encefalitis de St. Louis; el flavivirus de la encefalitis por garrapatas; flavivirus de la encefalitis de Valle de Murray; flavivirus del dengue; virus de simio 40 (SV40); virus de la encefalomiocarditis (EMCV); virus del sarampión (MV); virus de la varicela zoster (VZV); adenovirus (por ejemplo, virus causante de una infección del tracto respiratorio); poliovirus; o un poxvirus (un poxvirus que causa la viruela). En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de estos virus.

20 [0245] En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados por el Virus Herpes Simplex (HSV) o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por HSV, por ejemplo, herpes genital y herpes labial, así como una enfermedad mortal o que afecta a la vista, por ejemplo, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen de HSV. En otras realizaciones, el gen de HSV dirigido codifica ADN polimerasa o la helicasa primasa. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del HSV.

25 [0246] En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados por el Virus del Nilo Occidental o en riesgo de o afectados por un trastorno mediado por Virus del Nilo Occidental. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen del virus del Nilo Occidental. En otras realizaciones preferidas, el gen del virus del Nilo Occidental se selecciona entre el grupo que comprende E, NS3, o NS5. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del Virus del Nilo Occidental.

30 [0247] En algunas realizaciones, el polímero o micela polimérica comprende un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados por el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) o una enfermedad o trastorno asociado con este virus, por ejemplo, leucemia o mielopatía. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen de HTLV. En algunas realizaciones, el gen de HTLV1 es el activador transcripcional Tax. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del HTLV.

35 [0248] En algunos aspectos, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para el tratamiento de un sujeto infectado con un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano, amebiano, parasitario, o fúngico. El método de tratamiento comprende proporcionar un polímero o una micela polimérica que comprende un agente de oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido es homólogo a y/o puede silenciar, por ejemplo, por escisión, un gen del patógeno o un gen implicado en el crecimiento del patógeno; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho agente de oligonucleótido a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. El gen diana puede seleccionarse a partir de un gen implicado en el crecimiento del patógeno, la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, transcripción, el metabolismo energético, por ejemplo, el ciclo de Krebs, o la producción de toxina.

40 [0249] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para el tratamiento de pacientes infectados por un Plasmodium que causa la malaria. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen de Plasmodium. En otras realizaciones, el gen es el antígeno de membrana apical 1 (AMA1). En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de Plasmodium.

45 [0250] En algunas realizaciones, el polímero o micela polimérica comprende un agente de oligonucleótido útil para tratar pacientes infectados por Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, o una

enfermedad o trastorno asociado con cualquiera de estos patógenos. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de un gen bacteriano y/o un gen humano que se requiere para la replicación de estas bacterias.

[0251] En algunas realizaciones, las enfermedades tratadas por las composiciones que comprenden un polímero o una micela polimérica y un agente tal como proporcionan en este documento pueden ser sistémicas o estar presentes en un tejido específico, por ejemplo, pulmón, piel, hígado, mama, riñón, páncreas, SNC, o similares. En ciertos aspectos, el oligonucleótido silencia un gen que media o está implicado en una enfermedad o trastorno metabólico, por ejemplo, diabetes, obesidad, y similares. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido silencia un gen que media o está implicado en una enfermedad o trastorno pulmonar, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, o cáncer de pulmón. En algunos aspectos del presente documento, los polímeros o micelas poliméricas comprenden un agente de oligonucleótido útil para y/o relacionado con un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o afectado por una enfermedad o trastorno caracterizado por una respuesta inmune no deseada, por ejemplo, una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad o trastorno autoinmune. El método comprende proporcionar un polímero o una micela polimérica que comprende un agente de oligonucleótido, en el que dicho agente de oligonucleótido es homólogo a y/o puede silenciar, por ejemplo, por escisión, un gen que media una respuesta inmune no deseada; y administrar dicho agente de oligonucleótido a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es una lesión por isquemia o reperfusión, por ejemplo, isquemia o lesión por reperfusión asociada con infarto agudo de miocardio, angina inestable, derivación cardiopulmonar, intervención quirúrgica, por ejemplo, angioplastia, por ejemplo, angioplastia coronaria transluminal percutánea, la respuesta a un órgano o tejido trasplantado, por ejemplo, tejido cardíaco o vascular trasplantado; o trombólisis. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es restenosis, por ejemplo, restenosis asociada con la intervención quirúrgica, por ejemplo, angioplastia, por ejemplo, angioplastia coronaria transluminal percutánea. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es la enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es inflamación asociada con una infección o lesión. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es asma, alergia, lupus, esclerosis múltiple, diabetes, por ejemplo, diabetes tipo II, artritis, por ejemplo, reumatoide o psoriásica. En ciertas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia una integrina o coligando de la misma, por ejemplo, VLA4, VCAM, ICAM. En otras realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia una selectina o coligando de la misma, por ejemplo, P selectina, E selectina (ELAM), I selectina, P selectina glicoproteína 1 (PSGL1). En ciertas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia un componente del sistema del complemento, por ejemplo, C3, C5, C3aR, C5aR, C3, convertasa, y C5 convertasa. En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia una quimiocina o receptor de la misma, por ejemplo, TNFI, TNFJ, IL 1I, IL 1J, IL 2, IL 2R, IL 4, IL 4R, IL 5, IL 6, IL 8, TNFRI, TNFRII, IgE, SCYA11, y CCR3. En otras realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia GCSF, GRO1, Gro2, Gro3, PF4, MIG, Pro proteína básica de plaquetas (PPBP), MIP 1I, MIP 1J, RANTES, MCP 1, MCP 2, MCP 3, CMBKR1, CMBKR2, CMBKR3, CMBKR5, AIF 1, o 309.

[0252] En algunos aspectos, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido útil para el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o afectado por una enfermedad o trastorno neurológico. El método comprende proporcionar un polímero o una micela polimérica que comprende un agente de oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido es homólogo a y/o puede silenciar, por ejemplo, por escisión, un gen que media una enfermedad o trastorno neurológico; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho agente de oligonucleótido a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. En ciertas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia un gen de la familia amiloide, por ejemplo, APP; un gen de presenilina, por ejemplo, PSEN1 y PSEN2, o sinucleína I. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es un trastorno neurodegenerativo por repetición de trinucleótidos, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, o una ataxia espinocerebelosa, por ejemplo, SCA1, SCA2, SCA3 (enfermedad de Joseph Machado), SCA7 o SCA8. En algunas realizaciones, el agente de oligonucleótido silencia HD, DRPLA, SCA1, SCA2, MJD1, CACNL1 A4, SCA7 o SCA8.

[0253] En ciertos aspectos, la composición comprende un polímero o una micela polimérica y un agente de oligonucleótido capaz de escindir o silenciar más de un gen. En estas realizaciones, se selecciona el agente de oligonucleótido de modo que tenga suficiente homología con una secuencia que se encuentra en más de un gen, por ejemplo, una secuencia conservada entre estos genes. De este modo, en algunas realizaciones, un agente de oligonucleótido dirigido a dichas secuencias silencia efectivamente toda la colección de genes.

[0254] Los siguientes ejemplos proporcionan varias realizaciones ilustrativas de la invención, así como métodos de síntesis y diversos parámetros biológicos y de otras actividades. Los ejemplos, sin embargo, proporcionan detalles relativos a sólo algunas de las realizaciones de la invención y no se pretende que sean limitantes.

60 EJEMPLOS

[0255] A lo largo de la descripción de la presente invención, varios acrónimos y abreviaturas conocidas se utilizan para describir monómeros o residuos monoméricos derivados de la polimerización de dichos monómeros. Sin limitación, salvo que se indique lo contrario: "BMA" (o la letra "B", como notación abreviada equivalente) representa metacrilato de butilo o residuos monoméricos derivados de los mismos; "DMAEMA" (o la letra "D", como notación abreviada equivalente) representa metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo o residuos monoméricos derivados del mismo; "Gal" se

refiere a galactosa o un residuo de galactosa, incluyendo opcionalmente restos protectores de hidroxilo (por ejemplo, acetilo) o a un derivado pegilado del mismo; "Nag" se refiere a N-acetil galactosamina o un residuo de N-acetil galactosamina, incluyendo opcionalmente restos protectores de hidroxilo (por ejemplo, acetilo) o a un derivado pegilado del mismo; "HPMA" representa 2-hidroxipropil metacrilamida o residuos monoméricos derivados de la misma; "HPMA-E" representa metacrilato de 2-hidroxipropilo o residuos monoméricos derivados del mismo; "MAA" representa ácido metacrílico o residuos monoméricos derivados del mismo; "MAA(NHS)" representa éster N-hidroxi-succinimida de ácido metacrílico o residuos monoméricos derivados del mismo; "PAA" (o la letra "P" como notación abreviada equivalente) representa ácido 2-propilacrílico o residuo monomérico derivado del mismo, "PEGMA" se refiere al monómero metacrílico pegilado, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{7-8}\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ o residuo monomérico derivado del mismo. En cada caso, cualquiera de dichas designaciones indica el monómero (incluyendo todas las sales, o análogos iónicos de las mismas), o un residuo monomérico derivado de la polimerización del monómero (incluyendo todas las sales iónicas o análogos iónicos de las mismas), y la forma específica indicada es evidente por el contexto para una persona experta en la técnica.

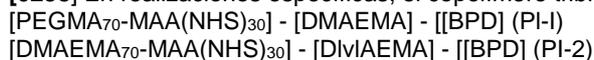
15 **PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS TRIBLOQUE**

[0256] En ciertas realizaciones, se proporciona en este documento copolímeros tribloque representados por la fórmula I:



[0257] En ciertas realizaciones, [A1 -A2] es el copolímero de primer bloques, compuesto de residuos monoméricos A1 y A2, en el que A1 es un residuo monomérico hidrófilo y x es > 0, y [A1-A2] es en general hidrófilo. En algunas realizaciones, [A'1 -A'2] es el copolímero de segundo bloque, compuesto de residuos monoméricos A'1 y A'2. En ciertas realizaciones, [B1-B2-B3] es el copolímero de tercer bloque, compuesto de monómeros B1, B2, B3. x, y, z definen la composición de polímero en% en moles de los monómeros individuales. Mn es el peso molecular de cada uno de los bloques de polímero.

[0258] En realizaciones específicas, el copolímero tribloque incluye:



[0259] Los copolímeros tribloque ofrecen características estructurales y funcionales únicas. En algunos casos, los dos primeros bloques se componen habitualmente de monómeros predominantemente hidrófilos. Un primer bloque que contiene PEGMA actúa como un escudo estérico (por ejemplo, con el fin de reducir la toxicidad) de un segundo bloque homopolímero catiónico, compuesto de, por ejemplo, DMAEMA. El primer bloque puede contener también monómeros de éster reactivos a amina, por ejemplo MAA(NHS), que se utilizan para la conjugación de ligandos que funcionan en el reconocimiento específico del tipo de célula. Un segundo bloque catiónico que contiene funciones DMAEMA como el dominio de unión a fármaco de ácido nucleico. Juntos, el primero y segundo bloques hidrófilos comprenden el dominio exterior y el dominio interior, respectivamente, de una cubierta hidrófila. El tercer bloque contiene ambos monómeros hidrófobos ionizables y que juntos forman un núcleo predominantemente hidrófobo que funciona en la liberación del fármaco de ácido nucleico en endosoma intracelular. Como se demuestra en los ejemplos, el copolímero de tres bloques, que consta de una cubierta hidrófila (con dominios interior y exterior) y un núcleo hidrófobo forma partículas de que tienen las propiedades de las micelas.

45 **EJEMPLO 1. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO DE PRIMER BLOQUE [A1-A2] MACRO-CTAs: [PEGMA-MAA-NHS]-CTA**

[0260] La polimerización RAFT del copolímero de primer bloque se llevó a cabo habitualmente en DMF a 68°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1-4 horas utilizando ácido 4-ciano-4- (etilsulfaniltiocarbonil) sulfanilpentanoico (ECT) como el agente de transferencia de cadena (CTA), y azobisisobutironitrilo (AIBN) (Wako chemicals) como el iniciador de radicales. La relación de monómero inicial a CTA ($[\text{CTA}]_0/[\text{M}]_0$) era tal que el M_n teórico en la conversión del 50% fue el peso molecular deseado (g/mol). La relación de PEGMA y MAA(NHS) o PEGMA y DMAEMA en el primer bloque se varió usando diferentes relaciones de alimentación de los monómeros individuales, por ejemplo 70:30 La $[\text{CTA}]_0/[\text{M}]_0$ era 100:1 La relación de CTA inicial a iniciador ($[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0$) era de 10 a 1. El copolímero de dibloque resultante macro-CTA se aisló por precipitación 4 veces a partir de acetona en hexano/éter 75/25 y se secó durante la noche en vacío. M_n = 11700 KDa; PDI = 1,48.

60 **EJEMPLO 2. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO DE SEGUNDO BLOQUE [A'1] POLÍMERO DMAEMA MACRO-CTA:**

[0261] Se llevó a cabo la polimerización RAFT y el aislamiento del homopolímero de segundo bloque DMAEMA macro-CTA como se describe en el ejemplo 1 utilizando el copolímero de primer bloque como una macro-CTA. M_n = 20,5 kDa, PDI = 1,2. La Figura 1 resume el esquema de reacción para la síntesis de [PEGMA₇₀ - MAA(NHS)₃₀]. La espectroscopía de RMN en CDCl_3 se utilizó para confirmar la estructura del polímero y calcular la composición del segundo bloque (Figura 2). La cromatografía de permeación en gel (GPC) se utilizó para determinar los pesos moleculares y polidispersidades (PDI, M_w/M_n) tanto de las muestras de poli[PEGMA-MAA (NHS)]-macro-CTA como del copolímero de dibloque en DMF utilizando un Viscotek GPCmax VE2001 y refractómetro VE3580 (Viscotek, Houston, TX). Se utilizó

DMF de grado HPLC que contiene 1,0% en peso de LiBr como la fase móvil. Las figuras 3A, 3B y 3C muestran los perfiles de elución que monitorizan la dispersión de luz (LAIS), índice de refracción (RI), y la absorción de UV, respectivamente.

5 **EJEMPLO 3. PREPARACIÓN DE COPOLIMERIZACIÓN DE TERCER BLOQUE (B1-B2-B3), DE DMAEMA, PAA Y BMA A PARTIR DE UN DIBLOQUE POLI [PEGMA-MAA(NHS)] - [DMAEMA] MACROCTA.**

10 [0262] Se añadieron cantidades estequiométricas deseadas de BMA, PAA, y DMAEMA (por ejemplo, 50:25:25) al dibloque poli[PEGMA-MAA(NHS)] - [DMAEMA] disuelto en N, N-dimetilformamida (25% en peso de monómero y macroCTA a disolvente). Para todas las polimerizaciones $[M]_0/[CTA]_0$ y $[CTA]_0/[I]_0$ fueron 250:1 y 10:1 respectivamente. Después de la adición de AIBN las soluciones se purgaron con nitrógeno durante 30 min y se dejaron reaccionar a 68°C durante 6-12 h (Figura 4). El copolímero tribloque resultante se aisló por precipitación 4 veces a partir de acetona en hexano/éter 75/25 y se secó durante la noche en vacío. La espectroscopía de RMN en $CDCl_3$ se utilizó para confirmar la estructura del polímero y calcular la composición del segundo bloque (Figura 5). La cromatografía de permeación en gel (GPC) se utilizó para determinar pesos moleculares y polidispersidades (PDI, Mw/Mn) de las muestras de macroCTAs y de copolímero de tres bloques en DMF utilizando Viscotek GPCmax VE2001 y refractómetro VE3580 (Viscotek, Houston, TX). Se utilizó DMF grado HPLC que contiene 1,0% en peso de LiBr como la fase móvil. Las figuras 6A, 6B y 6C resume nla caracterización de tres bloques y muestra los perfiles de elución que monitorizan la dispersión de luz (LAIS), índice de refracción (RI), y la absorción de UV, respectivamente. Mn = 52,5Kda, PDI = 1,49.

20 **EJEMPLO 4: ESPECTROSCOPIA RMN DE COPOLÍMERO DE TRIBLOQUE [PEGMA₇₀-MAA(NHS)₃₀]-DMAE-MA]-[[B₅₀-P₂₅-D₂₅]. (FIGURA 7)**

25 [0263] Este ejemplo proporciona pruebas, utilizando espectroscopía de RMN, que el polímero tribloque forma una estructura de tipo micela en solución acuosa.

30 [0264] Los espectros de RMN ¹H se registraron en Bruker AV301 en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y agua deuterada (D_2O) a 25°C. Se utilizó un bloqueo de deuterio ($CDCl_3$, D_2O), y los desplazamientos químicos se determinaron en ppm de tetrametilsilano (para $CDCl_3$) y sal de sodio de ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d4 (para D_2O). La concentración de polímero era de 6 mg/ml.

35 [0265] La espectroscopía de RMN del polímero sintetizado, utilizando el polímero tribloque como un ejemplo, en tampón acuoso proporcionó evidencias de que los polímeros de tres bloques de la presente invención forman micelas en solución acuosa. La formación de micelas da lugar a la formación de un núcleo interno viscoso protegido que restringe el movimiento de los protones que forman los segmentos de núcleo e impide el intercambio de deuterio entre el disolvente y los protones del núcleo. Esto se refleja por una supresión significativa o la desaparición de los las señales de RMN ¹H de los protones correspondientes. Se utilizó esta propiedad inherente de la espectroscopia de RMN en solución para mostrar que el bloque hidrófobo del núcleo de la micela está protegido eficazmente. Si se forman micelas en medio acuoso, se produce una desaparición de las señales debido a los protones del bloque de copolímero hidrófobo.

40 [0266] La Figura 7 muestra los experimentos de RMN ¹H del polímero tribloque en D_2O (disolvente acuoso). El espectro de RMN ¹H de polímero en $CDCl_3$ a temperatura ambiente (no mostrado) mostró las señales atribuidas a todos los protones del polímero que indican que las cadenas de polímero permanecen dispersas (no agregadas) en $CDCl_3$ y conserva su movimiento por lo que sus protones podrían intercambiarse con el disolvente. Esto indicó que las micelas estables con núcleos protegidos no se formaron en disolvente orgánico. La Figura 7 muestra los espectros de RMN ¹H de polímero tribloque en D_2O . Las señales que representan los protones del bloque hidrófobo (BMA, PAA, DMAEMA) desaparecieron del espectro. Esto indica que las micelas estables con núcleos protegidos se formaron a partir de polímero de tres bloques en solución acuosa. Además, en el mismo espectro, la señal atribuida a la resonancia de los protones de los dos grupos metilo del DMAEMA (2,28 ppm) experimentaron una supresión significativa, lo que implica que sólo el segundo bloque de poli DMAEMA de la cubierta se expuso a agua, es decir, principalmente el grupo cargado de DMAEMA, así como todos los protones que constituyen PEGMA. Tomados en conjunto, los resultados de los experimentos RMN ¹H indican que el polímero tribloque forma micelas con una estructura de núcleo-cubierta ordenada donde el primero y segundo bloques forman una cubierta externa hidratada que rodea un núcleo compuesto de unidades hidrófobas (BMA) y unidades electrostáticamente estabilizadoras de carga opuesta (PAA, DMAEMA).

55 **EJEMPLO 5: DETERMINACIÓN POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DEL POLÍMERO TRIBLOQUE [PEGMA₇₀-MAA(NHS)₃₀] - [DMAEMA] - [[B₅₀-P₂₅-D₂₅]. (FIGURA 8).**

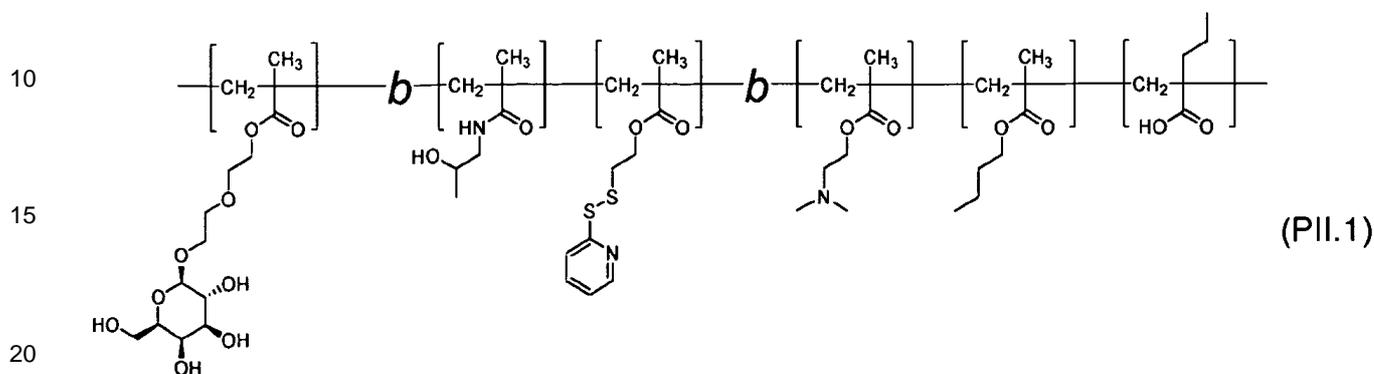
60 [0267] El siguiente ejemplo demuestra que el polímero de tres bloques forma partículas uniformes 54 nm de tamaño.

65 [0268] Los tamaños de partícula del polímero de tres bloques se midieron mediante dispersión dinámica de luz utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS. Las figuras 8A y 8B muestran la distribución de tamaño de partícula por intensidad y el volumen respectivamente. El polímero se midió en tampón fosfato salino, pH 7,4 (PBS) a 1 mg/ml. El polímero mostró tamaños de partículas con una distribución casi uniforme, PDI 0,130.

EJEMPLO 6. SÍNTESIS DE POLÍMEROS TRIBLOQUE: [GAL] - [HPMA₉₀ -PDSMA₁₀] - [D₂₅ - B₅₀ -P₂₅] Y [GAL₉₀-MAA₁₀] - [HPMA₈₀-PDSMA₁₀-MAA₁₀] - [D₂₅ -B₅₀ -P₂₅].

[0269] La estructura sintetizado se representa por las fórmulas (PII) y (PII.1):

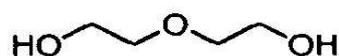
[Gal]_{4K} - [HPMA₉₀ -PDSMA₁₀]_{12,0K} - [D₂₅ -B₅₀ -P₂₅]_{30K} (PII)



EJEMPLO 6.1. SÍNTESIS DE MONÓMERO DE PEG2 VINILO

[0270] La síntesis se realiza tal como se describe por Tew et al. (Polymer, 2008, 49, 1761 -1769) con modificaciones, tal como se resume en el esquema 1.

Esquema 1

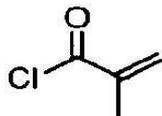


dietilenglicol

Fórmula química: $C_4H_{10}O_3$

Masa exacta: 106.1

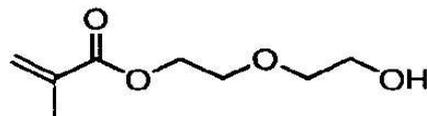
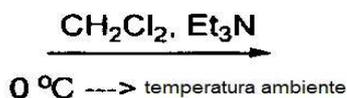
+



cloruro de metacriolo

Fórmula química: C_4H_5ClO

Masa exacta: 104.0



Fórmula química: $C_8H_{14}O_4$

Masa exacta: 174.1

50

Compuesto	PM (MW)	mmol	cantidad	misceláneo
Dietilenglicol	106,1	119,6	12,7 g, 11,35 ml	1,118 g/ml a 25°C (lit.)
Cloruro de metacriolo	104,5	95,7	10 g, 9,34 ml	1,07 g/ml a 25°C (lit.)
Trietilamina	101,2	119,6	21,2 g, 16,6 ml	0,726 g/ml a 25°C (lit.)
CH ₂ Cl ₂	84,93	-	350 ml	p.e. 39,8-40°C, p.f.: -97°C

[0271] Se añadió a un matraz de base redonda dietilenglicol (120 mmol) seguido de CH₂Cl₂ anhidro (330 ml), y trietilamina (120 mmol). Esta mezcla se agitó a 0°C durante 5 min bajo un flujo de gas argón. A un embudo de adición de 25 ml se añadió CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) y cloruro de metacriolo (9,3 mL, 96 mmol). A continuación, la solución de cloruro de metacriolo se añadió gota a gota a la solución de reacción enfriada durante 30 min. Después de completar la adición, la mezcla homogénea se agitó a 0°C durante 30 min y después se calentó hasta temperatura ambiente

durante 30 min. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (TLC) usando una fase estacionaria de SiO₂ con EtOAc y hexanos (4:6 v/v) como fase móvil (R_f del producto deseado = 0,2). Las placas de TLC se revelaron con ácido fosfomolibdico o se visualizaron con UV.

5 [0272] La mezcla de reacción de la noche se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (1 x 100 ml), a continuación se lavó con H₂O (2 x 100 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo.

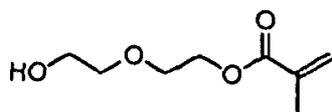
10 [0273] A continuación, el producto bruto se disolvió en CH₂Cl₂ (25 ml) y se purificó usando cromatografía en columna de SiO₂ usando una elución en gradiente isocrático con EtOAc y hexanos 4:6 v/v. Las fracciones se analizaron mediante TLC con el revelado con UV. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se evaporó para producir 4,54 g del producto (27%). La estructura correcta se verificó mediante espectroscopia RMN ¹H.

15 **EJEMPLO 6.2. SÍNTESIS DEL MONÓMERO GALACTOSA-OAc-PEG2 VINILO**

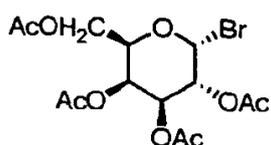
[0274] La síntesis se realizó tal como se describe por Ambrosi et al. (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2002, 45-52) con modificaciones, tal como se resume en el Esquema 2.

20 [0275] A un matraz de base redonda se añadieron tamices moleculares 3 Å (4,6 g, activados durante la noche a 150°C) seguido por monómero de PEG2 vinilo (preparado tal como se describe en el ejemplo 6.1) (3,83 g, 22,0 mmol) y CH₂Cl₂ anhidro (90 ml). Esta mezcla se agitó a -40°C durante 15 min. A continuación, se añadió bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (3,00 g, 7,33 mmol) a la mezcla de reacción seguido de trifluorometanosulfonato de plata (2,27 g, 8,83 mmol) y la solución se agitó a -40°C (± 5°C) bajo un flujo de argón durante 4 horas. La temperatura de la reacción se mantuvo a manualmente a -40°C (±5°C) utilizando una mezcla de hielo seco y acetona.

25 Esquema 2



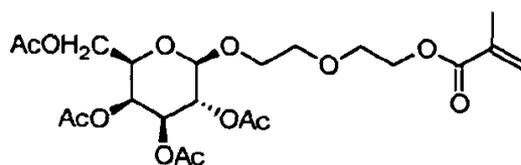
35 **Material de partida 1**
Fórmula química : C₈H₁₄O₄
Masa exacta : 174.1



40 **bromuro de alfa-D-galactopiranosilo**

Fórmula química : C₁₄H₁₉BrO₉
Masa exacta : 410.0

1.) AgOTf, CH₂Cl₂
tamices moleculares 3A
-40 °C, 4 h
2.) piridina, Ac₂O
temperatura ambiente, 24 h



Fórmula química : C₂₂H₃₂O₁₃
Masa exacta : 504.2

	Compuesto	PM(MW)	Mmol	Cantidad
Etapas 1	Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo	410,0	7,33	3,00 g
	Material de partida 1	174,1	22,0	3,83 g
	Trifluorometanosulfonato de plata	256,94	8,83	2,27
	Tamices moleculares de 3A	N/A	-	4,6
	CH ₂ Cl ₂	84,93	-	90 ml
Etapas 2:	Piridina	79,10	618	48,9 g, 50 ml
	Anhídrido acético	102,09	106	10,8 g, 10 ml

50 [0276] Después de agitar durante 4 h a -40°C la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente, se filtró a través de filtración por gravedad, a continuación las aguas madre se evaporaron proporcionando el producto bruto como

un aceite marrón. El aceite marrón se disolvió en piridina anhidra (50 ml, 618 mmol) y se trató con anhídrido acético (10 ml, 106 mmol). Esta mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1,0 hora para bloquear el alcohol sin reaccionar.

5 [0277] La mezcla de reacción se evaporó a continuación usando un evaporador rotatorio produciendo un líquido de color marrón. La mezcla condensada se disolvió en CH₂Cl₂ (300 ml) y se agitó vigorosamente con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (75 ml) en un matraz abierto a temperatura ambiente, neutralizando cualquier Ac₂O restante. La transferencia de la solución a un matraz cerrado se llevó a cabo después de hacer reaccionar todo el Ac₂O y no se generaron más gases (> 15 min de tiempo de reacción necesario para neutralizar el Ac₂O). Después de neutralizar todo el Ac₂O la solución se transfirió a un embudo de separación de 500 ml y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (1 x 100 ml) y todas las capas orgánicas se combinaron. A continuación, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (1 x 20 ml), se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó usando un evaporador rotatorio, proporcionando el producto bruto. La piridina residual se eliminó por evaporación a muy baja presión usando una bomba de vacío de aceite durante no más de 30 min antes de intentar la purificación. A continuación, el producto bruto se almacenó a -80°C durante la noche.

10 [0278] El producto bruto se disolvió entonces en CH₂Cl₂ (20 ml) y se purificó usando una cromatografía en columna de SiO₂ usando una elución isocrática con EtOAc y hexanos 4:6 v/v. Las fracciones se analizaron mediante TLC con revelado con UV. Las fracciones deseadas se combinaron y el disolvente se evaporó para proporcionar 1,6 g (43%). La estructura y la pureza se evaluaron mediante espectroscopia RMN ¹H.

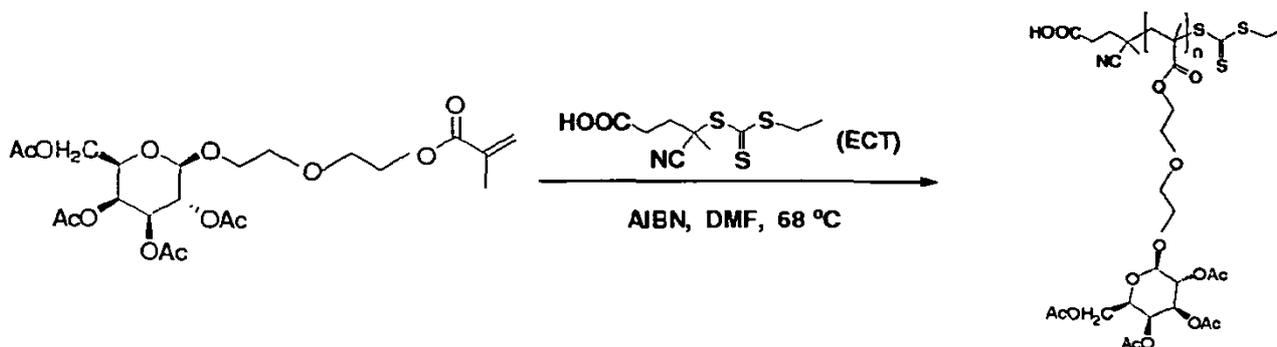
EJEMPLO 6.3. CONDICIONES ESTÁNDAR PARA EL ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL (GPC) DEL POLÍMERO.

25 [0279] Se llevaron a cabo todos los análisis GPC en un Viscotek GPC max equipado con UV/Vis, RI, viscosímetro y detectores de la dispersión de luz (RALS y LALS). Las muestras (100 ul, polímero de 0,1-0,3%) se desarrollaron en dos columnas Polargel-M (300 x 7,5 mm, Polymer Laboratories) en serie, eluyente DMF/1% LiBr, a 60°C, con un flujo de 0,75 ml/min. Las columnas de GPC se estandarizaron con las normas de PMMA Easi Vial (Polymer Laboratories).

30 **EJEMPLO 6.4. POLIMERIZACIÓN DE MONÓMERO DE GALACTOSA-OAC-PEG2 VINILO**

[0280] La síntesis se realizó tal como se describe en el Esquema 3, como sigue: el monómero de vinil galactosa obtenido en el Ejemplo 6.2 (1,5 g, 2,97 mmoles), ECT (19,6 g, 0,0744 mmoles), AIBN (0,31 mg, 0,00186 mmoles; CTA: AIBN 40:1) y DMF (0,99 ml) se introdujeron bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómero fue 3 M sin contar el volumen del monómero de galactosa. La solución resultante se desgasificó burbujando nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos. La solución resultante se colocó en un bloque de calor (Termómetro: 67-68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 350 rpm). Después de 5 h, la reacción se detuvo mediante la colocación del vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. El polímero resultante se purificó por diálisis frente a metanol durante 2 días utilizando una membrana de 2 kDa. El metanol se eliminó bajo atmósfera reducida y el polímero se secó bajo vacío durante al menos 6 horas.

Esquema 3



Nombre	FW (g/mol)	Equiv.	mol	Peso
Gal(OAc)Peg2MA	504,2	40	2,97 x 10 ⁻³	1,5 g
ECT	263,4	1	7,44 x 10 ⁻⁵	19,6 mg
AIBN	164,21	0,025	1,86 x 10 ⁻⁶	0,31 mg

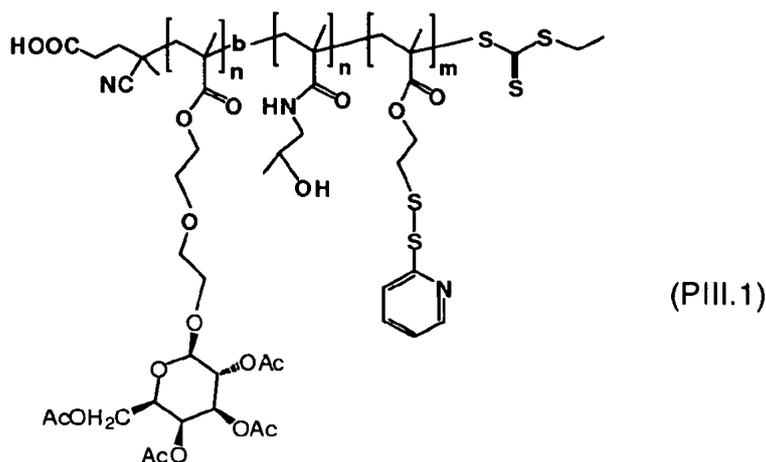
[Monómeros] = 3M; Purga con N₂: 30 min; temperatura = 68°C
 Tiempo de polimerización = 300 min

[0281] La caracterización del polímero se realizó por análisis GPC. La estructura y composición se verificaron por RMN ^1H (CDCl_3). $M_n = 5,8 \text{ kDa}$, $\text{PDI} = 1,14$, $dn/dc = 0,075$.

EJEMPLO 6.5. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DIBLOQUE POLI [GAL(OAc)PEG2] - [HPMA-PDSMA] (FÓRMULAS IV y IV.1) A PARTIR DE POLI[GAL(OAc)PEG2]

[0282]

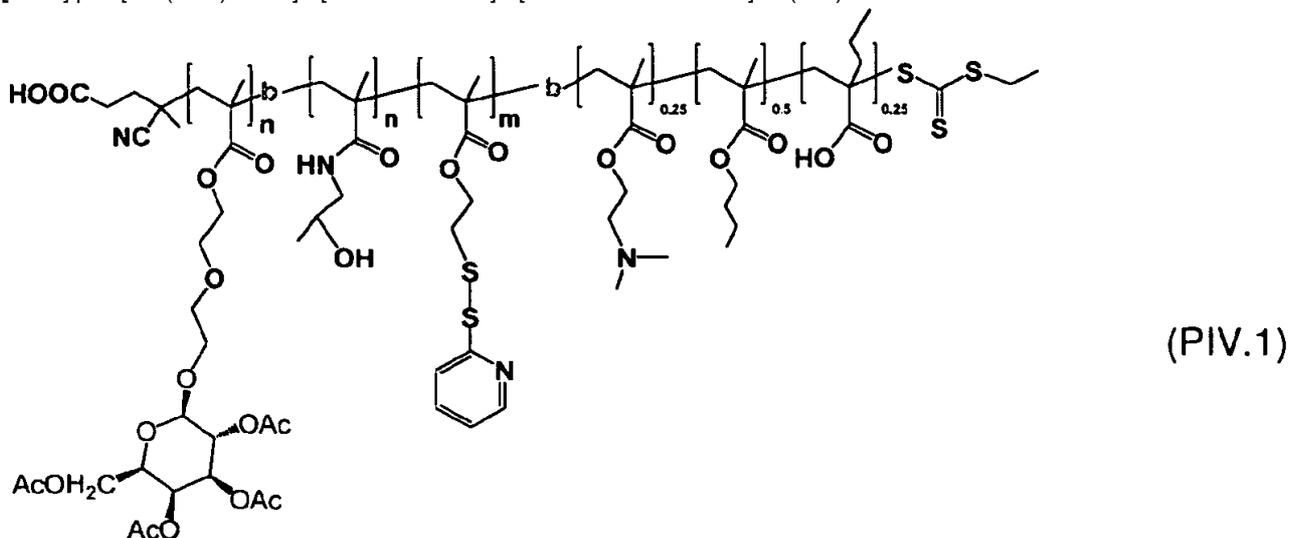
poli [Gal(OAc)PEG2] - [HPMA-PDSMA] (PIII)



[0283] A 0,0434 mmoles de poli [GAL(OAc)PEG2]-macroCTA se añadieron HPMA (0,860 g, 5,996 mmoles) y PDSMA (0,1332 g, 0,5216 mmoles), (CTA:Monómeros 1:150), AIBN (0,71 mg , 0,00434 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (2,62 ml) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómero fue de aproximadamente 2,5 M. La solución resultante se desgasificó burbujeando nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos. La solución resultante se colocó en un bloque de calor durante 4,5 horas (termómetro: 68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación 300 rpm). Después de 4,5 horas, la reacción se detuvo mediante la colocación del vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. El polímero resultante se purificó por diálisis frente a metanol durante 24 horas y a continuación se secó bajo vacío durante al menos 6 horas. La estructura del polímero se verificó por RMN ^1H (DMF-d7) y mediante GPC analítica para determinar el peso molecular del polímero y la polidispersidad: $M_n = 17,9 \text{ kDa}$, $\text{PDI} = 1,26$.

EJEMPLO 6.6. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO TRIBLOQUE POLI[GAL(OAc)PEG2]-[HPMA-PDSMA] - [DMAEMA-BMA-PAA] A PARTIR DEL POLÍMERO DIBLOQUE POLI[GAL(OAc)PEG2] - [HPMA-PDSMA] (PIV)

[0284] poli [Gal(OAc)PEG2] - [HPMA-PDSMA] - [DMAEMA-BMA-PAA] (PIV)

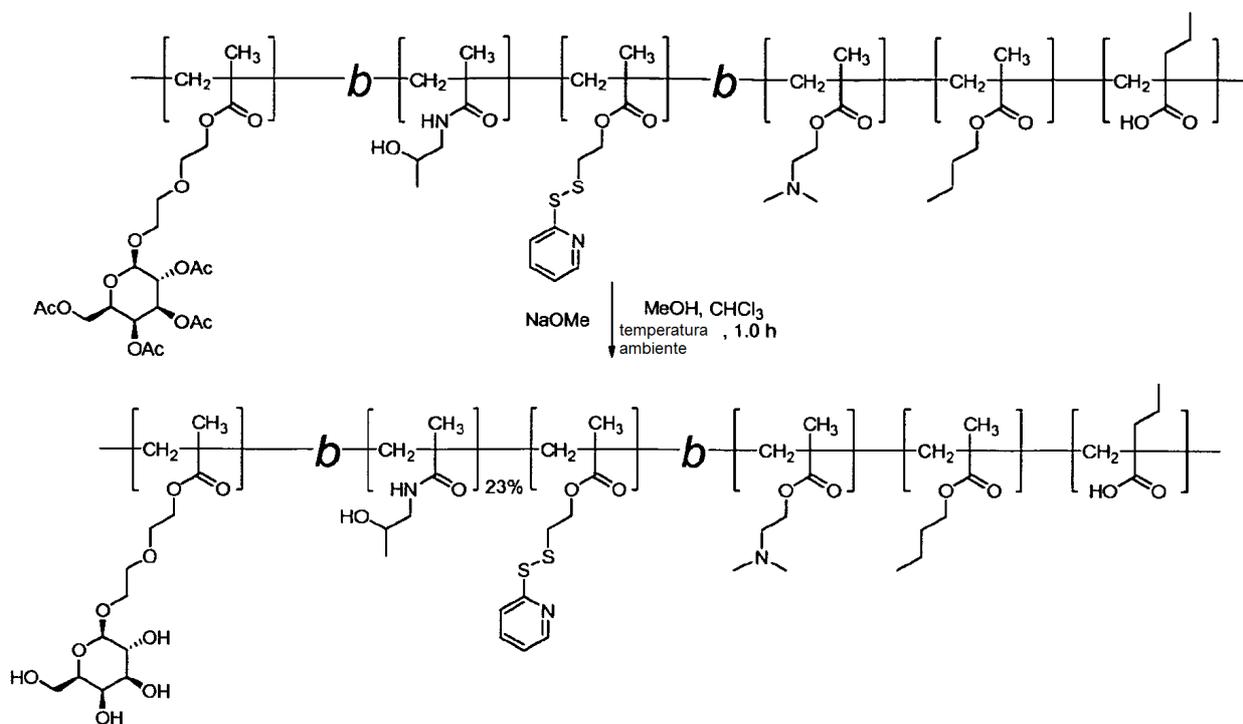


5 [0285] Se introdujeron BMA (0,88 g, 6,16 mmol), PAA (0,351 g, 3,075 mmol), DMAEMA (0,484 g, 3,075 mmol), MacroCTA de la etapa 6.5 (0,5073 g, 0,0284 mmol; CTA:Monómeros 1:434), AIBN (0,00284 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (2,22 ml) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómero fue de 3 M. La solución resultante se desgasificó burbujando nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos. La solución resultante se colocó en un bloque de calor durante 11 horas (Termómetro: 67- 68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación 350 rpm, asumiendo 50% de conversión). Después de 11 h, la reacción se detuvo mediante la colocación del vial en hielo y la exposición de la solución al aire. El polímero resultante se purificó por precipitación a partir de acetona/DMF 1:1 en hexano/éter 75/25 (tres veces). El polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 8 horas y se analizó por RMN ¹H (CDCl₃) para verificar la estructura correcta y mediante GPC analítica para determinar el peso molecular del polímero y la polidispersidad. Mn = 47 kDa, PDI = 1,7.

10 **EJEMPLO 6.7. DESPROTECCIÓN DEL POLÍMERO TRIBLOQUE PARA FORMAR EL POLÍMERO DEL EJEMPLO 6.6**

15 [0286] Las condiciones de reacción son como se describen por Ambrosi et al. (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2002, 45-52) con modificaciones, tal como se resume en el Esquema 4.

20 **Esquema 4**



50

Compuesto	PM (MW)	Umol	cantidad
Polímero			700 mg
Funcionalidad GAL			
Funcionalidad PDS			
Metóxido de sodio	54,02	1385	75 mg
MeOH	32,04		3,0 ml
CHCl ₃	119,38		1,5 ml
AcOH	60,05	693	40 ul
Disulfuro de 2,2'-piridilo	220,0	227	50 mg

[0287] En un matraz de base redonda de 50 ml se añadió el polímero del ejemplo 6.6 (680 mg, 4,334 μmol de polímero, 173 μmol de galactosa, 87 μmol de disulfuro de piridilo) seguido de metanol anhidro (3,0 ml), cloroformo anhidro (1,5 ml) y metóxido de sodio (74,8 mg, 1,386 μmol , 8 equivalentes con respecto a la galactosa). La mezcla resultante se agitó bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1,0 horas. A continuación, se añadió ácido acético glacial (39,7 μl , 693 μmol , 4 equivalentes con respecto a la galactosa) a la reacción seguido de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (49,5 mg, 225,2 μmol , 2 equivalentes con respecto a disulfuro de piridilo). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,0 horas bajo un flujo de gas argón.

[0288] Después de bloquear con disulfuro de 2,2'-dipiridilo durante 1,0 horas la reacción se diluyó con MeOH (5 ml) y se filtró a través de filtración por gravedad. La mezcla de reacción filtrada se transfirió a una membrana de diálisis con un corte de peso molecular de 2000 (Spectrum Labs, Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO:2.000) y se dializó contra MeOH (2 x 500 mL) durante 24 horas. Después de completar la diálisis el polímero se transfirió a un matraz de base redonda, y el disolvente se evaporó usando un evaporador rotatorio. El polímero resultante se analizó por RMN ^1H usando CD_3OD y DMF- d_7 para verificar la estructura correcta. El potencial zeta de una solución de polímero (40 mM) se midió en glucosa al 5%, Hepes 10 mM pH 7,4 y se determinó que era 5,31 mV (anchura = 5,25 mV, 46,4 kcps, Mob 0,42 $\mu\text{mcm/Vs}$, Cond 0,15 mS/cm).

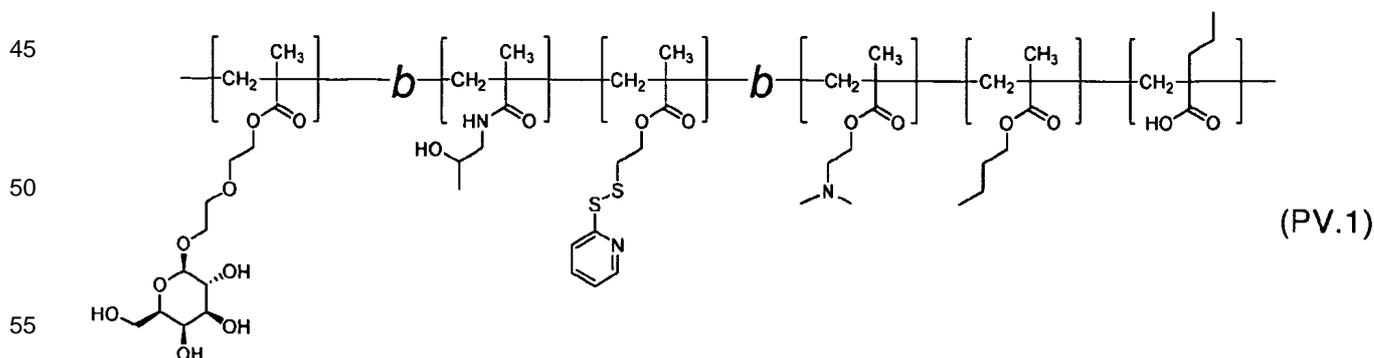
[0289] Dado que la funcionalidad del disulfuro de piridilo en el polímero era difícil de detectar por espectroscopia de RMN, esta funcionalidad se cuantificó mediante UV/Vis (Figura 26). El polímero final (100 mg) se disolvió en EtOH (1,0 ml) proporcionando una solución de polímero a una concentración de 100 mg/ml. Se trató una alícuota de esta solución de polímero (10 μl , 1,0 mg, 6,6 μmol) con una solución acuosa de ditioneitol 1,0 M (10 μl , 10,0 μmol , DTT) durante 10 min antes de diluirse con H_2O (80 μl) produciendo una solución de polímero reducida de 0,066 M. Dado que la incorporación esperada de disulfuro de piridilo debe ser del 2% en el polímero, se esperaba que la concentración del grupo saliente piridina-2-tiona debería ser de 1,33 mM (es decir, $0,066 \times 0,02 = 0,00133$ M) después de tratar el polímero con DTT tal como se describe anteriormente. Dado que la absorptividad molar de piridina-2-tiona a 343 nm es $\epsilon = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hermanson GT, Bioconjugate Techniques, 1996, 1ª ed. Academic Press, una impresión de Elsevier, página 66) y la longitud de paso del espectrómetro NanoDrop utilizado es de 0,1 cm, la absorción prevista para la solución de polímero reducido descrito anteriormente es $A = 1,075$. Tras el análisis de la solución de polímero reducido en UV/Vis, la absorción determinada experimentalmente era $A = 0,438$ a 343 nm. Esto demostró la presencia de la funcionalidad disulfuro de piridilo en el polímero con la concentración real de incorporación total de disulfuro de piridilo del 1% (valor calculado teóricamente era 2%).

[0290] Después de la diálisis el polímero se disolvió en EtOH absoluto a una concentración de 100 mg/ml y a continuación se usó directamente en reacciones de conjugación con siRNA. El cálculo del peso equivalente del polímero se determina basándose en el porcentaje de incorporación de monómero.

EJEMPLO 7. CONJUGACIÓN DE SIARNM A UN POLÍMERO TRIBLOQUE

[0291]

[Gal]_{4K} - [HPMA₉₀ - PDSMA₁₀]_{12,0K} - [D₂₅ - B₅₀ - P₂₅]_{30K} (PV)



EJEMPLO 7.1. PREPARACIÓN DE UNA CADENA DOBLE DE ARN ACTIVADA CONTRA GAPDH.

[0292] La preparación de siARN tiolado fue de la siguiente manera. A un tubo Falcon de 15 ml se añadió clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (1,0 mg, 3,5 μmol , TCEP) seguido de NaHCO_3 (1,2 mg, 14,0 μmol), H_2O (500 μl) y cadena doble de GAPDH-SSC₆OH (5,0 mg, 0,37 μmol , Agilent Technologies). Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, se añadió NaCl 5,0 M (20,0 μl) seguido por EtOH (5,0 ml) al 100% frío (-20°C). La mezcla se colocó en un refrigerador a -80°C durante 30 min para lograr la precipitación de ARN completa. El tubo Falcon se centrifugó a continuación para sedimentar el ARN. Las aguas madre se extrajeron y el sedimento de ARN restante se trituró usando

EtOH (1 x 1,0 ml) al 70% frío (+4°C). A continuación, el sedimento de ARN restante se disolvió en glucosa isotónica (5,0 ml, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) para producir una solución de ARN acuosa con una concentración de ARN en 0,7 ug/ul (por análisis UV).

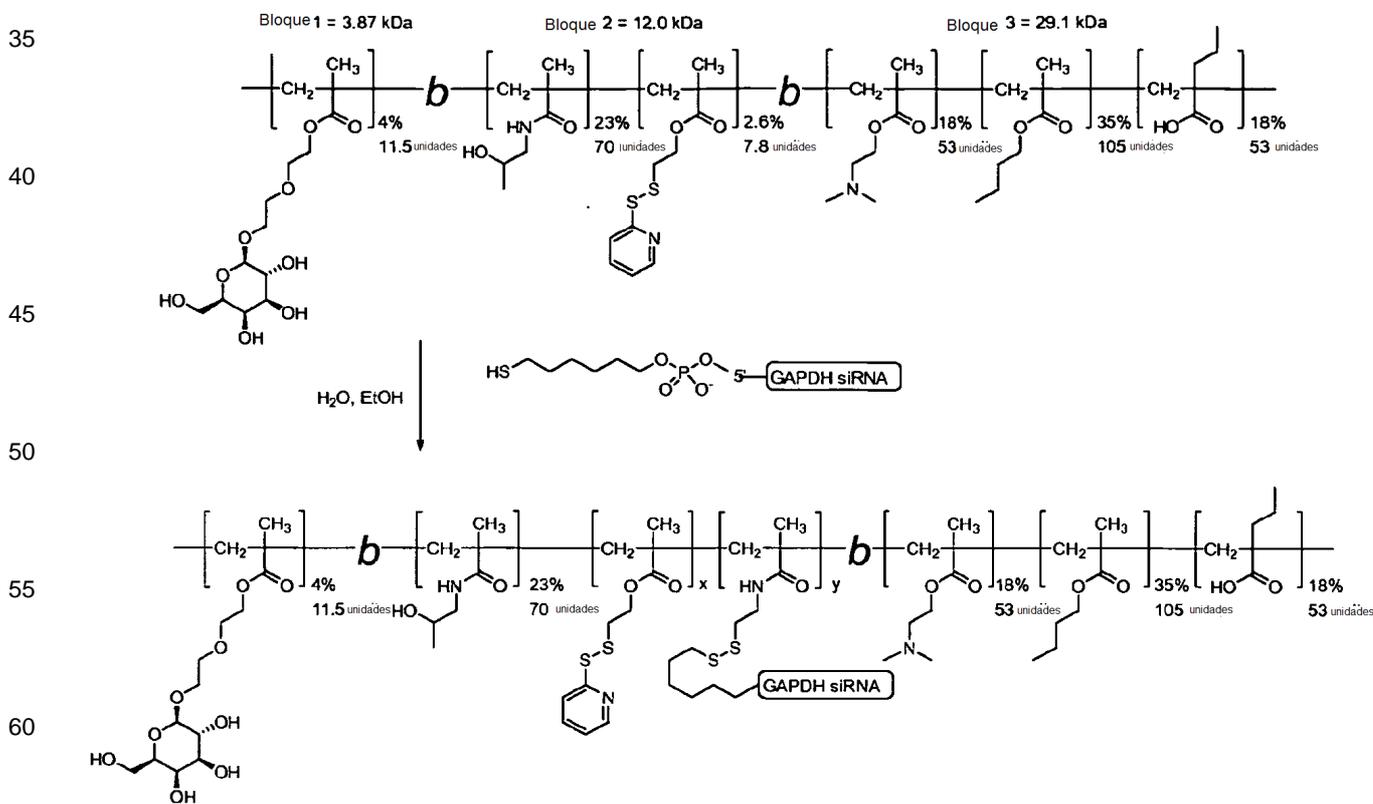
5 [0293] Mediante métodos similares también se preparó la siguiente cadena doble de ARN activada (contra ApoB).

EJEMPLO 7.2. CONJUGACIÓN DE UNA CADENA DOBLE DE ARN ACTIVA A UN POLÍMERO TRIBLOQUE (FÓRMULA P II) y POLÍMERO DIBLOQUE (FORMULA II SIN BLOQUE DE RECONOCIMIENTO DE GALACTOSA).

10 [0294] **Formulación 1.** El polímero (Fórmula PII) (500 mg) se disolvió en EtOH al 100% (5,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (34,69 ul, 22,9 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (300 uL, 300 ug ARN, 0,022 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2665,3 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo. Esto produjo una concentración de siARN prevista de 0,1 mg/ml y una concentración de polímero prevista de 1,16 mg/ml en la formulación.

20 [0295] **Formulación 2.** El polímero (Fórmula PII) (500 mg) se disolvió en EtOH al 100% (5,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (151,3 ul, 99,9 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (300 uL, 0,022 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2548,7 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo. Esto produjo una concentración de siARN prevista de 0,1 mg/ml y una concentración de polímero prevista de 5,04 mg/ml en la formulación. Se midió el potencial zeta del conjugado (40 mM (basado en polímero) en glucosa al 5%, Hepes 10 mM pH 7,4) y se determinó que era 1,2 mV (anchura = 5,71 mV, 100,6 kcps, Mob 0,09 umcm/Vs, Cond 0,15 mS/cm).

Esquema 5



[0296] Formulación 3. El polímero (Fórmula PII) (500 mg) se disolvió en EtOH al 100% (5,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (69,54 ul, 45,9 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (600 uL, 600 ug ARN, 0,044 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2330,5 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo. Esto produjo una concentración de siARN prevista de 0,2 mg/ml y una concentración de polímero prevista de 2,32 mg/ml en la formulación.

[0297] Formulación 4. El polímero (Fórmula PII) (500 mg) se disolvió en EtOH al 100% (5,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (295,6 ul, 195,1 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (600 uL, 600 ug ARN, 0,044 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2104,4 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo. Esto produjo una concentración de siARN prevista de 0,2 mg/ml y una concentración de polímero prevista de 9,85 mg/ml en la formulación.

[0298] Formulación 5. El polímero (Fórmula PII sin el bloque de galactosa) (200 mg) se disolvió en EtOH al 100% (2,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (126,5 ul, 88,15 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (300 uL, 0,022 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2573,5 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo

[0299] Formulación 6. El polímero (Fórmula PII sin el bloque de galactosa) (200 mg) se disolvió en EtOH al 100% (2,0 ml) proporcionando una solución que tiene la concentración de polímero de 100 mg/ml. Se transfirió una alícuota de la solución de polímero (59,78 ul, 41,7 umol) a un tubo Falcon de 15 ml. A la solución de polímero/EtOH se añadió de una sola vez una parte alícuota de una solución de glucosa isotónica de GAPDH ARN reducida (600 uL, 0,044 umol ARN, preparación de la solución descrita anteriormente). La mezcla de reacción se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante electroforesis en gel (descritas a continuación). Después de reaccionar durante la noche (aproximadamente 18 h) la solución se diluyó con glucosa isotónica (2340,2 uL, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo 3,0 ml total de una formulación lista para la prueba in vivo

[0300] Por métodos similares, se prepararon las siguientes formulaciones con cadena doble de ARN activada (ApoB) conjugada a un polímero tribloque (Fórmula PII) y el polímero dibloque (Fórmula PII sin el bloque de galactosa). Los polímeros se recogieron en EtOH a 100 mg/mL. Se disolvió la cadena doble de ARN activada en glucosa isotónica (5,0 ml, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) produciendo una solución acuosa de ARN con una concentración de ARN a 1,0 ug/ul (por análisis UV). Después de 16 h, se añadió glucosa isotónica adicional (5,0 ml, glucosa al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) a la mezcla para llevarla a un volumen final de 3,0 ml.

Grupos	Polímero	siARN	ug/formulación		Formulación final (ul de vol)
			siARN	Polímero	
1	Fórmula PII	ApoB	600	30000	900
2	Fórmula PII	ApoB	600	30000	900
3	Fórmula PII (sin gal)	ApoB	600	25979	859,8
4	Fórmula PII (sin gal)	ApoB	600	25979	859,8

EJEMPLO 7.3 ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL

[0301] Las reacciones de conjugación se analizaron por electroforesis en gel (20% poliacrilamida, 1 X gel TBE de Invitrogen, tampón 1XTBE durante aproximadamente 1 h a 200 V, teñido en 50 ml 1 X TBE con 2,5 ul de oro SYBR durante 15 minutos). Se extrajeron alícuotas de las muestras in vivo de 3,0 ml preparadas anteriormente y se preparó una serie de diluciones. Por ejemplo, la muestra (4,0 ul) se diluyó con tampón de carga de colorante azul (6,0 ul) produciendo una muestra con una concentración final de ARN de 0,04 ug/ul. A continuación, se aplicaron 4 ul de esta muestra diluida al gel. Del mismo modo, se trató la muestra (4,0 ul) con DTT (1,0 ul, solución 1,0 M) durante 10 minutos antes de diluirse adicionalmente con SDS al 2,5% (2,0 ul) y tampón de carga (3,0 ul) produciendo una muestra con una

concentración final de ARN de 0,04 ug/ul. A continuación también se aplicaron 4 ul de esta solución reducida al gel para el análisis.

5 **EJEMPLO 8. KNOCKDOWN DE ARNM IN VITRO EN CÉLULAS HEPG2 Y HELA CON SIARN CONJUGADO A UN POLÍMERO TRIBLOQUE (FORMULA PII).**

EJEMPLO 8.1. PROCEDIMIENTO DE TRANSFECCIÓN GENERAL Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD KNOCKDOWN.

10 **[0302]** Las células se adquirieron de ATCC (Manassas, VA), a menos que se indique lo contrario, y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del distribuidor. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo y se dejaron adherirse durante la noche en medio MEM con 10% de FBS (100 ul). Las muestras de transfección se diluyeron hasta un volumen final de 25 ul con ITG (glucos al 5,05% en peso, HEPES 10 mM, pH 7,4) o PBS, y se añadieron a las células (volumen final de 125 ul). Después de 24 horas, se evaluó el grado de reducción de ARNm de GAPDH o ApoB mediado por siARN. El medio se extrajo y las células se lavaron con PBS. Se realizó una RT-PCR de dos etapas directamente a partir de los pocillos del cultivo celular usando el kit de Fast SYBR Green Cells-to-Ct (Ambion). Se realizó un PCR a tiempo real con el Sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus utilizando cebadores para SYBR Green PCR; GAPDH y gen normalizador interno RPL13A. Las reacciones (20 ul total) consistieron en 10 ul de 2X Mezcla madre de Fast SYBR Green PCR, 1 ul de cebadores y 9 ul de ADNc diluido 1:4 en agua libre de nucleasa. Se utilizaron los siguientes parámetros de PCR: 95°C durante 20 s, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 3 s y 60°C durante 30 s. Se utilizó un análisis del ciclo umbral (CT) para cuantificar GAPDH, normalizado a RPL13A y en relación a la expresión de las células no tratadas. Para el knockdown de ApoB, las células se trataron como se ha descrito previamente.

25 **EJEMPLO 8.2: BIODISTRIBUCIÓN IN VIVO Y KNOCKDOWN DE ARNM EN CÉLULAS DE HÍGADO CON SIARN CONJUGADO A UN POLÍMERO TRIBLOQUE (FÓRMULA PII) MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN IV CON INYECCIÓN EN VENA DE COLA A RATONES.**

EJEMPLO 8.3 PROCEDIMIENTO GENERAL.

30 **[0303]** Se dosificaron ratones hembra Balb/C de 7-9 semanas de edad (Charles River Laboratories) con formulaciones de siARN-polímero a través de la vena de la cola en un volumen de dosificación de 0,01 ml/g, n = 5 por grupo. Las secuencias de siARN para ApoB y GAPDH fueron como se muestra a continuación.

35 **[0304]** Las secuencias de ARN:

Gen	cadena sentido:	cadena antisentido
GAPDH	5'-HO-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ -rGrGrU rCrArU rCrCrA rUrGrA rCrArA rCrUrU rUdTdT-3' [SEQ ID NO:1]	5'-rArArA rGrUrU rGrUrC rArUrG rGrArU rGrArC rCdTdT-3' [SEQ ID NO:2]
ApoB	5' OH-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ - rGmUrCrAmUrCrArCrArCmUrGrArAmUra rCrCrArAmU-3' [SEQ ID NO:3]	5'- rArUrUrGrGrUrArUrUrCrArGrUrGrUrGrArUrGrAr CrArC-3' [SEQ ID NO:4]
m =2'-O-metil modificado , r =ribonucleótido, d = desoxinucleótido		

5 **[0305]** 18-48 horas después de la dosis los animales fueron sacrificados. La sangre se recogió mediante punción cardíaca para el aislamiento del suero para el análisis químico de la sangre. El tejido hepático fue aislado (2/3 inferior de lóbulo izquierdo), se colocó en RNAlater (Ambion), y se cortó en pequeños trozos para mejorar la penetración en el tejido. Se aisló ARN de ~50 mg de tejido hepático utilizando el MagMax -96 para el kit de aislamiento de ARN total en microarrays (AMBion). El ARN se convirtió en ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ARNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se realizó una PCR a tiempo real SYBR Green para examinar los niveles de ARNm para genes diana de siARN ApoB y GAPDH, así como normalizar los genes calnexina 1 y Hprt1 (las secuencias de cebadores se muestran a continuación).

Secuencias de cebadores:

Nombre	Química	Cebador directo:	Cebador inverso:
GAPDH	SYBR	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3' [SEQ ID NO:5]	5'-ATGCCTGCTTCACCACCTTCT-3' [SEQ ID NO:6]
Hprt1	SYBR	5'-CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA-3' [SEQ ID NO:7]	5'-CCACAGGACTAGAACACCTGCT-3' [SEQ ID NO:8]
Calnexina	SYBR	5'-ATGGAAGGGAAGTGGTTACTGT-3' [SEQ ID NO:9]	5'-GCTTTGTAGGTGACCTTTGGAG-3' [SEQ ID NO:10]
ApoB	SYBR	5'-AAGCACCTCCGAAAGTACGTG-3' [SEQ ID NO:11]	5'-CTCCAGCTCTACCTTACAGTTGA-3' [SEQ ID NO:12]

10

[0306] Se utilizó software Step One v2.1 (Applied Biosystems) para normalizar los genes diana a ambos genes normalizadores. Se agrupó una parte alícuota de ADNc de cada muestra de control de tampón y se utilizó para comparar con cada muestra tratada. Además, cada muestra de control de tampón se comparó con las muestras de tampón agrupadas. El análisis químico de sangre se realizó en Laboratorio Central de Phoenix (Everett, WA) en muestras de sangre tomadas 48 horas después de la dosis.

15

[0307] Para los estudios de biodistribución/PK para detectar siARN a través de un ensayo de hibridación, se realizó lo siguiente. Se dosificaron ratones Balb/C de 7-9 semanas de edad con cualquiera de las formulaciones de polímero de siARN de GAPDH o ApoB a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados después de 1 hora de la dosis. La sangre se recogió mediante punción cardíaca, se dejó coagular a temperatura ambiente, se centrifugó para recoger el suero, y después se almacenó en hielo o a -20°C para su posterior análisis. Además de la sangre, se recogieron los tejidos del hígado, bazo, riñón y pulmón para su análisis. Se pesó una pieza de ~50 mg de tejido y se colocó en un tubo de homogeneización que contenía ~1 ml de tampón de homogeneización de tejido (isotiocianato de guanidinio 3M/EDTA 10 mM/Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,5 M) para conseguir una concentración final de tejido de 50 mg/ml. Los tejidos se homogeneizaron usando un homogeneizador FastPrep24 (MP Biomedicals), 3 veces, 20 segundos cada vez, con 3 minutos de descanso entre cada realización. Las muestras se colocaron en hielo durante 5 minutos, seguido por centrifugación durante 5 minutos a 12.000 rpm. Se transfirió una alícuota de homogeneizado de tejido a una placa de 96 pocillos y se almacenó en hielo o a -20°C para su posterior análisis. Para medir los niveles de siARN en las muestras de sangre y tejidos, se incubaron placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina con oligo de captura, un oligo biotinilado que es complementario a 9 nucleótidos de la cadena antisentido de siARN. El oligo de captura se diluyó hasta 250 nM en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, se añadieron 100 ul/pocillo a cada placa y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas. Se prepararon una curva estándar de siARN de 0,293 ng/ml a 300 ng/ml (11 diluciones en serie de dos veces a partir de 300 ng/ml), así como diluciones de muestras de suero y de tejido, en tampón de dilución: isotiocianato de guanidinio 1 M/EDTA 10 mM/Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,5 Ml. Estas muestras se calentaron hasta 90°C durante 10 minutos. Mientras tanto, la placa recubierta con sonda de captura se lavó 2 veces con tampón de lavado: NaCl 1 M, Tris 0,1 M pH 9,0, MgCl₂ 2 mM, Tween 20 al 1%. Se añadieron a las placas 50 ul/pocillo de un oligo informador marcado con fluoresceína, complementario para los restantes 11 nucleótidos de la cadena antisentido diluida a 0,1 uM en tampón de dilución. Trabajando muy rápidamente, se añadieron 50 ul/pocillo de patrones de siARN y muestras de tejidos diluidas de la incubación a 90°C por duplicado a placas que contenían oligos marcados con fluoresceína. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el contenido de la placa y las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul/pocillo de Fab anti-fluoresceína marcado con HRP (Roche) diluido a 15 mU/ml en PBS. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas y después se lavaron 5 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul/pocillo de sustrato de TMB y se incubaron durante 10 minutos en la oscuridad. Se añaden 100 ul/pocillo de solución de parada (ácido fosfórico 1M). Las placas se leyeron a DO 450 nm. Las lecturas se representaron como ng siARN/mg de tejido donde la concentración de siARN en los tejidos se determina como ng siARN/ml a partir de la curva estándar. Estos valores se dividieron entonces por la concentración de tejido 50 mg/ml de solución de partida.

45

EJEMPLO 8.4. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y KNOCKDOWN DE GAPDH/APOB DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN EN VENA DE COLA A RATONES DE UN COMPLEJO DE SIARN CONJUGADO A UN POLÍMERO TRIBLOQUE (FORMULA PII).

5 [0308] Los complejos se administraron a ratones por inyección en la vena de la cola tal como se describe anteriormente.

Protocolo	Estudios de biodistribución y knockdown de GAPDH/ApoB después de la administración en vena de cola a ratones de un complejo de siARN conjugado a un polímero tribloque (fórmula PII)
Objetivo	Knockdown de GAPDH y estudio de biodistribución que ensayan conjugados de siARN con polímeros HPMA/PDSMA-HB +/- galactosa
Animales	Ratones Balb/c, hembras
Edad	7-8 semanas
Volumen de la dosis	0,2 ml por 20 g de ratón: 10 mg/kg
Vía	i.v.
Tejidos recogidos para biodistribución	Hígado, pulmón, bazo, suero 1 hora después de la dosis
Tejidos recogidos para KD	Hígado y pulmón en el día 2 después de la dosis
Dosificación:	Dosis en ratones una vez

[0309] Los estudios de biodistribución se realizaron tal como se describió anteriormente. Los ensayos de knockdown se realizaron tal como se describió anteriormente.

10

EJEMPLO 8.5. KNOCKDOWN DE GAPDH/APOB DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN EN VENA DE COLA A RATONES DE UN COMPLEJO DE SIARN CONJUGADO A POLÍMEROS TRIBLOQUE.

15

[0310] Se prepararon complejos de siARN conjugados a polímeros tribloque tal como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 7.2). Los conjugados de polímeros tribloque con siARN resultantes fueron administrados a los ratones por inyección en la vena de la cola tal como se describió anteriormente, en el marco del protocolo de estudio indicado. A las 24-48 horas después de la dosis, los animales se sacrificaron y se determinaron los niveles de ARNm tal como se detalla anteriormente en el Ejemplo 8.3.

Protocolo	Knockdown de GAPDH y ApoB y estudio de biodistribución que ensaya conjugados de siARN con polímeros tribloque o polímeros de control
Animales	Ratones Balb/c o ratones C57 negros, hembras
Edad	7-8 semanas
Volumen de la dosis	0,2 ml por 20 g de ratón: 10 mg/kg
Vía	i.v.
Tejidos recogidos para biodistribución	Hígado, pulmón, bazo, suero 1 hora después de la dosis
Tejidos recogidos para KD	Hígado en el día 2 después de la dosis
Dosificación:	Dosis en ratones una vez para cada formulación

20

Los resultados de estos conjugados polímero tribloque - siARN en los estudios de actividad knockdown in vivo aparecen en la siguiente tabla.

25

Actividad knockdown in vivo de conjugado de polímero tribloque-siARN

Estructura	polímero mg/kg	siARN mg/kg	punto de tiempo de recogida	Nota especial	siARN	ARNm de ApoB		ARNm de GADPH	
						niveles relativos de ARNm	DS	niveles relativos de ARNm	DS
[Nag-OH(Peg3)] _{15.2kDa} -[HPMA ₉₂ -PDSMA ₈] _{10.1kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{12.1kDa}	38.7	1.0	48	b		0.72	0.12	0.91	0.18
	38.7	1.0	48		ApoB	1.02	0.13	1.37	0.22
	38.7	1.0	48		ApoB	0.74	0.17		
	77.7	2.0	48		ApoB	1.07	0.14		
	122	2.0	24		ApoB	0.49	0.08	0.90	0.02
[Nag-OH(Peg3)] _{15.2kDa} -[OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂] _{10.7kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{23.0kDa}	5	1.0	48		ApoB	1.09	0.10	1.27	0.20
	5	2.0	48		ApoB	1.14	0.22	1.34	0.18
	10	2.0	48		ApoB	1.00	0.16		
[HPMA-PDSMA] _{12.7kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{15.3kDa}	42	1.0	48		GAPDH			1.01	0.18
	20	2.0	48		GAPDH			1.10	0.17
	93	2.0	24		ApoB	0.80	0.16	1.38	0.13
[Nag-OH(Peg3)] _{15.2kDa} -[OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂] _{10.7kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{23.0kDa}	10	2.0	48		ApoB	1.14	0.10		
[GAL-OH(PEG1)] _{7.05kDa} -[HPMA ₉₀ -PDSMA ₁₀] _{7.1kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{23.3kDa}	123	2.0	24		ApoB	0.23	0.06	0.90	0.10
	62	1.0	24		ApoB	0.51	0.10	0.88	0.10
	31	0.5	24		ApoB	0.67	0.04	0.89	0.08
	124	2.0	24	a	ApoB	0.41	0.14	1.32	0.20
	124	2.0	24		ApoB	0.27	0.06	1.23	0.37
	80	1.5	24		ApoB	0.63	0.20	0.97	0.22
	50	0.9	24		ApoB	1.02	0.15	1.01	0.15
	63	1.0	24		ApoB	0.48	0.10	0.89	0.10

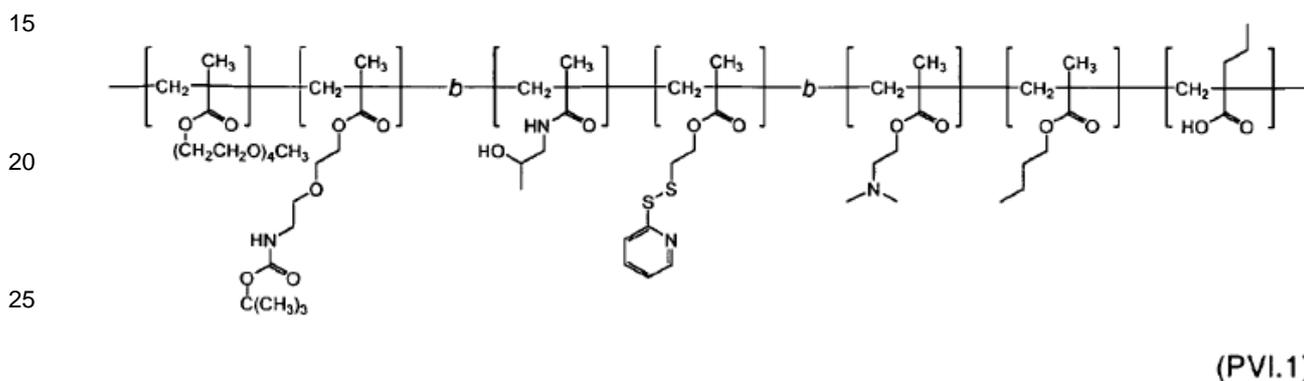
Estructura	polimero mg/kg	siARN mg/kg	punto de tiempo de recogida	nota especial	siARN	ARNm de ApoB		ARNm deGADPH	
						niveles relativos de ARNm	DS	niveles relativos de ARNm	DS
	126	2.0	24	a	ApoB	0.30	0.05	0.84	0.10
	126	2.0	24		ApoB	0.19	0.06	0.94	0.06
	80	1.5	24		ApoB	0.93	0.14	1.04	0.22
	50	0.9	24		ApoB	1.01	0.09	1.12	0.12
[GAL-OH(PEG2)] _{3,9} KDa-[HPMA ₉₀ -PDSMA ₁₀] _{12,0} KDa-[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{29,1} KDa	98	2.0	48		GAPDH			0.45	0.06
	50	1.0	48		GAPDH			0.72	0.11
	100	2.0	48		ApoB	0.28	0.14	1.19	0.17
	100	2.0	24		ApoB	0.40	0.24	1.38	0.24
	100	1.7	24		ApoB	1.11	0.02	1.77	0.02
	75	7.2	24		ApoB	0.57	0.04	1.59	0.14
	50	0.8	24		ApoB	0.92	0.08	1.24	0.14
	25	0.4	24		ApoB	1.36	0.10	1.37	0.10
[Nag-OH(PEG2)] _{24,7} KDa-[HPMA ₉₀ -PDSMA ₁₀] _{14,0} KDa-[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{30,0} KDa	130	2.0	48		ApoB	0.70	0.13	1.17	0.08
[GALOH(PEG3)] _{3,2} KDa	60	1.0	24		ApoB	0.59	0.07	1.22	0.10
D _a -[HPMA-PDSMA] _{11,4} KDa-[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] ₂₆ KDa									
	75	1.4	24		ApoB	0.79	0.06	0.85	0.14
	100	1.6	24		ApoB	0.52	0.16	0.62	0.14
	80	0.8	24		ApoB	0.60	0.14	0.66	0.10
[Nag-OH(PEG1)] _{6,0} KDa-[HPMA ₉₀ -PDSMA ₁₀] _{12,8} KDa-[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{25,2} KDa	100	1.9	24		ApoB	0.42	0.08	0.73	0.16
	80	1.0	24		ApoB	0.70	0.14	0.96	0.20

Estructura	polimero mg/kg	siARN mg/kg	punto de tiempo de recogida	Nota especial	siARN	ARNm de ApoB		ARNm de GADPH	
						niveles relativos de ARNm	DS	niveles relativos de ARNm	DS
[Nag-OH (PEG3) ₈₀ -MAA ₂₀] _{7.5kDa} - [HPMA ₈₀ -PDSMA ₁₀ -MAA ₁₀] _{9.5kDa} -[D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{24.2kDa}	100 75	1.7 1.3	24 24		ApoB ApoB	0.48 0.95	0.28 0.14	0.92 1.05	0.18 0.12
[GALOH(PEG1)] _{4.7kDa} -[HPMA-PDSMA] _{9.6kDa} - [D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{30kDa}	100 80	1.5 0.8	24 24		ApoB ApoB	0.76 0.71	0.06 0.12	0.67 0.85	0.06 0.18
[GALOH(PEG3)] _{5.3kDa} -[HPMA - PDSMA] _{8.3kDa} [D ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{23kDa}	100 80	1.9 1.0	24 24		ApoB ApoB	0.54 0.91	0.08 0.10	1.10 0.76	0.16 0.08
[GAL-OH(PEG1)] _{5.5kDa} -[HPMA-E ₉₀ -PDSMA] ₁₀] _{14kDa} - [imidazole] ₂₅ -B ₅₀ -P ₂₅] _{20kDa}	100 50 75 50	1.7 0.8 1.0 0.7	24 24 24 24		ApoB ApoB ApoB ApoB	0.86 0.98 0.88 0.87	0.30 0.04 0.14 0.22	0.99 0.99 1.18 1.12	0.06 0.22 0.15 0.18

Notas: a: formulación almacenada a 4°C durante 7 días antes de la administración. b: inyección a ratones negros C57

Ejemplo 9 Síntesis de polímero tribloque [PEGMA_x-BPAM_y] - [HPMA₉₀-PDSMA₁₀] - [D₂₅-B₅₀-P₂₅] y la conjugación posterior a la polimerización con ligando de folato de reconocimiento y siARN

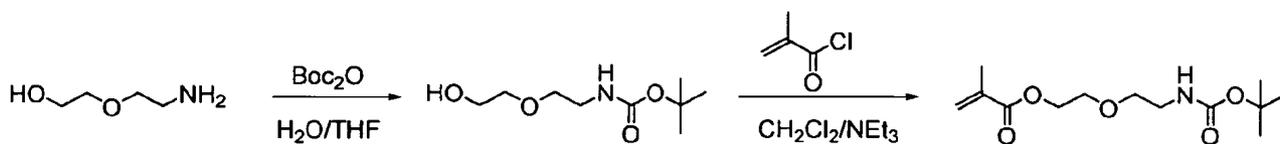
[0312] Se describe un método para incorporar ligandos de moléculas pequeñas (por ejemplo, folato) en polímeros de tres bloques que reconocen receptores específicos de la superficie celular. El primer bloque de copolímero contiene una amina reactiva (polimerizada en su forma protegida con Boc, designada como BPAm) y, opcionalmente, un segundo monómero hidrófilo (por ejemplo, PEGMA o HPMA). Después de la síntesis polimérica, el grupo protector Boc se elimina dando lugar a una amina que puede hacerse reaccionar con la molécula pequeña activada que reconoce el agente para formar un conjugado estable. El % en moles de BPAm (Y) y el% en moles del segundo monómero hidrófilo (X) en el polímero, así como el tamaño de bloque (Mn1) se pueden variar para lograr la valencia más efectiva de la molécula de reconocimiento para optimizar eficacia del reconocimiento. La estructura sintetizada se representa por las fórmulas VII y VII.1



Ejemplo 9.1 Síntesis de monómero de amina vinilo protegido con BOC.

[0313]

Esquema 6



[0314] La síntesis se representa en el Esquema 6. A una solución de la amina (10,51 g, 100 mmol) en una mezcla de 100 ml de agua y 1 ml de una solución saturada de NaHCO₃, se añade una solución de anhídrido de Boc (22,94 g, 105 mmol) en 200 ml de THF. La mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla, se añaden 100 mL de solución saturada de NaHCO₃ y 400 ml de EtOAc. La capa orgánica se lava con NaHCO₃ saturada, agua, a continuación se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora. El residuo se seca a vacío para dar el producto bruto como un aceite claro. El compuesto se usa en la siguiente etapa sin purificación.

[0315] El producto bruto de la etapa 1 (19,80 g, 96,5 mmol) y trietilamina (16,1 ml, 115 mmol) se disuelven en diclorometano anhidro (180 ml), la solución se enfría hasta 0°C, y se añade lentamente cloruro de metacrililo (11,2 ml, 115 mmol) mediante una jeringa a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se deja calentar gradualmente hasta temperatura ambiente y se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la reacción se diluye con una solución saturada de NaHCO₃ (150 ml) y diclorometano (150 ml). La capa orgánica se separa, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora al vacío. El producto se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter/hexano: 1/1). Las fracciones que contienen el producto se combinan y se evaporan (Rf 0,35). RMN ¹H y TLC pueden mostrar una pequeña impureza (aproximadamente 2-3%). El compuesto se purifica sobre gel de sílice (EtOAc/hexanos 1/3). Después de la evaporación de las fracciones que contienen producto y el secado, se obtiene un aceite incoloro transparente. El producto se almacena en el aire en un frasco herméticamente tapado a -20°C. La estructura se confirma por RMN ¹H (dmsó-d₆).

EJEMPLO 9.2: SÍNTESIS DE [PEGMA_x-BPAM_y] - CTA

[0316] El primer bloque del polímero tribloque se sintetiza y se purifica como se describe en el Ejemplo 1. Las relaciones de alimentación de los monómeros de vinilo para PEGMA y BPAm se seleccionan para reflejar aproximadamente la composición deseada. Por ejemplo, una relación de alimentación de 50:50 o 80:20 puede dar un % en moles relativo de aproximadamente 50% PEGMA y 50% BPAm o 80% PEGMA y 20% BPAm, respectivamente, para monómeros de reactividad molecular similar. El ajuste de las composiciones molares deseadas se determina experimentalmente. El peso molecular del primer bloque se puede ajustar a aproximadamente 5-15 Kdaltons dependiendo de la valencia deseada del ligando de reconocimiento y se determina experimentalmente. La estructura se confirma por RMN ¹H (dmsO-d6).

EJEMPLO 9.2 SÍNTESIS DE [PEGMA_x-BPAM_y]-[HPMA-PDSMA]-CTA

[0317] El segundo bloque del polímero tribloque se sintetiza y caracteriza tal como se describe en el Ejemplo 6.5, incluyendo [PEGMA_x-BPAM_y]-CTA sintetizado tal como se describe en el Ejemplo 9.1. Habitualmente, la composición molar es 90% HPMA y 10% PDSMA producida mediante el ajuste de las relaciones de alimentación de los monómeros de vinilo en la reacción de polimerización consiguiente. Los pesos moleculares del segundo bloque son habitualmente entre 5-10 kDa. La estructura se confirma por RMN ¹H (dmsO-d6).

EJEMPLO 9.3: SÍNTESIS DE [PEGMA_x-BPAM_y]-[HPMA₉₀-PDSMA₁₀]-[D₂₅-B₅₀-P₂₅]

[0318] El tercer bloque del polímero tribloque se sintetiza y purifica tal como se describe en el Ejemplo 6.6, incluyendo [PEGMA_x-BPAM_y]-[HPMA-PDSMA]-CTA en la reacción de polimerización como macro-CTA, sintetizado tal como se describe en el Ejemplo 9.2. Habitualmente, la composición molar es 25% DMAEMA, 50% BMA y 25% PAA producida mediante el ajuste de las relaciones de alimentación de los monómeros de vinilo en la reacción de polimerización consiguiente. Los pesos moleculares del tercer bloque son habitualmente entre 20-40 kDa. La estructura se confirma por (1) H RMN ¹H (dmsO-d6).

EJEMPLO 9.4: DESPROTECCIÓN DEL GRUPO BOC DEL POLÍMERO DE TRIBLOQUE

[0319] Antes de hacer reaccionar el bloque de reconocimiento del polímero tribloque con el ligando de reconocimiento activado, se extrae el grupo protector BOC para generar las aminas primarias reactivas. Después de la etapa de diálisis y evaporación (tal como se describe en el Ejemplo 6.6) se añade TFA puro bajo N₂ y la reacción de desprotección se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por precipitación con éter. La estructura se confirma mediante RMN ¹H (dmsO-d6).

EJEMPLO 9.5: CONJUGACIÓN DEL LIGANDO FOLATO DE RECONOCIMIENTO AL PRIMER BLOQUE DEL POLÍMERO TRIBLOQUE PARA PRODUCIR [PEGMA_x-MA(FOLATO)_y]-[HPMA₉₀-PDSMA₁₀]-[D₂₅-B₅₀-P₂₅]

[0320] El folato se acopla a través de su ácido carboxílico γ a una unidad espaciadora, H₂NCH₂CH₂OCH₂CH₂NHBoc utilizando un procedimiento de carbodiimida. El ácido fólico (Sigma) se disuelve en sulfóxido de dimetilo. A la solución resultante se añade 1 a 3 veces el exceso molar de dicitlohexilcarbodiimida (DCC) y 5 equivalentes molares de N-hidroxisuccinimida, y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. El compuesto de folato-NHS activado se aísla por precipitación con éter dietílico seguido de lavado con éter dietílico y acetona. El compuesto aislado se seca bajo vacío y se confirma la estructura mediante RMN ¹H. El nivel de activación de γ-carboxilato a α-carboxilato es aproximadamente 3:1.

[0321] Al compuesto de folato-NHS activado en dimetil sulfóxido se añade de 1 a 2 veces el exceso molar de H₂NCH₂CH₂OCH₂CH₂NHBoc, junto con 1 equivalente de trietilamina. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. El folato modificado con Bocamina se aísla por precipitación con éter dietílico seguido de lavado con éter dietílico. El compuesto aislado se seca bajo vacío y se confirma la estructura mediante RMN ¹H.

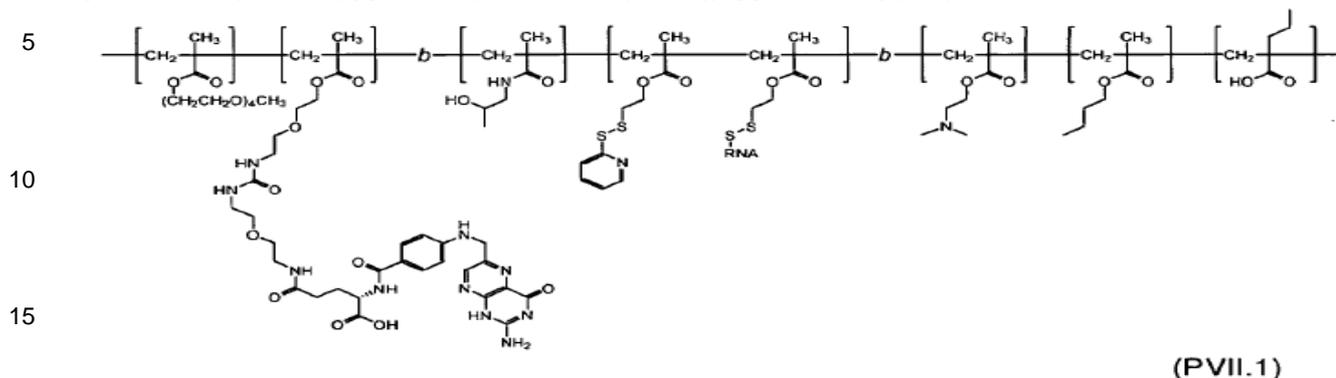
[0322] Antes de hacer reaccionar el derivado de ácido fólico con el polímero, se extrae el grupo protector Boc para generar la amina primaria reactiva en el derivado de ácido fólico tal como se describe en el Ejemplo 9.4. El folato modificado con amina se aísla por precipitación con éter dietílico seguido de lavado con éter dietílico. El compuesto aislado se seca bajo vacío y se confirma la estructura por mediante RMN ¹H.

[0323] Se añade 10 veces el exceso molar de carbonil diimidazol (CDI) al folato modificado con amina en dimetilsulfóxido y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. La imidazol urea derivada de folato resultante se aísla por precipitación con éter dietílico seguido de lavado con éter dietílico, para eliminar el CDI sin reaccionar e imidazol. A continuación se mezcla 5 veces el exceso molar de imidazol urea con el polímero desprotegido (sección 9.4) en dimetilsulfóxido. Después de 16 horas a temperatura ambiente, el producto se aísla por liofilización después de diálisis frente a agua (membrana de diálisis MWCO 2000). La estructura del polímero de tres bloques que contiene folato se confirma mediante RMN ¹H.

EJEMPLO 9.6: CONJUGACIÓN DE SIARN AL SEGUNDO BLOQUE DEL POLÍMERO TRIBLOQUE PARA PRODUCIR [PEGMA_x-MA(FOLATO)_y]-[HPMA₉₀-PDS(SIARN)₁₀]-[D₂₅-B₅₀-P₂₅]

[0324]

[PEGMA_x-MA(FOLATO)_y]-[HPMA₉₀-(PDSMA-PDS(SIARN))₁₀]-[D₂₅-B₅₀-P₂₅] (PVII)



20 [0325] La etapa final en la construcción de un polímero tribloque dirigido implica la conjugación de siRNA al segundo bloque del polímero tribloque para producir la estructura de polímero final representada por las fórmulas PVII y PVII.1. La reacción de conjugación se lleva a cabo tal como se describe en el Ejemplo 7. En primer lugar, se prepara un siARN tiolado (activado) (Ejemplo 7.1) que a continuación se hace reaccionar con los grupos PDS en el segundo bloque del polímero tribloque (Ejemplo 7.2) para formar el conjugado polímero-siARN.

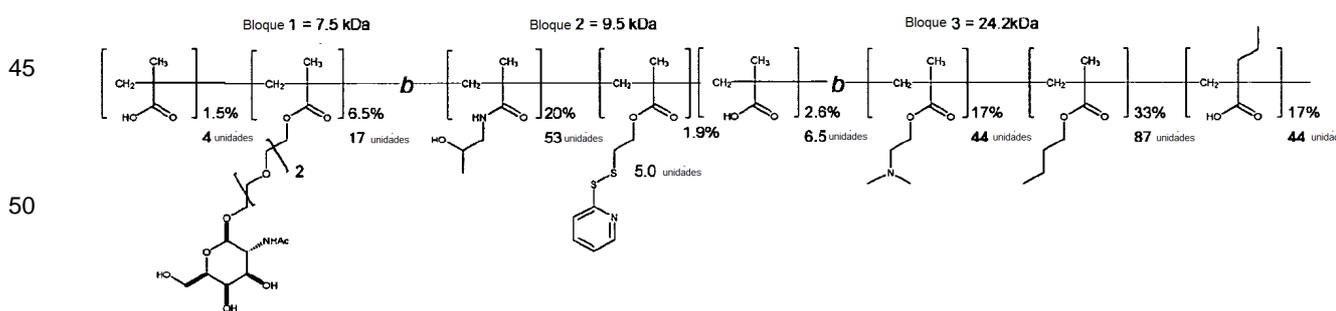
25 [0326] El polímero tribloque final que contiene un primer bloque que reconoce el receptor de folato y un segundo bloque que contiene siARN conjugado se analiza por la actividad biológica (es decir, la actividad knockdown específica de genes) tal como se describe en el Ejemplo 8. Se pueden usar dos líneas celulares diferentes, una que expresa el receptor de folato específico y la otra una línea celular de control que no expresa el receptor de folato. Se han descrito múltiples líneas de células que se pueden utilizar para demostrar el reconocimiento y knockdown específico del tipo de célula a través del receptor de folato (por ejemplo, Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. Curr Opin Chem Biol. 2009 Jun; 13 (3): 256-62).

35 **EJEMPLO 10: POLÍMEROS TRIBLOQUE QUE COMPRENEN UNIDADES MAA EN BLOQUES HIDRÓFILOS.**

[0327] Alternativamente, los polímeros tribloque se sintetizaron mediante la adición de ácido metacrílico (MAA) a bloques de polímero 1 y 2 tal como se representa por las fórmulas (PVIII) y (PIX). La adición de residuos ácidos aumentó la hidrofiliicidad/solubilidad del polímero.

40 **Ejemplo 10.1 Síntesis del polímero PVIII:**

[0328]



55 **Etapa 1. Preparación de macroCTA [Nag-P3₈₀%-CO-MAA₂₀%]**

60 [0329] Se introdujeron monómero de N-acetil galactosamina protegido con O-acetilo Nag-P3-MA (1,5 g, 2,74 mmoles), MAA (0,059 g, 0,685 mmoles), ECT (22,5 mg, 0,0856 mmoles; CTA:monómeros 1:40), AIBN (0,351 mg, 0,00214 mmoles; ECT:AIBN 40:1) y DMF (1,64 ml) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómeros era ~ 2,1 M. Las mezclas se desgasificaron a continuación por burbujeo de nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos. Se colocaron en un bloque calentador (Termómetro: 68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 300 rpm). La reacción se dejó 9 horas 5 minutos. La reacción se detuvo mediante la colocación el vial en hielo y la exposición de las mezclas al aire. La purificación del polímero se realizó mediante diálisis frente a metanol durante 36 horas. El disolvente se eliminó posteriormente. El polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 6 horas. La estructura y composición de la macroCTA resultante se confirmaron mediante RMN ¹H. El peso molecular del producto (12,7 kDa) y su polidispersidad (1,1) se determinaron por análisis GPC.

Etapa 2. Preparación de MacroCTA [Nag-P380%-MAA20%]-b-[HPMA82-PDSMA8-MAA]

5 [0330] Se introdujeron HPMA (0,556 g, 3,89 mmoles), PDSMA (0,097 g, 0,379 mmoles), [NAG-P380-MAA20]MacroCTA (0,30 g, 0,0315 mmoles; CTA:monómeros 1:150), AIBN (0,52 mg, 0,00316 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (1,52 ml) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómeros era ~ 3,0 M. Las mezclas se desgasificaron a continuación por burbujeo de nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos. Se colocaron en un bloque calentador (Termómetro: 68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 300 rpm). La reacción se dejó continuar durante 5 horas y a continuación se detuvo colocando el vial en hielo y la exposición de las mezclas al aire. La purificación del polímero se realizó por diálisis frente a metanol durante 36 horas. Se eliminó el disolvente, y el polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 6 horas. El espectro de RMN mostró la alta pureza del producto. No se observaron grupos vinilo correspondientes a los monómeros sin reaccionar. El análisis GPC del producto dio el peso molecular correcto (19 KDa mediante la detección triple, 93% de extremos vivos por absorción UV) y una buena polidispersidad (1,1).

Etapa 3. Preparación de protección [Nag-P3-MAA]-b-[HPMA-PDSMA-MAA]-b-[BMA-PAA-DMAEMA]

20 [0331] Se introdujeron BMA (0,776 g, 5,458 mmol), PAA (0,312 g, 2,73 mmol), DMAEMA (0,429 g, 2,73 mmol), MacroCTA (0,881 g, 0,02757 mmoles; CTA:Monómeros 1:396), AIBN (0,452 mg, 0,002757 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (1,986 ml) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómero fue 3 M. Las mezclas se desgasificaron a continuación por burbujeo de nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos y se colocaron en un bloque de calor (Termómetro: 67-68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 350 rpm). La reacción se dejó proceder durante 11 horas (suponiendo un 50-60% de conversión). La reacción se detuvo mediante la colocación del vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. La purificación del polímero se realizó mediante precipitación a partir de acetona/DMF 1:1 en hexano/éter 75/25 (tres veces). El polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 8 horas. El espectro de RMN mostró la alta pureza del producto. El peso molecular del producto (43,2 KD) y su polidispersidad (1,9) se determinaron por análisis GPC.

Etapa 4: Desprotección del polímero N-Acetil galactosamina [Nag-P3-MAA]-b-[HPMA-PDSMA-MAA]-b-[BMA-PAA-DMAEMA]

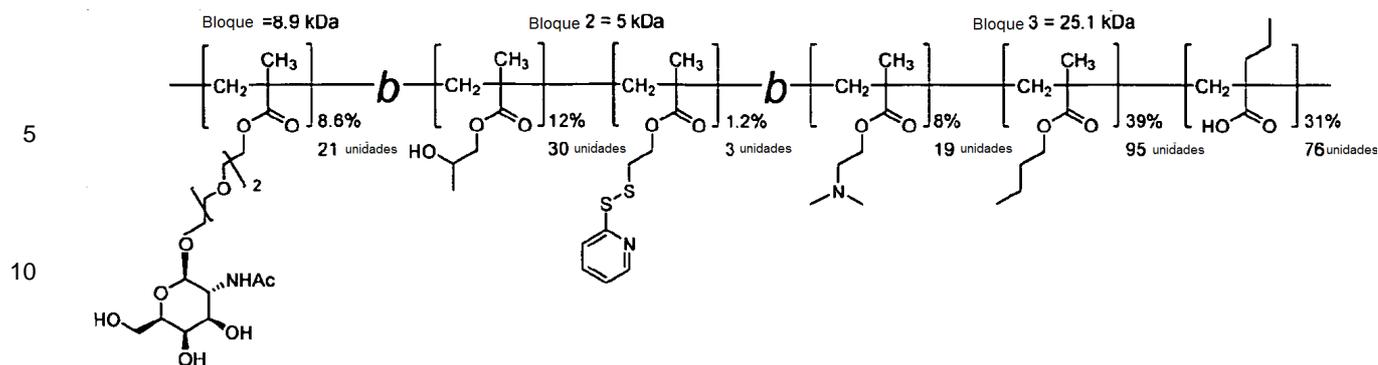
35 [0332] A un vial de reacción de vidrio de 20 ml se añadió el polímero preparado en la etapa 3 (CD-02-22) (0,7 mg, 4,225 umol de polímero) seguido de metanol anhidro (3,0 ml), cloroformo anhidro (1,5 ml) y metóxido de sodio (90 mg, 1,650 umol, 6 equivalentes en relación con Nag). Esta mezcla se agitó bajo una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 1,0 h 15'. A continuación, se añadió ácido acético glacial (540 ul, 695 umol, 3 equivalentes con respecto al contenido de N-acetil galactosamina del polímero) a la mezcla de reacción seguido de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (15 mg, 68 umol, 1 equivalente con respecto al disulfuro de piridilo). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,0 h bajo un flujo de gas N₂. Después del bloqueo con disulfuro de 2,2'-dipiridilo durante 75 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con MeOH (5 ml) y se filtró a través de filtración simple por gravedad. La solución filtrada se transfirió a una membrana de diálisis con un MWCO de 2.000 g/mol y se dializó frente a MeOH (4x1 L) durante 18 h, seguido por diálisis frente a agua miliQ (5 x 4L) durante 20 horas, seguido de liofilización. El análisis de RMN se realizó en CD₃OD para confirmar la estructura del polímero.

45 [0333] Dado que la funcionalidad del disulfuro de piridilo en el polímero era difícil de detectar por espectroscopia de RMN, esta funcionalidad se cuantificó mediante absorción UV/Vis. El polímero desprotegido (13,4 mg) se disolvió en EtOH (268 ml) proporcionando una solución de polímero a una concentración de 50 mg/mL. Una alícuota de esta solución de polímero (20 ul, 1,0 mg, 6,35 umol) se trató con una solución acuosa de ditiotreitól 1,0 M (10 ul, 10,0 umol, DTT) durante 10 min antes de diluirse con H₂O (70 ul) produciendo una solución de polímero reducido de 0,0635 M (6,35 umol/100 ul = 0,0635 mol/l). Dado que la incorporación prevista de disulfuro de piridilo debe ser del 1,9% en el polímero, se esperaba que la concentración del grupo saliente piridin-2-tiona debería ser de 1,21 mM (es decir, 0,0635 x 0,019 = 0,00121 M) después de tratar el polímero con DTT tal como se describe anteriormente. Dado que la absorción molar de la piridin-2-tiona a 343 nm es $\epsilon = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, 1996, 1ª ed. Academic Press, una impresión de Elsevier, página 66 que se incorpora aquí por referencia) y la longitud de paso del espectrómetro NanoDrop utilizado es 0,1 cm, la absorción prevista para la solución de polímero reducido anterior debe ser $A = 0,98$ (es decir, $A = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0,1 \text{ cm} \times 0,00153 \text{ M}$). Después del análisis de la solución de polímero reducido por absorción UV/Vis, la absorción determinada experimentalmente era $A = 0,48$ a 343 nm. Esto demuestra la presencia de la funcionalidad disulfuro de piridilo en el polímero con la concentración real del 0,93% del total de incorporación de disulfuro de piridilo en el polímero ($[0,48/0,98] \times 1,9$) en comparación con el 2,4% calculado teóricamente.

EJEMPLO 10.2: SÍNTESIS DEL POLÍMERO PIX:

[0334]

65



15 Etapa 1. Síntesis de poli (Nag-P3)

20 **[0335]** Se introdujeron monómero de N-acetil galactosamina protegido con O-acetilo con enlazador de trietilenglicol (Nag-P3-MA) (1,0 g, 1,83 mmoles), ECT (24,1 mg, 0,0913 mmoles), y AIBN (0,375 mg, 0,00228 mmoles; ECT:AIBN 40:1) y DMF (1,0 g) bajo nitrógeno en un vial sellado. La mezcla se desgasificó por burbujeo de nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos, a continuación se colocó en un bloque de calor (Termómetro: 67-68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 350 rpm). La reacción se dejó proceder durante 9 horas 5 minutos y se detuvo colocando el vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. La purificación del polímero final se realizó mediante diálisis frente a metanol durante 2 días. No se observaron grupos vinilo en el espectro de RMN y los espectros confirmaron la estructura deseada. Tal como se determinó por análisis de GPC: dn/dc = 0,059234; Mn = 11,8 kDa (~ 21 unidades); PDI=1,2.

25 Etapa 2. Síntesis del polímero de la estructura de reconocimiento poli (NAG-P3) 11,8 kDa-b-(HPMA-E-PDSMA) 5 kDa].

30 **[0336]** Se introdujeron HPMA-E (0,69 g, 4,79 mmoles), PDSMA (0,11 g, 0,47 mmoles), MacroCTA de la etapa 1 (0,41 g, 0,0347 mmoles; CTA:Monómeros 1:150), AIBN (0,57 mg, 0,00347 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (1,6 g) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómero era ~ 3 M. La mezcla se desgasificó a continuación por burbujeo de nitrógeno en la misma durante 30 minutos, a continuación se sumergió en un bloque de calor (Termómetro: 68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 300 rpm). La reacción se dejó proceder durante 3 horas, y a continuación se detuvo colocando el vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. La purificación del polímero se realizó por diálisis frente a metanol durante 24 horas. Se eliminó el disolvente, y el polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 6 horas. El espectro de RMN mostró una alta pureza del polímero y la presencia de PDSMA. No se observaron desplazamientos químicos de grupos vinilo debido a la presencia de monómeros sin reaccionar. El análisis GPC dio un peso molecular de 16.800 y una polidispersidad de 1,1 para el polímero resultante.

40 Etapa 3. Síntesis del polímero protegido por Nag [Nag-P3]_{11,8 kDa}-b-[HPMA- E-92-PDSMA8]_{5 kDa}-b-[BMA50-PAA40-DMAEMA10]_{30 kDa}

45 **[0337]** Se introdujeron BMA (0,596 g, 4,194 mmol), PAA (0,383 g, 3,355 mmol), DMAEMA (0,132 g, 0,839 mmol), MacroCTA (0,300 g, 0,01852 mmoles; CTA:Monómeros 1:453), AIBN (0,304 mg, 0,001852 mmoles; CTA:AIBN 10:1) y DMF (1,5067 g) bajo nitrógeno en un vial sellado. La concentración de monómeros era ~3 M. La mezcla se desgasificó burbujeadando nitrógeno en la mezcla durante 30 minutos, a continuación se colocó en un bloque de calor (Termómetro: 67-68°C; dispositivo: 70-71; velocidad de agitación de 350 rpm). La reacción se dejó proceder durante 21 horas (suponiendo un 50-60% de conversión). La reacción se detuvo mediante la colocación del vial en hielo y la exposición de la mezcla al aire. La purificación del polímero se realizó mediante precipitación a partir de acetona/DMF 1:1 en hexano/éter 75/25 (tres veces). El polímero resultante se secó bajo vacío durante al menos 8 horas. El RMN mostró un polímero puro con la presencia de PDSMA y no había grupos vinilo debido a las impurezas de monómeros sin reaccionar. El análisis GPC del producto dio dn/dc = 0,058173; Mn = 41,9 kDa; PDI =1,30.

50 Etapa 4: Desprotección.

55 **[0338]** A un vial de reacción de vidrio de 20 ml se añadió el polímero de la etapa 3 (440 mg, 2575 umol de polímero) seguido de metanol anhidro (2,0 ml), cloroformo anhidro (1 ml) y metóxido de sodio (72 mg, 1329 umol, 6 equivalentes en relación con el contenido de Nag en el polímero). Esta mezcla se agitó bajo una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 1 hora, a continuación se añadió a la reacción disulfuro de 2,2'-dipiridilo (34 mg, 154,5 umol, 5 equivalentes con respecto al disulfuro de piridilo). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

60 **[0339]** Después del bloqueo con disulfuro de 2,2'-dipiridilo durante 30 min, la mezcla de reacción se diluyó con MeOH (5 ml). La solución filtrada se transfirió a una membrana de diálisis con un MWCO de 2.000 g/mol y se dializó frente a MeOH (4x1 L) durante 18 h, seguido por diálisis frente a agua miliQ (3 x 4 L) durante 10 h, seguido de liofilización. Se realizó el análisis de RMN usando CD₃OD, que muestra la presencia de señales de PDSMA. La funcionalidad del disulfuro de piridilo en el polímero también se cuantificó mediante absorción UV/Vis. El polímero final (6,2 mg) se disolvió en EtOH (248 ul) proporcionando una solución de polímero a una concentración de 25 mg/mL. Una alícuota de

esta solución de polímero (20 ul, 0,5 mg, 3,125 umol) se trató con una solución acuosa de ditioneitol 1,0 M (10 ul, 10,0 umol, DTT) durante 10 min antes de diluirse con H₂O (70 ul) produciendo una solución de polímero reducido de 0,03125 M (3,125 umol/100 ul = 0,03125 mol/l). Dado que la incorporación prevista de disulfuro de piridilo debe ser del 1,2% en el polímero, se esperaría que la concentración del grupo saliente piridin-2-tiona debería ser de 0,375 mM (es decir, 0,03125 x 0,012 = 0,000375 M) después de tratar el polímero con DTT tal como se describe anteriormente. Dado que la absorptividad molar de la piridin-2-tiona a 343 nm es $\epsilon = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, 1996, 1ª ed. Academic Press, una impresión de Elsevier, página 66) y la longitud de paso del espectrómetro NanoDrop utilizado es 0,1 cm, la absorción prevista para la solución de polímero reducido anterior debe ser $A = 0,303$ (es decir, $A = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0,1 \text{ cm} \times 0,000375 \text{ M}$). Después del análisis de la solución de polímero reducido por absorción UV/Vis, la absorción determinada experimentalmente era $A = 0,345$ a 343 nm. Esto demostró la presencia de la funcionalidad disulfuro de piridilo en el polímero con la concentración real del 1,3% del total de incorporación de disulfuro de piridilo en el polímero ($[0,345/0,303] \times 1,2$) en lugar del 1,2% calculado teóricamente (retención del 100% de los grupos disulfuro de piridilo).

15 EJEMPLO 11: ESTRUCTURAS TRIBLOQUE ALTERNATIVAS

[0340] Utilizando los métodos descritos anteriormente, se pueden preparar los siguientes polímeros de tres bloques (tribloque) adicionales. Además, se debe entender que HPMA-E (metacrilato de 2-hidroxipropilo o residuo monomérica derivado del mismo) puede ser sustituido por HPMA en cada uno de los siguientes polímeros de tres bloques en los que aparece HPMA; únicamente en interés de la brevedad, dichas estructuras adicionales no se repiten, pero se considerarán parte de esta descripción:

[PAA₉₀-BA₁₀]_{18K}-[HPMA₉₀-PDSMA₁₀]_{5K}-[folato]
 [PAA₉₀-BA₁₀]_{18K}-[HPMA₈₀-MAA₁₀-PDSMA₁₀]_{5K}-[folato]
 folato [PEG]_{2K}-[HPMA₉₀-PDSMA₁₀]_{12,0K}-[D₂₅-B₅₀-P₂₅]_{30K}
 folato [PEG]_{2K}-[HPMA₉₀-MAA₁₀-PDSMA₁₀]_{12,0K}-K[D₂₅-B₅₀-P₂₅]_{30K}
 [PEGMA₇₀-MAA(NHS)₃₀]-[DMAEMA]-[B-P-D]
 [DMAEMA₇₀-MAA(NHS)₃₀]-[DMAEMA]-[B-P-D]
 [Gal] - [HPMA-PDSMA] - [B-P-D]
 [Gal-MAA] - [HPMA-PDSMA-MAA] - [B-P-D]
 [NACGal] - [HPMA-PDSMA] - [B-P-D]
 [NACGal-MAA] - [HPMA-PDSMA-MAA] - [B-P-D]
 [Gal] - [D] - [B-P-D]
 NACGal] - [D] - [B-P-D]
 [Gal-MAA] - [D] - [B-P-D]
 [NACGal-MAA] - [D] - [B-P-D]
 [Gal-D] - [D] - [B-P-D]
 [NACGal-D] - [D] - [B-P-D]
 [Gal] - [PA] - [B-P-D]
 [Gal] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [Gal-MAA] - [PA] - [B-P-D]
 [Gal-MAA] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [Gal-D] - [PA] - [B-P-D]
 [Gal-D] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [NACGal] - [PA] - [B-P-D]
 [NACGal] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [NACGal-MAA] - [PA] - [B-P-D]
 [NACGal-MAA] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [NACGal-D] - [PA] - [B-P-D]
 [NACGal-D] - [HPMA-PA] - [B-P-D]
 [PAA-BA] - [HPMA-PDSMA] - [folato]
 [PAA-BA] - [HPMA-MAA-PDSMA] - [folato]
 Folato-[PEG] - [HPMA-PDSMA] - [D-B-P]
 folato [PEG] - [HPMA-MAA-PDSMA] - [D-B-P]

55 LISTADO DE SECUENCIAS

[0341]
 <110> University of Washington PhaseRx, Inc. Prieve, Mary G. Johnson, Paul H. Stayton, Patrick S. Hoffman, Allan S. Overell, Robert W. Gall, Anna S. Paschal,
 60 Amber E.E. Diab, Charbel De, Priyadarsi DeClue, Michael S. Monahan, Sean D.

<120> COPOLÍMEROS MULTIBLOQUE

<130> UWOTL134064

65

<150> US 61/112,048

<151> 2008-11-06
 <150> US 61/112,054
 <151> 2008-11-06
 5
 <150> US 61/140,774
 <151> 2008-12-24
 <150> US 61/140,779
 <151> 2008-12-24
 10
 <150> US 61/171,358
 <151> 2009-04-21
 <150> US 61/171,369
 <151> 2009-04-21
 15
 <150> US 61/177,921
 <151> 2009-05-13
 <150> US 61/243,898
 <151> 2009-09-18
 20
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 25
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sintética
 35
 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(19)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición1 a 19 son
 40 ribonucleótidos modificados.
 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia es híbrido ADN/ARN.
 45
 <220>
 <221> características varias
 <222> (20)..(21)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 20 a 21 son
 50 desoxinucleótidos modificados.
 <400> 1
 55 ggucauccau gacaacuuut t 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sintética
 65
 <220>
 <221> características varias

<222> (1)..(21)
 <223> Secuencia es híbrido ADN/ARN.

5 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(19)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 1 a 19 son ribonucleótidos modificados.

10 <220>
 <221> características varias
 <222> (20)..(21)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 20 a 21 son desoxinucleótidos modificados.

15 <400> 2
 aaaguuguca uggauacct t 21

20 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintética

30 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(1)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 1 es ribonucleótido modificado.

35 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia es híbrido ADN/ARN.

40 <220>
 <221> características varias
 <222> (2)..(2)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 2 es 2'-O-metil modificado.

45 <220>
 <221> características varias
 <222> (3)..(4)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 3 a 4 son ribonucleótidos modificados.

50 <220>
 <221> características varias
 <222> (5)..(5)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 5 es 2'-O-metil modificado.

55 <220>
 <221> características varias
 <222> (6)..(10)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 6 a 10 son ribonucleótidos modificados.

60 <220>
 <221> características varias
 <222> (11)..(11)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 11 es 2'-O-metil modificado.

65 <220>
 <221> características varias
 <222> (12)..(14)

<223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 12 a 14 son ribonucleótidos modificados.

5 <220>
 <221> características varias
 <222> (15)..(15)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 15 es 2'-O-metil modificado.

10 <220>
 <221> características varias
 <222> (16)..(20)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 16 a 20 son ribonucleótidos modificados.

15 <220>
 <221> características varias
 <222> (21)..(21)
 <223> En la que el nucleótido en la posición 21 es 2'-O-metil modificado.

20 <400> 3
 gucaucacac ugauaccaa u 21

25 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(23)
 <223> En la que cada uno de los nucleótidos de la posición 1 a 23 son ribonucleótidos modificados.

40 <220>
 <221> características varias
 <222> (1)..(23)
 <223> Secuencia es híbrido ADN/ARN.

45 <400> 4
 auugguauuc aguguga cac 23

50 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 5
 catggccttc cgtgttccta 20

60 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 6

	atgcctgctt caccaccttc t	21
5	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 7 cctaagatga gcgcaagttg aa	22
15	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 8 ccacaggact agaacacctg ct	22
30	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 9 atggaagggga agtgggttact gt	22
40	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 10 gctttgtagg tgacctttgg ag	22
55	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
60	<400> 11 aagcacctcc gaaagtacgt g	21
65	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 12

5 ctccagctct accttacagt tga

23

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un copolímero de bloques asociado con un polinucleótido, comprendiendo el copolímero de bloques un primer, un segundo y un tercer bloque de composición distinta, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, estando el segundo bloque situado entre el primer y el tercer bloque y asociado con el polinucleótido, siendo el tercer bloque un bloque de polímero hidrófobo que comprende unidades de repetición aniónicas, teniendo las unidades de repetición aniónicas una población de aniones como sustituyentes de las mismas que varía en número de una manera dependiente del pH, siendo la población mayor a pH 7,4 que a pH 5, en la que al menos el 90% de las unidades de repetición del primer, segundo y tercer bloque no son residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

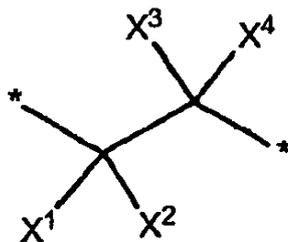
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que: el primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición, las unidades de repetición tienen átomos de cadena y grupos colgantes acoplados covalentemente a los átomos de cadena, y los átomos de cadena son carbono o una combinación de átomos de carbono y azufre u oxígeno; preferiblemente, en la que los grupos colgantes se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, carbonilo sustituido o heterociclo; o el primer, segundo y tercer bloque del copolímero de bloques comprenden unidades de repetición derivadas de monómeros de ácido acrílico opcionalmente sustituidos, monómeros de vinil arilo opcionalmente sustituidos, monómeros de acrilamida opcionalmente sustituidos, monómeros de acrilato opcionalmente sustituidos y combinaciones de los mismos.

3. Composición, según la reivindicación 1, en la que el primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición de fórmula 1:

25

30

35



Formula 1

en la que

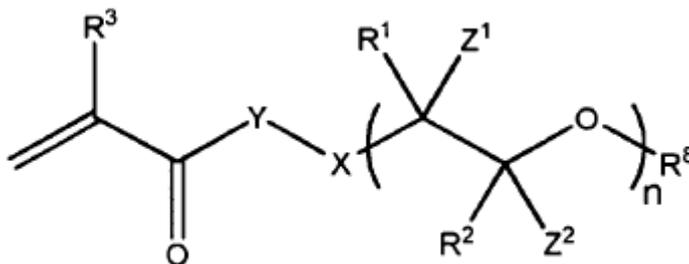
* designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1 a otras unidades de repetición; cada X¹ y X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterociclo, y carbonilo sustituido, a condición, sin embargo, X¹ y X² no se seleccionen, en la misma unidad de repetición, del grupo que consiste en arilo, heteroarilo, carbonilo heterosustituido, y combinaciones de los mismos; cada X³ es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, y cada X⁴ es independientemente carbonilo heterosustituido, arilo o heteroarilo; preferiblemente, en la que el primer, segundo y tercer bloque comprenden unidades de repetición de fórmula 1 en las que X⁴ es -C(O)OX⁴⁰, -C(O)SX⁴⁰, o -C(O)NX⁴⁰X⁴¹, y X⁴⁰ y X⁴¹ son independientemente hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo.

4. Composición, según la reivindicación 1, en la que el primer o segundo bloque comprende unidades de repetición derivadas de un monómero polimerizable que tiene la fórmula:

55

60

65



en la que:

n es un número entero que varía de 2 a 20;

X es $-(CR^1R^2)_m-$ en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$,

5 Y es $-O-$, $-NR^4-$ o $-(CR^1R^2)-$,

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, y C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido,

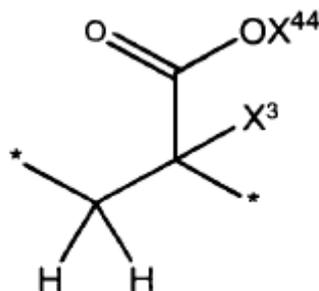
R^4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y C_1-C_6 alquilo opcionalmente sustituido,

10 R^8 es hidrógeno o $(CR^1R^2)_mR^9$, en el que m es 0-10, y en el que una o más unidades (CR^1R^2) están opcionalmente sustituidas con $-NR^1R^2$, $-OR^1$ o $-SR^1$, y

R^9 es hidrógeno, halógeno, C_1-C_3 alquilo opcionalmente sustituido, poliol, vitamina, péptido o molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons, o un grupo conjugable.

15 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, en la que el primer bloque es un copolímero al azar que comprende dos o más unidades de repetición de composición distinta.

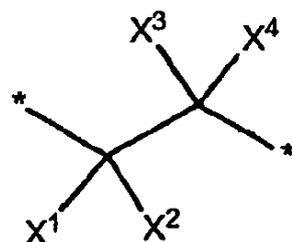
6. Composición, según la reivindicación 1, en la que el primer bloque comprende unidades de repetición correspondientes a la fórmula 1ETS:



Formula 1ETS

35 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1ETS a otras unidades de repetición, X^3 es alquilo, y X^{44} es un resto de reconocimiento o de protección; preferiblemente, en la que X^{44} es un poliol, vitamina, péptido o molécula pequeña que tiene un peso molecular de 200 a 1200 Daltons.

40 7. Composición, según la reivindicación 1, en la que el segundo bloque comprende unidades de repetición correspondientes a la fórmula 1:

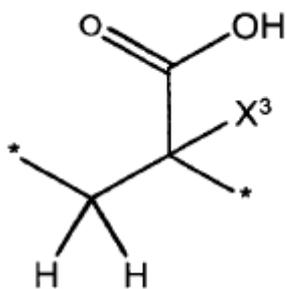


Formula 1

55 X^4 es $-C(O)OX^{45}$ o $-C(O)NX^{45}X^{41}$, X^{45} es hidrocarbilo sustituido, heterohidrocarbilo sustituido, o heterociclo, y X^{45} comprende un resto disulfuro; preferiblemente, en la que X^{45} comprende el polinucleótido, y el polinucleótido está unido covalentemente a la composición a través de X^{45} .

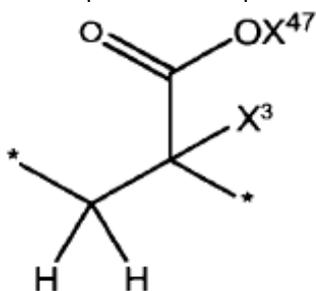
60 8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6 ó 7, en la que el primer, segundo o tercer bloque consisten cada uno esencialmente en unidades de repetición que son residuos de monómero o monómeros etilénicamente insaturados.

65 9. Composición, según la reivindicación 1, en la que el tercer bloque comprende unidades de repetición correspondientes a la fórmula 1A:



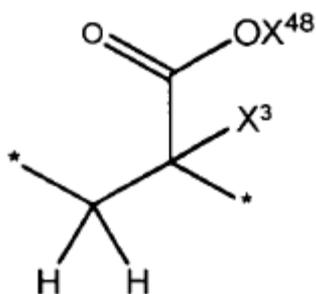
Formula 1A

15 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1A a otras unidades de repetición, y X³ es alquilo; y/o en la que el tercer bloque comprende unidades de repetición correspondientes a la fórmula 1E:



Formula 1E

30 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1E a otras unidades de repetición, y X³ y X⁴⁷ son independientemente alquilo; y/o en la que el tercer bloque comprende unidades de repetición correspondientes a la fórmula 1C:



Formula 1C

50 en la que * designa el punto de unión de la unidad de repetición de Fórmula 1C a otras unidades de repetición, X³ es alquilo y X⁴⁸ es alquilo sustituido con amino.

55 10. Composición, según la reivindicación 1, en la que el tercer bloque comprende unidades de repetición aniónicas derivadas de la polimerización de un ácido (C₂-C₈)alquilacrílico; preferiblemente en la que las unidades de repetición aniónicas derivan de la polimerización de ácido propilacrílico.

60 11. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el polinucleótido es un desoxirribonucleótido, un siARN, un oligonucleótido antisentido, un sustrato dicer, un miARN, un aiARN o un shARN; preferiblemente, en la que el polinucleótido es un siARN.

65 12. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para utilizar en la liberación intracelular de un polinucleótido.

13. Método para la liberación intracelular de un polinucleótido, que comprende poner en contacto una célula con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 5 14. Composición que comprende una micela polimérica y un polinucleótido asociado con la micela, comprendiendo la micela una pluralidad de copolímeros de bloque que comprende (i) un primer bloque, siendo el primer bloque un bloque de polímero hidrófilo, (ii) un segundo bloque entre el primer bloque y un tercer bloque, estando el segundo bloque asociado con el polinucleótido, y (iii) un tercer bloque, siendo o comprendiendo el tercer bloque un bloque de polímero que comprende una pluralidad de residuos monoméricos hidrófobos y una pluralidad de residuos monoméricos aniónicos; asociándose la pluralidad de copolímeros de bloque en la micela, y siendo la micela estable en un medio acuoso a pH 7,4.
- 10 15. Composición farmacéutica que comprende la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1 Síntesis de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA)

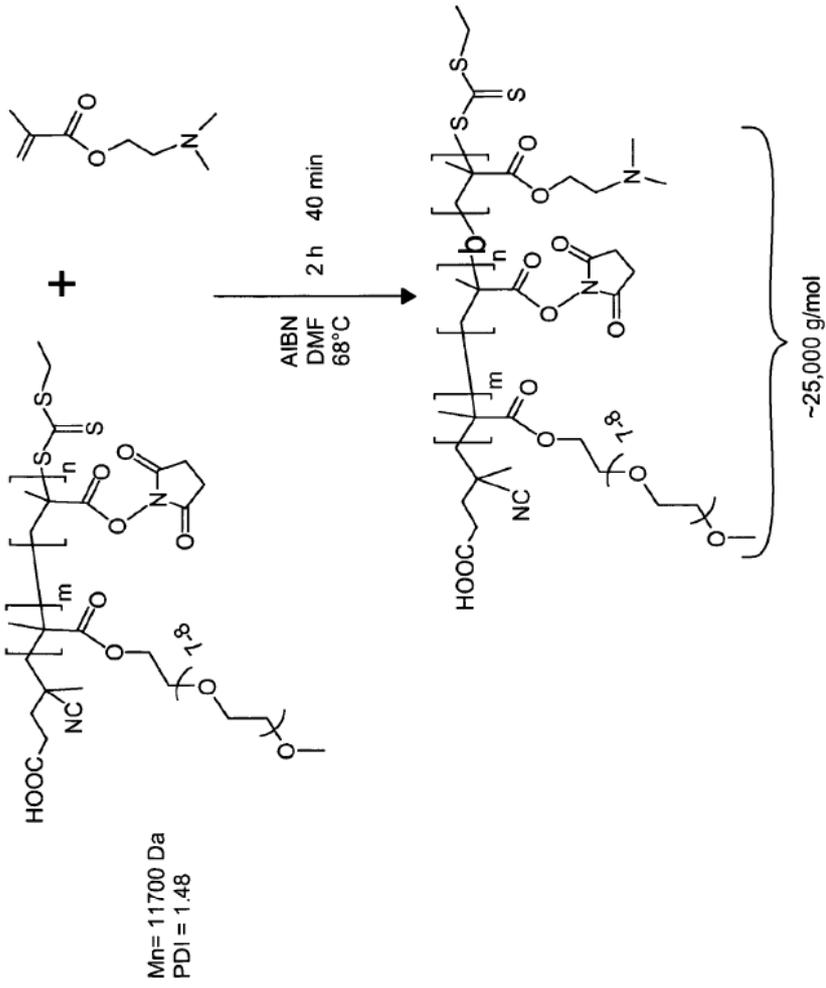


Fig. 2 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA): Análisis RMN

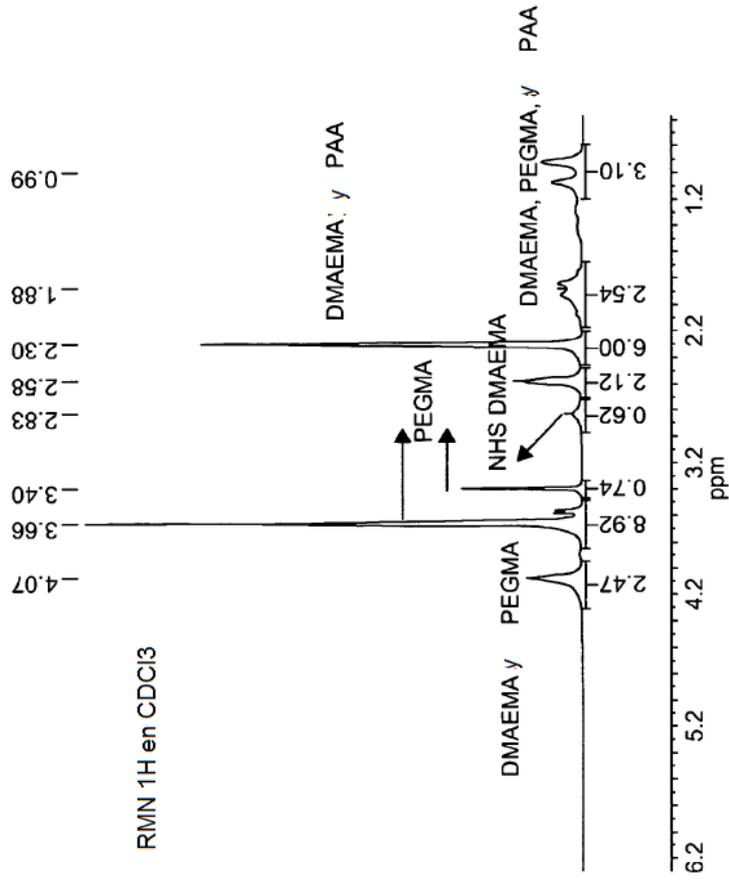


Fig. 3 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA): Análisis de Cromatografía de Permeación en gel (GPC)

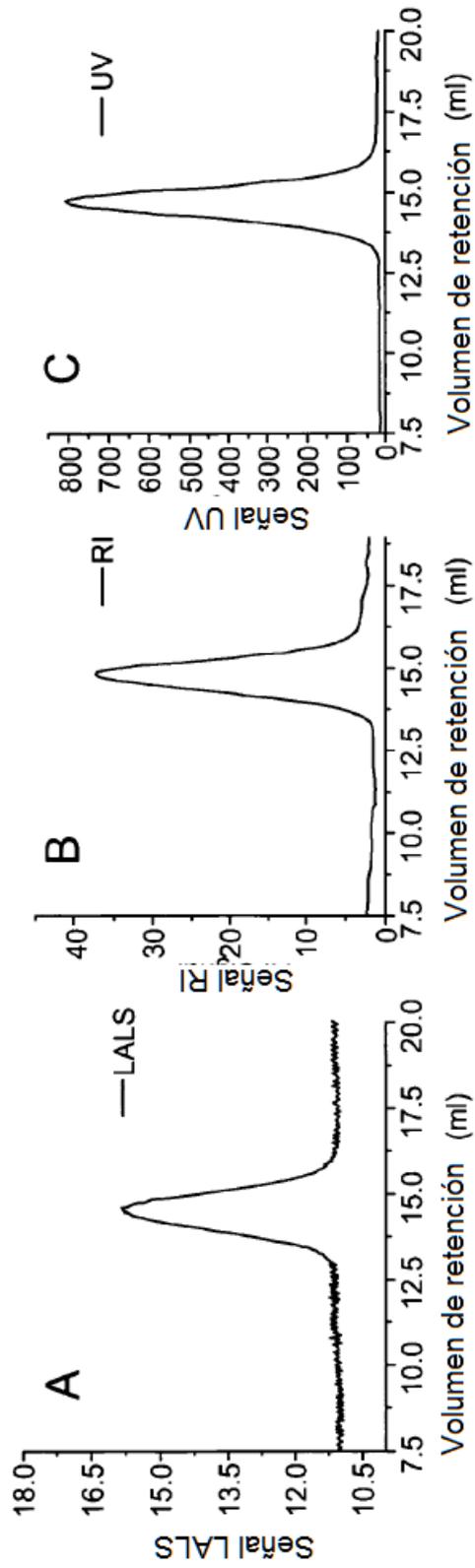


Fig. 5 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA)-b-[(DMAEMA)-BMA-(PAA)]: Análisis de RMN

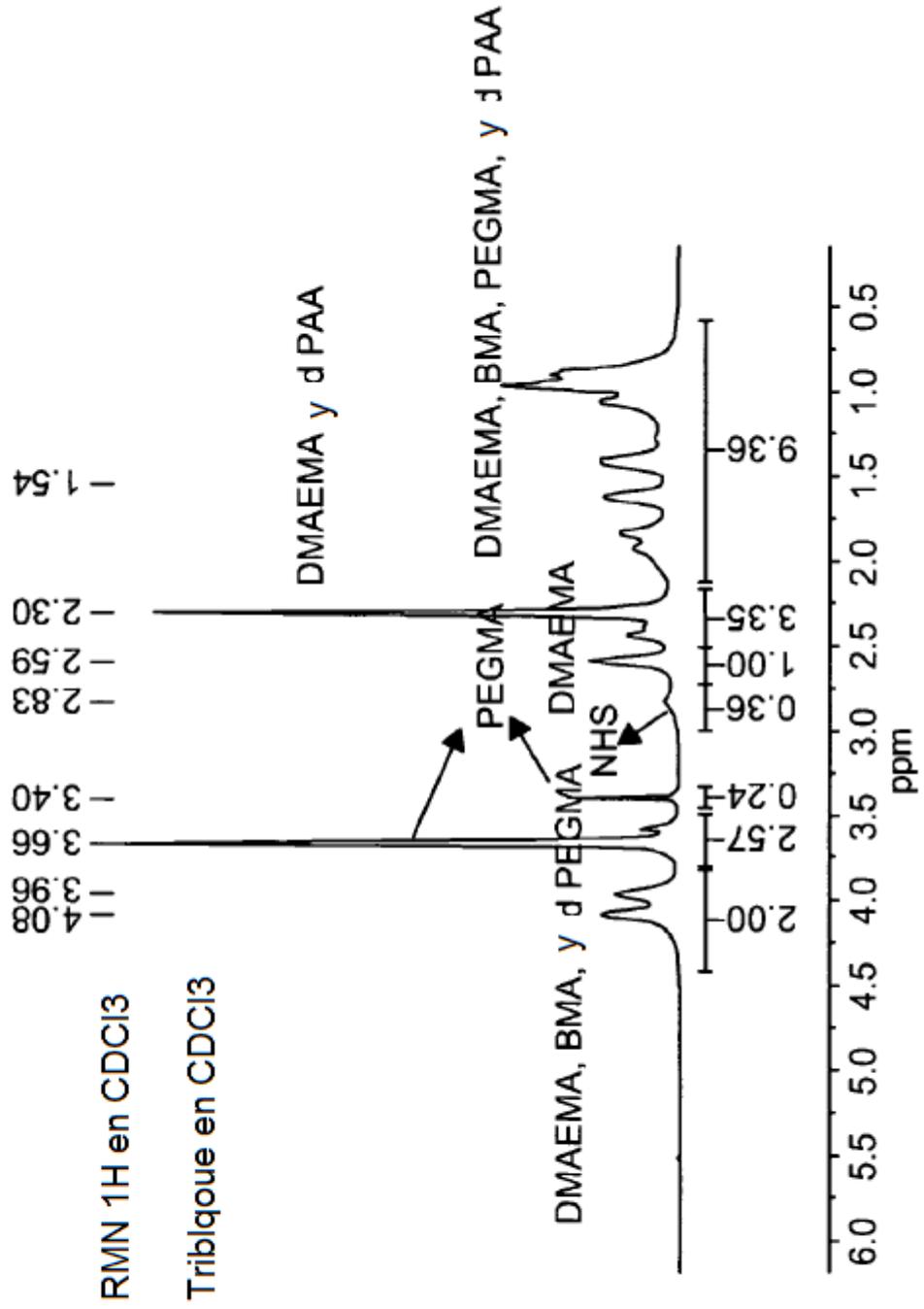


Fig. 6 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA)-b-[(DMAEMA)-(BMA)-(PAA)]: Análisis GPC

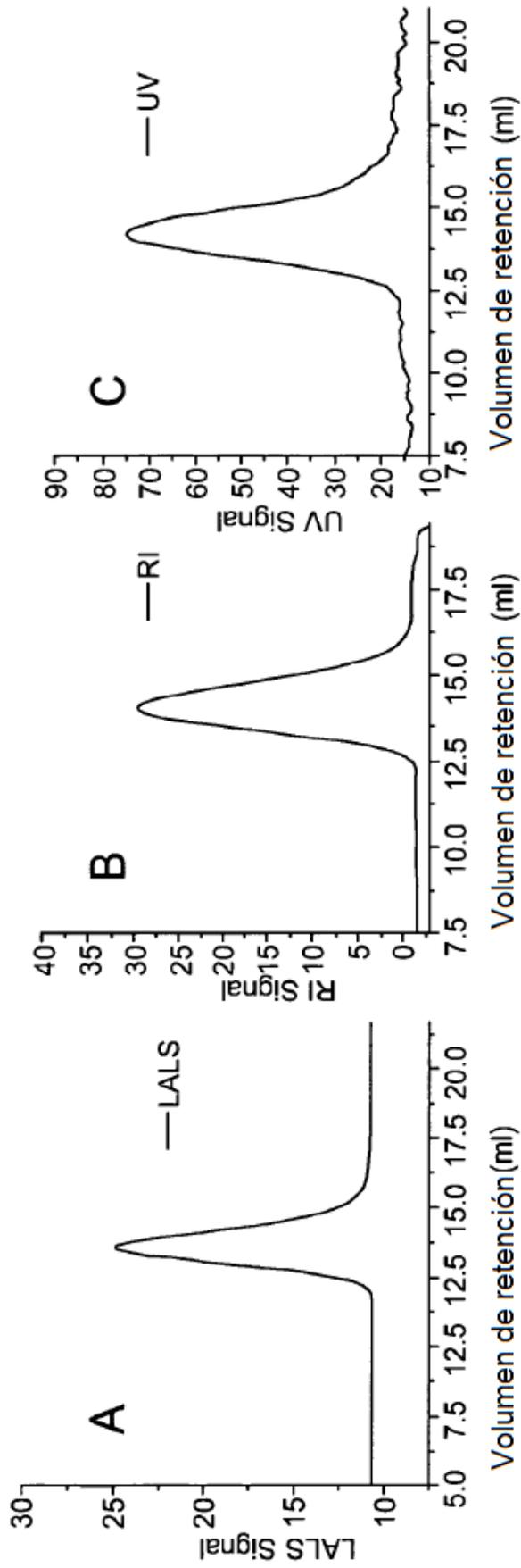


Fig. 7 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA)-b[(DMAEMA)-(BMA)-(PAA)]: Análisis RMN en PBS-d

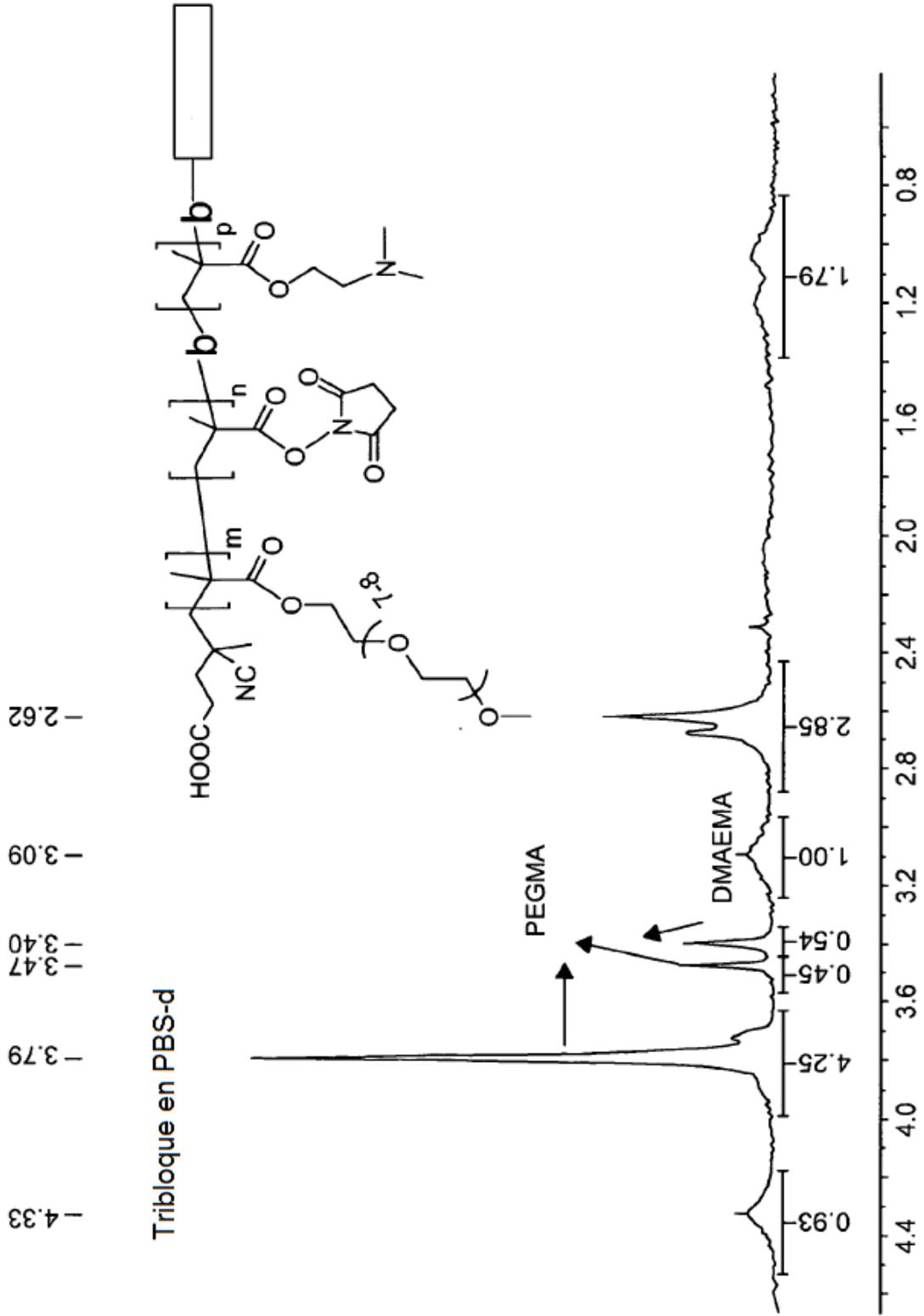


Fig. 8 Caracterización de poli(PEGMA-MANHS)-b-(DMAEMA)-b-[(DMAEMA)-(BMA)-PAA]: dispersión dinámica de luz (DLS)

