

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 373**

21 Número de solicitud: 201531831

51 Int. Cl.:

**C08F 20/60** (2006.01)

**C08F 20/56** (2006.01)

**A61K 31/16** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**17.12.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.06.2017**

Fecha de la concesión:

**02.04.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (50.0%)  
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y  
UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MONTENEGRO GARCÍA, Javier y  
FERNÁNDEZ-TRILLO, Francisco**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

54 Título: **Síntesis acuosa y cribado rápido in situ de polímeros anfifílicos**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método de cribado novedoso para transfección empleando polímeros anfifílicos novedosos basados en acrililo.

ES 2 618 373 B1

**SÍNTESIS ACUOSA Y CRIBADO RÁPIDO IN SITU DE POLÍMEROS ANFIFÍLICOS****Descripción****Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos de cribado que usan nuevos polímeros anfifílicos conjugados con biomoléculas tales como ADN, ARN o siARN. Los nuevos métodos permiten un cribado más rápido y más flexible de agentes de transfección adecuados y de liberación de biomoléculas de interés. La solicitud también describe novedosos agentes de transfección identificados siguiendo el método de cribado.

**Antecedentes de la invención**

10 La industria farmacéutica está continuamente buscando métodos de identificación de fármacos cada vez más eficientes. Uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la industria en los últimos años es proporcionar composiciones o dispositivos capaces de superar la barrera de la membrana celular y ceder el ingrediente farmacéutico activo en la célula diana. Este problema es crítico en el caso de la terapia génica, en donde moléculas relativamente grandes y cargadas, y por lo tanto lipofóbicas, tales como ácidos nucleicos  
15 (ADN, ARN o siRNA), tienen que superar la membrana celular lipofílica. Durante muchos años, los investigadores han estado buscando moléculas anfifílicas que se puedan conjugar con tales moléculas hidrofóbicas y al mismo tiempo pasar a través de las membranas celulares.

20 El primer éxito se obtuvo con moléculas lipídicas cargadas positivamente, tales como las descritas en el documento WO 94/05624 (Invitrogen). Cada lípido tiene que ser sintetizado por separado y luego cribado, y por lo tanto no son adecuados para el cribado de alto rendimiento. Recientemente, el grupo de Siegwart ha descrito un método para la preparación de librerías de poliésteres lipocatiónicos mediante polimerización por apertura de anillo de valerolactonas. La alta eficiencia de las condiciones de polimerización permitió el cribado directo de los polímeros resultantes para la cesión de siRNA. Sin embargo, la polimerización requiere el uso de equipo especializado, como una caja seca para evitar la presencia de humedad, perjudicial para el  
25 proceso de polimerización. Además, los polímeros resultantes tienen que ser combinados con varios aditivos, tales como (lípidos PEGilados, colesterol y lípidos DSCP) con el fin de obtener eficientes vehículos para la cesión. Hao, Jing, Petra Kos, Kejin Zhou, Jason B Miller, Lian Xue, Yunfeng Yan, Hu Xiong, Sussana Elkassih, y Daniel J Siegwart. "Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery." *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 30 9206–9209.

De hecho, hasta donde alcanza nuestro conocimiento no hay ejemplos en el dominio público de tecnologías para la síntesis y evaluación in-situ de agentes poliméricos de liberación de material genético. Anderson *et al.* (US 8,557,231, US 8,287,849, US 7,427,394 o J. J. Green, G. T. Zugates, N. C. Tedford, Y. H. Huang, L. G. Griffith, D. A. Lauffenburger, J. A. Sawicki, R. Langer, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* 2007, 19, 2836–2842) han  
35 desarrollado un notable volumen de investigación basado en anfífilos generados por la condensación de diacrilatos y aminas. La longitud del polímero y la distribución del peso molecular de los productos obtenidos son, sin embargo intrínsecamente diferente, dado que cada polímero se deriva de una polimerización "única", lo que hace difícil un cribado sistemático y la identificación de relaciones de estructura-actividad. Se utilizan disolventes orgánicos, por lo que un cribado in-situ no es posible.

40 Klibanov et al. (M. Thomas, J. J. Lu, C. Zhang, J. Chen, A. M. Klibanov, *Pharm. Res.* 2007, 24, 1564–1571) aplicó una estrategia similar pero usando PEI (polietilenimina). De nuevo, un cribado in-situ no es posible ya que se usan disolventes orgánicos y se necesita purificar los polímeros antes de la conjugación y el cribado. Yu et al. (L. Gan, J. L. Olson, C. W. Ragsdale, L. Yu, *Chem. Commun.* 2008, 573–575; T. Potta, Z. Zhen, T. S. P. Grandhi, M. D. Christensen, J. Ramos, C. M. Breneman, K. Rege, *Biomaterials* 2014, 35, 1977–1988)  
45 usan disulfonamidas en lugar de acrilatos. Otra vez, se emplean disolventes orgánicos y los polímeros deben de ser purificados. Rege et al. (S. Barua, A. Joshi, A. Banerjee, D. Matthews, S. T. Sharfstein, S. M. Cramer, R. S. Kane, K. Rege, *Mol. Pharmaceutics* 2008, 6, 86–97) usan diepóxidos en lugar de acrilatos. Un pseudo cribado in-situ es posible ya que se utilizan materiales de partida netos, que luego son diluidos en el tampón utilizado para la formación de complejo-ácido nucleico (Polyplex). El peso molecular de los productos obtenidos es sin embargo difícil de controlar y cada polímero se deriva de una polimerización "única", lo que hace difícil el cribado sistemático y la identificación de las relaciones estructura-actividad. La solubilidad tampoco puede ser fácilmente modulada, y los compuestos se sintetizan primero y luego se comprueba la solubilidad. En Merkel et al. (V. Nadithe, R. Liu, B. A. Killinger, S. Movassaghian, N. H. Kim, A. B. Moszczyńska, K. S. Masters, S. H. Gellman, O. M. Merkel, *Mol. Pharmaceutics* 2015, 12, 362–374) se  
55 preparó una librería mediante co-polimerización de monómeros funcionales protegidos. Incluso aunque se pueden sintetizar polímeros con peso molecular similar (por ejemplo tabla 1 entradas P G2A and G3) el número de unidades de monómero son intrínsecamente diferentes, dependiendo de la eficiencia de la polimerización de cada monómero. Las polimerizaciones se hacen usando monómeros protegidos y disolventes orgánicos, requiriendo otra vez desprotección y purificación. Schubert et al. (WO2015/048940)

prepararon polímeros poli(alqueno), que se funcionalizan con tioles. La solubilidad de los poli(alqueno) en condiciones acuosas es limitada, comprometiendo su potencial para un cribado in-situ. La funcionalización se hace en metanol, que es tóxico.

5 Bertozzi R., C. et al. (K. Godula, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 9963-9965) describe poli(acroil hidracidas) de 174 unidades, que sin embargo están conjugadas con azúcares reductores (hidrofílicos) y de este modo no son apropiados para transfección. La síntesis requiere también la generación de un resto de hidracida usando hidracina, que es un reactivo tóxico y explosivo.

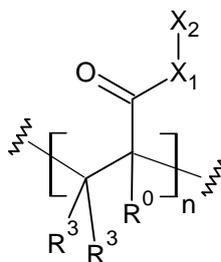
10 En Matile et al. (C. Gehin, J. Montenegro, E.-K. Bang, A. Cajaraville, S. Takayama, H. Hirose, S. Futaki, S. Matile, H. Riezman, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 9295-9298) se describen pequeñas moléculas anfífilas conteniendo enlaces hidrazona para transfección. La estrategia de Matile es fijar el fragmento catiónico al esqueleto molecular y evaluar a esta parte catiónica diferentes grupos hidrofóbicos mediante enlaces hidrazona. Este sistema está limitado así por la cantidad de residuos catiónicos que se puedan incorporar, (dos cargas catiónicas y cuatro colas hidrofóbicas en los ejemplos descritos), que es fundamental para  
15 aumentar la estabilidad de los conjugados con biomoléculas polianiónicas tales como ADN, ARN y XNA (Niidome, T., Takaji, K., Urakawa, M., Ohmori, N., Wada, A., Hirayama, T., and Aoyagi, H. "Chain length of cationic R-helical peptide sufficient for gene delivery into cells" *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 773-780; Ward, C.M., Read, M. L. and Seymour, L.W "Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy" *Blood*, 2001, 97, 2221-2229).

20 Existe, pues, una necesidad de proporcionar métodos flexibles y más eficientes para el cribado de polímeros multivalentes adecuados para la transfección de células con ingredientes farmacéuticos activos.

**Breve descripción de la invención**

25 Los inventores han solucionado los problemas de los métodos de cribado anteriores para nuevos polímeros con potencial en la transfección de ácidos nucleicos proporcionando un andamiaje polimérico novedoso y la demostración de que dicho andamiaje puede ser fácilmente funcionalizado con restos lipofílicos y catiónicos fácilmente asequibles para proporcionar polímeros anfífilos. La disposición de dichos polímeros anfífilos (y sus precursores) y métodos de cribado mejorarán de manera significativa la situación actual como se discute más adelante.

30 Así, un primer aspecto de la invención es un polímero de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo,



(I)

donde

n es el número promedio de unidades de monómeros y es un número igual o mayor que 10;

35 R<sup>0</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y CN, por ejemplo, donde R<sup>0</sup> es hidrógeno o metilo

cada R<sup>3</sup> se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

X<sub>1</sub> es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en -N(H)-, -O-, -N(H)-Alquilo- y -O-Alquilo-;

40 X<sub>2</sub> se selecciona de manera independiente en cada unidad del grupo que consiste en -NH<sub>2</sub>, -N=C(H)R<sup>1</sup> y -N=C(H)R<sup>2</sup>; donde R<sup>1</sup> es un resto lipofílico y R<sup>2</sup> es un resto catiónico; y

donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos X<sub>2</sub> está comprendido entre 1 y 99%;

donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos X2 está comprendido entre 1 y 99%; y

donde la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos catiónicos está comprendido entre 2 y 100%.

5 Los inventores han confirmado que estos polímeros son sorprendentemente eficientes en la transfección de ingredientes activos farmacéuticos que de otro modo serían incapaces de superar la bicapa lipídica. Dichos ingredientes activos farmacéuticos son compuestos cargados negativamente, tales como biomoléculas poliméricas grandes (por ejemplo ADN, ARN o siARN).

10 Un aspecto adicional de la invención es entonces una composición que comprende el polímero, sales y estereoisómeros del mismo, de fórmula (I), y un compuesto cargado negativamente.

15 Debido a la naturaleza anfílica del polímero de fórmula (I), la composición descrita anteriormente puede ser fácilmente preparada y directamente usada en ensayos de cribado. Así otro aspecto de la invención es un método de cribado que comprende la etapa de poner en contacto la composición descrita anteriormente y una membrana lipofílica. La consistencia de los conjugados poliméricos anfílicos fue validada mediante la reproducibilidad de todos los experimentos de transfección.

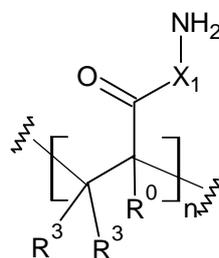
El polímero de fórmula (I) y la composición resultante de su asociación con moléculas cargadas negativamente (por ejemplo ácidos nucleicos) puede ser usado en la preparación de medicamentos (o composiciones farmacéuticas), y así aspectos adicionales de la invención son:

- 20
- El polímero de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo, para su uso como medicamento.
  - El polímero de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo, para su uso en la transfección de células.
  - La composición para uso como medicamento.
  - La composición para uso en la transfección de células.
  - Composiciones farmacéuticas que comprenden la composición de la invención.

25 Los inventores han ideado un método y los reactivos que permiten la preparación de moléculas poliméricas anfílicas adecuadas para transfección de polinucleótidos. Todos los pasos se pueden realizar en medio acuoso. A partir de un novedoso andamiaje polimérico de fácil y fiable preparación es posible introducir una gran diversidad de restos lipofílicos y catiónicos para modular las propiedades del polímero anfílico resultante y, sin purificaciones adicionales, mezclarlo con un ingrediente activo farmacéutico de interés, y probar *in situ* las propiedades de transfección de la composición resultante. También es posible almacenar las existencias de soluciones (stock) de los diferentes compuestos intermedios con el fin de utilizarlos en cualquier momento. El resultado es de una flexibilidad y eficiencia sin precedentes en el cribado de moléculas, y nuevos métodos y precursores para transfección.

35 Aspectos adicionales de la invención son así los precursores del polímero de fórmula (I) y métodos sintéticos de los mismos.

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación del polímero de fórmula (I), las sales y estereoisómeros del mismo, que comprende la etapa de poner en contacto un polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo



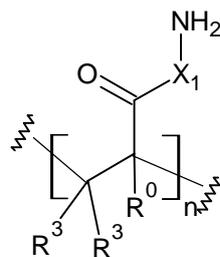
40

(II)

con un aldehído de fórmula  $O=C(H)R^1$  y un aldehído de fórmula  $O=C(H)R^2$ ;

donde n, X<sub>1</sub>, R<sup>0</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son como se definieron anteriormente.

Un aspecto adicional de la invención es un polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo



(II)

donde

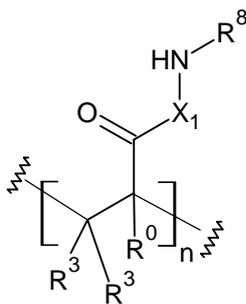
n es el número promedio de unidades de monómeros que es un número entre 10 y 150;

- 5  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ .

- 10 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación del polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo, que comprende la etapa de poner en contacto un polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo, con un medio ácido

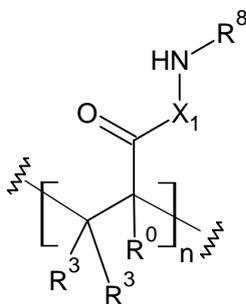


(III)

- 15 donde n,  $X_1$ ,  $R^0$  y  $R^3$  son como se definieron anteriormente; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

Un aspecto adicional de la invención es así un polímero de fórmula (III), sales y estereoisómeros del mismo



(III)

- 20 donde

n es el número promedio de unidades de monómeros que es un número igual o mayor a 10;

# ES 2 618 373 B1

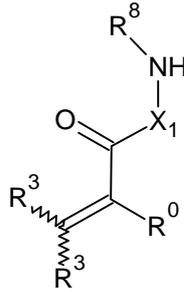
$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;

5  $X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ ; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

10 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de un polímero de fórmula (III), sales y estereoisómeros del mismo, que comprende polimerizar un compuesto de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo, preferiblemente, en la presencia de un iniciador radicalario



donde

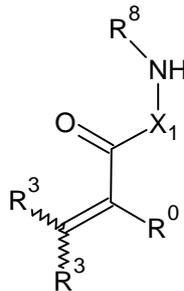
$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ ;

15  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

20 Un aspecto adicional de la invención es un compuesto de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo,



donde

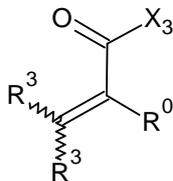
$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ ;

25  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo, que comprende la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula (V), sales y estereoisómeros del mismo, con un grupo protector  $-R^8$  o con un compuesto de fórmula  $-N(H_2)-N(H)-R^8$ ,  $-O-N(H)-R^8$ ,  $-N(H_2)-Alquilo-N(H)-R^8$  y  $-O-Alquilo-N(H)-R^8$



5

(V)

donde

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

10

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$X_3$  se selecciona del grupo que consiste en  $-OH$ , halógeno, O-Alquilo,  $-N(H)-N(H_2)$ ,  $-O-N(H_2)$ ,  $-N(H)-Alquilo-N(H_2)$  y  $-O-Alquilo-N(H_2)$ .

15

El procedimiento anterior proporciona polímeros consistentes en términos de peso molecular y tamaño. Así, la presente invención proporciona moléculas anfífilas con excelente actividad de transfección por medio de un método de cribado flexible y eficiente, donde el proceso, desde los polímeros de fórmula (II) a los ensayos de transfección, incluyendo la funcionalización anfífilica, y la conjugación y el cribado puede ser hecho en medio acuoso sin purificación intermedia.

### Breve descripción de las figuras

20

**Figura 1:** Cambios en la intensidad de emisión normalizada  $I(t)$  (Figura 1A) y curva dosis-respuesta (Figura 1B) para el transporte de ADN Herring ( $125 \mu M$ ) en EYPC-LUVs  $\rightarrow$  HPTS/DPX con incremento de concentraciones del polímero anfífilico preparado usando 15% de benzaldehído y 85% de aldehído de guanidinio del ejemplo 5 (GA-5) como ligandos. Concentraciones de polímero anfífilico (AP):  $75 \mu M$  (O),  $50 \mu M$  (□),  $37.5 \mu M$  (◇),  $25 \mu M$  (×),  $12.25 \mu M$  (+),  $6 \mu M$  (△),  $1.5 \mu M$  (●),  $0.6 \mu M$  (■),  $0.06 \mu M$  (◆).

25

**Figura 2:** Eficiencia de la transfección en HeLa EGFP a una concentración constante del polímero anfífilico ( $12.25 \mu M$ , 15% de *iso*-valeraldehído y 85% de GA-5) e incremento de concentraciones de siEGFP.

30

**Figura 1:** Figura 3A: Eficiencia de transfección en HeLa GFI-EGFP en una concentración constante de siRNA ( $14 \text{ nM}$ ) e incremento de concentraciones de polímeros anfífilicos (e.g. 15% de *iso*-valeraldehído y 85% de GA-5). Figura 3B: Eficiencia de transfección en HeLa EGFP a una concentración constante de siRNA ( $14 \text{ nM}$ ) y concentraciones fijas de polímeros anfífilicos ( $12.25 \mu M$ ) preparados a partir de diferentes porcentajes de *iso*-valeraldehído. Porcentaje de GA-5 = 100% - porcentaje de *iso*-valeraldehído.

35

**Figura 4:** Viabilidad celular obtenida del descenso de fluorescencia y ensayo de citotoxicidad con HeLa-EGFP a concentración constante de siRNA ( $14 \text{ nM}$ ) e incremento de concentraciones de los polímeros anfífilicos (15% de *iso*-valeraldehído y 85% de GA-5) (Figura 4A), a una concentración fija del polímero anfífilico ( $12.25 \mu M$ ) y con diferentes porcentajes de *iso*-valeraldehído (Porcentaje de GA-5 = 100% - porcentaje de *iso*-valeraldehído) (Figura 4B).

40

**Figura 5:** Método general de cribado. Un polímero (1) se mezcla con las cantidades requeridas de aldehídos (3) de fórmula  $O=C(H)R^1$  y aldehídos (2) de fórmula  $O=C(H)R^2$ . El polímero resultante (4) se conjuga entonces con un compuesto negativamente cargado (5), tal como ADN, ARN o siARN. La composición resultante (6) se ensaya entonces en la transfección de membranas modelo o membranas celulares (7).

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

45

Muchos de los compuestos descritos aquí pueden formar sales. Por ejemplo, los polímeros pueden incluir átomos de nitrógeno que pueden ser protonados para formar una carga positiva, y/o ácidos carboxílicos o restos de tiol que pueden ser desprotonados y tener una carga negativa, dependiendo del pH del medio.

Todas estas variaciones son fácilmente disponibles para el experto en la materia en vista a la presente descripción, y son parte de la invención. Tales sales son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitantes son haluros; sulfatos; sales de hidroháluros; fosfatos; alcano sulfonatos de cadena corta; arilsulfonatos; sales de ácidos alifáticos C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> mono-, di- o tribásicos que pueden contener uno o más dobles enlaces, un núcleo arilo u otros grupos funcionales tales como hidroxilo, amino o cetona; sales de ácidos aromáticos en los que el núcleo aromático puede o no estar sustituido con grupos tales como hidroxilo, alcoxilo de cadena corta, amino, mono- o di- alquilamino sulfonamido de cadena corta. Están también incluidos dentro del alcance de la invención las sales cuaternarias de átomos de nitrógeno terciario con haloalquilos o alquilsulfatos de cadena corta, y derivados oxigenados de átomos de nitrógeno terciario, como los N-óxidos. Los compuestos de la presente invención también pueden formar sales con diferentes ácidos o bases inorgánicas, tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o hidróxido sódico, todos incluidos en el ámbito de la presente invención.

Un “**estereoisómero**” en la presente descripción hace referencia a compuestos formados por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes que no son intercambiables.

“**Alquilo**” se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, que está unida al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Si no se da un número de carbonos en un caso específico, se entiende que es un grupo alquilo que tiene entre 1 y 12 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 6, preferiblemente entre 1 y 3 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo pueden ser metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, o incluso mayor, dependiendo del tamaño requerido.

“**Cicloalquilo**” se refiere a un anillo carbocíclico saturado que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso. Grupos cicloalquilo adecuados incluye, pero no está limitado a grupos cicloalquilo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

“**Alqueno**” se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Ejemplos de grupos alqueno pueden ser alilo, butenilo (por ejemplo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo), o pentenilo (por ejemplo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo).

“**Cicloalqueno**” se refiere a un anillo carbocíclico que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, y al menos una insaturación. Grupos cicloalqueno adecuados incluyen, pero no se limitan a grupos cicloalqueno, tales como 1-ciclobutenilo, 2-ciclobutenilo, 1-ciclopentenilo, 2-ciclopentenilo o 3-ciclopentenilo.

“**Alquino**” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, tales como  $-C\equiv CH$ ,  $-CH_2C\equiv CH$ ,  $-C\equiv CCH_3$ ,  $-CH_2C\equiv CCH_3$ .

“**Cicloalquino**” se refiere a un anillo carbocíclico que tiene el número átomos de carbono indicado en cada caso, y al menos un triple enlace. Grupos cicloalquino adecuados incluyen, pero no se limitan a ciclooctinilo, ciclodecino o dodecino.

“**Alquilcarboxiácido**” se refiere a un grupo que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, y comprende (i) un grupo alquilo unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo; y (ii) un derivado carboxi seleccionado de entre ésteres y amidas unido a dicho grupo alquilo.

“**Arilo**” se refiere a un radical hidrocarbonado aromático que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, tales como fenilo o naftilo.

“**Aralquilo**” se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula mediante un grupo alquilo tal como bencilo y fenetilo.

“**Heterociclilo**” se refiere a un anillo estable que tiene el número de átomos de carbono indicado en cada caso, que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 4-8 miembros con uno o más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5 o 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir un sistema de anillos fusionados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo puede estar opcionalmente oxidado; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcialmente o completamente saturado o ser aromático.

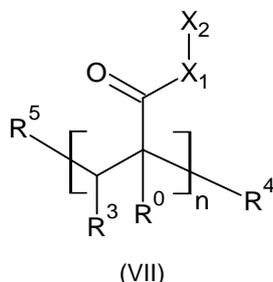
Ejemplos de tales heterociclos incluyen, pero no se limitan a azepinas, benzimidazol, benzotiazol, isotiazol, imidazol, indol, piperidina, piperacina, purina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano.

- 5 “Heteroaril” se refiere a un grupo heterocíclico donde al menos uno de los anillos es un anillo aromático. Cualquiera de los grupos arriba mencionados puede estar opcionalmente sustituido con 1 a 10 grupos seleccionados de halógenos, tales como flúor o uniones éter.

#### Polímeros anfífilicos y composiciones

- 10 Los polímeros de fórmula (I), como se definieron previamente, están conjugados con aldehídos, es decir, modulador positivamente cargado (por ejemplo GA-5) y moduladores hidrofóbicos diferentes (por ejemplo isovaleraldehído). Los polímeros anfífilicos resultantes se combinan con biomoléculas cargadas negativamente para proporcionar las composiciones de la invención, que son adecuadas como agentes de transfección y capaces de generar una amplia librería de candidatos de cribado en un método directo. Los inventores también han confirmado que los polímeros mencionados anteriormente y las composiciones proporcionan resultados positivos en la transfección de diferentes membranas modelo.

- 15 Diferentes variantes de los polímeros de fórmula (I), como se definió anteriormente, serán fácilmente reconocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, un ejemplo representativo de polímeros de acuerdo a la presente descripción es un polímero de fórmula (VII), sales y estereoisómeros del mismo



- 20 donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómero que es un número igual o mayor que 10;

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1$ - $C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

- 25 cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1$ - $C_3$ ;

$R^4$  se selecciona del grupo que consiste en  $-SH$ ,  $-S$ -Alquilo,  $-O$ -Alquilo,  $-OH$  y  $-NH_2$ , preferiblemente,  $-SH$ ,  $-S$ -Alquilo,  $-O$ -Alquilo;

$R^5$  es un alquilcarboxiácido  $C_2$ - $C_{12}$  o un derivado de alquilcarboxiácido  $C_2$ - $C_{12}$ ;

- 30  $X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)$ -Alquilo- y  $-O$ -Alquilo-, preferiblemente donde  $X_1$  es  $-N(H)-$ ;

$X_2$  se selecciona independientemente en cada unidad del grupo que consiste en  $-NH_2$ ,  $-N=C(H)R^1$  y  $-N=C(H)R^2$ ; donde  $R^1$  es un resto lipofílico and  $R^2$  es un resto catiónico; y

donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 1 y 99%;

- 35 donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respect al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 1 y 99%; y

donde la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos catiónicos está comprendido entre 2 y 100%.

- 40 El tamaño de los polímeros de la presente descripción no es de particular relevancia dado que mantienen sus propiedades anfífilicas. Respecto a este tema, la elección de los inventores de un andamiaje polimérico que tiene múltiples grupos  $-X_1$ - $X_2$  disponibles para su funcionalización es una ventaja adicional. Además de la flexibilidad que ya se ha mencionado, el uso de estos polímeros proporciona una mayor funcionalización con menos esfuerzo sintético y permite la identificación rápida de reactivos de transfección eficientes sin toxicidad en modelos celulares como se muestra por el ensayo de viabilidad MTT (Fig. 4A y 4B). Por lo tanto,  $n$  el número promedio de unidades de monómero puede ser un número comprendido entre 10 y 300, por ejemplo
- 45 igual o inferior a 150, tal como entre 20 y 120, por ejemplo entre 30 y 100. El término "anfífilico" en la

presente descripción corresponde al significado generalmente aceptado para el experto en la materia, y por lo tanto se refiere a una molécula que combina las propiedades hidrófilas y lipófilas (hidrofóbicas).

5 Los polímeros de la presente descripción están típicamente basados en derivados de acrilóilo y así de forma general  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo.  $R^3$  es típicamente para todas las unidades hidrógeno o metilo, preferiblemente hidrógeno. El experto en la materia puede reconocer que la metodología descrita en la presente invención puede ser aplicada a diferentes derivados de (met)acrilóilo siguiendo los mismos principios.

10 La polimerización puede ser una polimerización radicalaria, pero otros métodos de polimerización están también disponibles para el experto en la materia. Como se explica más adelante, la reacción de polimerización es típicamente llevada a cabo en la presencia de un agente de transferencia de cadena (CTA), y así los polímeros de la invención pueden terminar en ambas terminaciones con restos derivados de tales CTAs. Otros métodos de polimerización son posibles, y esos restos no son de particular relevancia para la función de la composición de la invención y el experto en la materia puede seleccionar de entre una amplia variedad de CTAs comerciales (o cualquier otro método disponible de polimerización), por ejemplo, derivados que combinan un resto ((etil)carbonotio) y un ácido carboxílico, que daría lugar a un polímero de fórmula (VII) donde  $R^4$  es  $-SH$  y  $R^5$  es un alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$ , por ejemplo, que tiene la fórmula  $-(R^6)(R^7)C-C(=O)OH$ , donde  $R^6$  y  $R^7$  son cada uno seleccionados independientemente de un grupo alquilo  $C_1-C_3$  o hidrógeno, preferiblemente donde  $R^6$  y  $R^7$  son ambos metilo. Detalles adicionales se proporcionan en la sección de síntesis más adelante.

15 Sin embargo, la estructura de  $R_4$  y  $R_5$  puede variar dependiendo del método de polimerización usado y los reactivos particulares en cada caso. El uso de la polimerización de transferencia atómica (ATRP) o polimerización radicalaria por mediación de nitróxido (NMP) darán lugar a polímeros que tienen las mismas unidades descritas aquí, pero con diferentes terminaciones  $R_4$  y  $R_5$ . ATRP generalmente emplea un complejo de metal de transición como catalizador con un haluro de alquilo como iniciador, dando la posibilidad de que  $R_4$  sea un átomo de halógeno. Otros posibles mecanismos pueden ser reconocidos por el experto en la materia y pueden ser encontrados en las referencias de libros tales como 1) Matyjaszewski, K., y Möller, M. (Eds.). *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier B.V. vol 3 Chain Polymerization of Vinyl Monomers; o 2) Tsarevsky, N. V., y Sumerlin, B. S. (Eds.). (2013) *Fundamentals of Controlled/Living Radical Polymerization*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. Además, las terminaciones  $R_4$  o  $R_5$  pueden ser funcionalizadas de modo que incluyan otras moléculas que pueden ayudar en el cribado, tales como cromóforos o agentes de direccionamiento.

25 El grupo  $X_1$  es puente entre el esqueleto polimérico y el átomo de nitrógeno al que se adherirán los restos lipófilos y catiónicos. Es preferido que  $X_1$  and  $X_2$  juntos formen un grupo  $(-N(H)-N(H)-)$  o un grupo  $(-N(H)-N=)$ , ya que los inventores han descubierto que las carbazonas protegidas se pueden hacer reaccionar fácilmente con los monómeros de acrilóilo y después se polimerizan y se desprotegen con facilidad (véase más adelante). Por lo tanto, se prefiere que en los polímeros de la presente descripción  $X_1$  sea  $-N(H)-$ . Otros polímeros en los que  $X_1$  es  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  o  $-O-Alquilo$  también son adecuados y fácilmente disponibles siguiendo los procedimientos de síntesis mostrados en el presente documento (véase más adelante).

35 Uno de los aspectos clave de los polímeros y métodos de la presente descripción es la posibilidad de funcionalizar el esqueleto polimérico con una amplia gama de residuos lipofílicos y catiónicos con una flexibilidad y sencillez sin precedentes. Como resultado de los polímeros descritos aquí y las correspondientes composiciones se puede incluir una amplia variedad de restos lipofílicos y restos catiónicos (hidrofílicos).

40 A los términos "lipofílico" o "hidrofóbico", como se usan aquí, se les da su significado normal en el estado de la técnica, y se refiere a sustancias que tienen una mayor solubilidad en lípidos que en medio acuoso. Cuando se consideran restos lipofílicos en el campo de la química, el experto en la materia tiene en su mano una gran variedad de posibilidades para seleccionar y es de entendimiento generalizado qué sustancias impartirán lipofilidad y cuales no. Tales grupos están ampliamente descritos en bibliografía, por ejemplo en C. Gehin, J. Montenegro, E.-K. Bang, A. Cajaraville, S. Takayama, H. Hirose, S. Futaki, S. Matile, H. Riezman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9295–9298, ya discutidos en los antecedentes. Preferiblemente, el término "lipofílico" se refiere a restos que tienen un valor de  $\log K_{ow}$  superior a 1.0, más preferiblemente un valor de  $\log K_{ow}$  superior a 2.0, donde el valor de  $\log K_{ow}$  se mide por el comportamiento de la distribución del resto en un sistema bifásico tal como en la prueba de partición octanol/agua. Esta prueba implica la medida de la concentración de equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema de dos fases de octanol y agua también como un método cromatográfico y se describe en ASTM E1147.

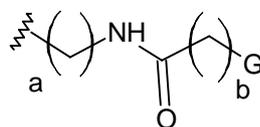
45 Generalmente, la lipofilidad se conseguirá por moléculas orgánicas, tales como hidrocarburos (por ejemplo alquilo, alqueno, arilo y similares). Estas moléculas son generalmente apolares, aunque pueden contener una pequeña cantidad relativa de grupos polares o grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno. Ejemplos de grupos  $R^1$  son aquellos en los que el aldehído correspondiente está fácilmente disponible (comercial o fácil de sintetizar). Así,  $R^1$  se puede seleccionar del grupo que consiste en alquilo  $C_1-C_{40}$ ,

alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>40</sub>, cicloalqueno C<sub>4</sub>-C<sub>40</sub>, cicloalquino C<sub>5</sub>-C<sub>40</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>40</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>40</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>40</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 10 grupos seleccionados de halógenos tales como flúor o enlaces éter. Preferiblemente, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo consistente en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalqueno C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquino C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados de halógeno tales como flúor o enlaces éter. Preferiblemente, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados de halógeno tal como flúor o enlaces éter. Ejemplos de los grupos R<sup>1</sup> son aquellos que corresponden a aldehídos disponibles (comerciales o fáciles de sintetizar). Ejemplos de grupos arilo y alquilarilo son fenilo, naftilo, fenilo sustituido con alquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> (por ejemplo metilfenil), o bifenil. Ejemplos de grupos alquilo y cicloalquilo tienen de 3 a 7 átomos de carbono y pueden ser ciclopentilo, ciclohexilo, butilo, terc-butilo, propilo, isopropilo, neopentilo, neobutilo (iso-valerilo), pentilo, hexilo. Se ha conseguido una excelente actividad de transfección cuando R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>. Ejemplos de grupos heteroarilo son imidazoilo, furilo o tiofenilo.

R<sup>2</sup> es un resto catiónico que imparte hidrofiliidad a los polímeros y composiciones de la presente descripción. R<sup>2</sup> típicamente comprende un grupo catiónico que tiene un heteroátomo cargado positivamente. Tal grupo catiónico está positivamente cargado al pH al cual está expuesto para el ensayo o aplicación médica, típicamente cuando está protonado tiene un pka (pKaH) superior a 4, o un pka sobre 7, por ejemplo un grupo que se protonará al pH del medio, por ejemplo pH fisiológico. Ejemplos no limitantes de grupos catiónicos son bencimidazolío (pKaH aproximadamente por encima de 5.6), imidazolío (pKaH aproximadamente por encima de 7.0), morfolinio (pKaH aproximadamente por encima de 8.76), piperacino (pKaH aproximadamente por encima de 9.8), azepanio (pKaH aproximadamente por encima de 11.07), piperidinio (pKaH aproximadamente por encima de 11.22), pirrolidinio (pKaH aproximadamente por encima de 11.27), indolinio (pKaH aproximadamente por encima de 16.2), amonio (pKaH aproximadamente por encima de 9.25), fosfonio (pKaH aproximadamente por encima de 9) o grupos guanidinio (pKaH aproximadamente por encima de 13), por ejemplo, amonio (pKaH aproximadamente por encima de 9.25), fosfonio (pKaH aproximadamente por encima de 9) o grupos guanidinio (pKaH aproximadamente por encima de 13).

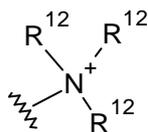
Los grupos catiónicos pueden ser un residuo de fórmula -L-G, donde L es un conector (linker) y G un grupo cargado positivamente. La naturaleza específica del grupo conector L o de G no es crítica. Compuestos sencillos y comercialmente disponibles de fórmula O=C(H)-R<sup>2</sup> que se pueden usar en la presente invención son compuestos de fórmula (IX) O=C(H)-Z-G, donde Z es un grupo que comprende 1 a 40 átomos de carbono, y G es un grupo cargado positivamente. El grupo Z puede ser un grupo alquilo (por ejemplo un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), un grupo cicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, que contiene o no el grupo G en el anillo del esqueleto molecular, puede comprender un anillo aromático o un grupo heterocíclico o heteroarilo, que contiene o no un grupo G en el anillo del esqueleto molecular, todos ellos pueden estar opcionalmente sustituidos. G puede ser amonio, fosfonio o guanidinio positivamente cargado. Por ejemplo, el compuesto de fórmula O=C(H)-R<sup>2</sup> puede ser un compuesto de fórmula (X) O=C(H)-Y-G, donde Y se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, opcionalmente incluyendo como parte de la cadena de alquilo de entre 1 a 3 grupos amido o grupos éster, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>, heterociclilo C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub> y heteroarilo C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub>, todos opcionalmente sustituidos, y G es un grupo amonio, fosfonio o guanidinio positivamente cargado. Así, por ejemplo, Y puede ser una cadena de alquilo -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- que tiene de 1 a 12 átomos de carbono (r=1-12) o un grupo fenilo. Ejemplos de moléculas que se pueden usar como restos catiónicos son betain aldehído, 4-(trimetilamino)butiraldehído, 4-(dimetilamino)benzaldehído, hidrocloreto de 1-(3-formil-4-hidroxifenil)guanidino (Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2003, vol. 51, # 6 p. 625), 1-(4-formilfenil)guanidino (SU172307), 1-(5-formil-4-metil-tiazol-2-il)guanidino (US6521643), hidrocloreto de piperidin-4-carbaldehído (hidrocloreto de piperidin-4-carbaldehído), 1-(4-oxobutil)guanidino (Biochemical Journal, 2015, vol. 468, # 1 p. 109).

Un ejemplo adicional de un grupo R<sup>2</sup> es un resto de fórmula (XI)



donde a es un número entre 1 y 6, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo entre 1 y 3; b es un número entre 1 y 6, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo entre 1 y 3; y G es un amonio, fosfonio o guanidinio positivamente cargado.

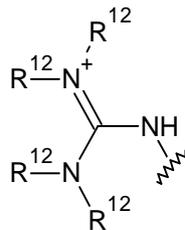
Los grupos amonio son típicamente de fórmula -N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, pero otras posibilidades pueden ser reconocidas por un experto en la materia, tal como un grupo de fórmula (XII)



(XII)

- 5 donde cada grupo R<sup>12</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquinilo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>.

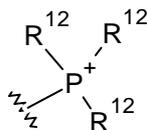
Grupos guanidinio son típicamente de fórmula  $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+$ , pero otras posibilidades pueden ser reconocidas por el experto en la materia, tales como un grupo de fórmula (XIII)



(XIII)

- 10 donde cada grupo R<sup>12</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquinilo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>.

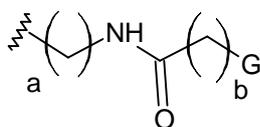
Grupos fosfonio son típicamente de fórmula  $-\text{P}^+\text{H}_3$ , pero otras posibilidades pueden ser reconocidas por el experto en la materia, tales como un grupo de fórmula (XIV)



(XIV)

- 15 donde cada grupo R<sup>12</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquinilo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>, alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>.

- 20 Los correspondientes aldehídos que portan un resto de fórmula (XI), donde b es entre 1 y 4 son nuevos según nuestro conocimiento. Así, un aspecto adicional de la invención es un compuesto de fórmula  $\text{O}=\text{C}(\text{H})-\text{R}^{11}$ , donde R<sup>11</sup> es un resto de fórmula (XI)



(XI)

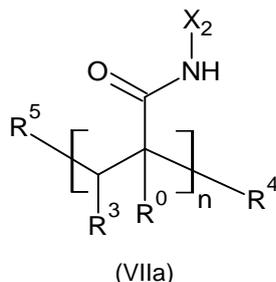
- 25 donde a es un número entre 1 y 6; b es un número entre 1 y 4; y G es amonio, fosfonio o guanidinio cargado positivamente.

- Los polímeros de la invención permiten un cribado extraordinariamente flexible, y la anfifilicidad de los polímeros y composiciones pueden ser modulados mediante la naturaleza de los restos lipofílicos y catiónicos, también como mediante la proporción de cada uno de ellos. Así, el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos X<sub>2</sub> puede ser comprendido entre 5 y 70%, preferiblemente entre 7 y 60%, preferiblemente entre 7 y 20%, más preferiblemente entre 10 y 20%. También, se puede entender fácilmente que se pueden hacer diferentes mezclas de restos catiónicos y así proporcionar un polímero de fórmula (I) donde se ha incorporado más de un tipo de molécula catiónica. También, se puede entender fácilmente que se pueden hacer diferentes mezclas de restos lipofílicos y así proporcionar un polímero de fórmula (I) donde se ha incorporado más de un tipo de molécula lipofílica. El porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos X<sub>2</sub> puede ser comprendido entre 10 y 99%, preferiblemente entre 40 y 95%, preferiblemente entre 60 y 90%, más preferiblemente entre 65 y 85%. Al mismo tiempo, la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos
- 30
- 35

## ES 2 618 373 B1

5 cationicos puede estar comprendido entre 40 y 80%. El porcentaje de restos lipofílicos  $R^1$  (% de  $R^1$ ) es cien veces el resultado de dividir el número promedio de grupos  $R^1$  (número de  $R^1$ ) entre el número promedio total de posiciones  $X_2$  disponibles (posiciones  $X_2$ ), por ejemplo % de  $R^1=100x(\text{número de } R^1)/(\text{posiciones } X_2)$ . El porcentaje de restos lipofílicos  $R^2$  (% de  $R^2$ ) es cien veces el resultado de dividir el número promedio de grupos  $R^2$  (número de  $R^2$ ) entre el valor promedio total de posiciones  $X_2$  disponibles (posiciones  $X_2$ ), por ejemplo % de  $R^2=100x(\text{número de } R^2)/(\text{posiciones } X_2)$ .

10 En vista de lo anterior y de los ejemplos específicos aportados, el experto en la materia puede concebir diferentes combinaciones de los parámetros anteriores y sustituyentes, todos ellos comprendidos en la presente descripción. Por ejemplo, el polímero de la invención puede ser un polímero de fórmula (VIIa), sales y estereoisómeros de los mismos



donde

15  $n$  es el número promedio de unidades de monómero que es un número comprendido entre 10 y 70;  
 $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

$R^3$  es hidrógeno o metilo;

20  $R^4$  se selecciona del grupo que consiste en  $-SH$ ,  $-S$ -Alquilo,  $-O$ -Alquilo,  $-OH$  y  $-NH_2$ , preferiblemente,  $-SH$ ,  $-S$ -Alquilo,  $-O$ -Alquilo;

$R^5$  es un alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$  o un derivado alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$ ;

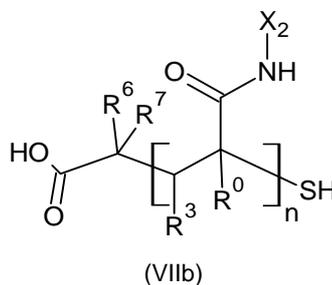
$X_2$  se selecciona independientemente en cada unidad del grupo que consiste en  $-NH_2$ ,  $-N=C(H)R^1$  y  $-N=C(H)R^2$ ; donde  $R^1$  es un resto lipofílico y  $R^2$  es un resto catiónico; y

25 donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 5 y 30%;

donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 60 y 90%; y

donde la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos catiónicos está comprendido entre 5 y 95%.

30 Un ejemplo adicional, puede ser un polímero de fórmula (VIIb), sales y estereoisómeros de los mismos



donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómero que es un número comprendido entre 10 y 70;

35  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

$R^3$  es hidrógeno o metilo;

$R^6$  y  $R^7$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo  $C_1-C_3$ ;

## ES 2 618 373 B1

$X_2$  se selecciona independientemente en cada unidad del grupo que consiste en  $-NH_2$ ,  $-N=C(H)R^1$  y  $-N=C(H)R^2$ ; donde  $R^1$  es un resto lipofílico y  $R^2$  es un resto catiónico; y

donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 5 y 30%;

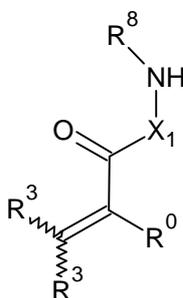
5 donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 60 y 90%; y

donde la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos catiónicos está comprendido entre 5 y 95%.

### 10 Preparación de los Polímeros

Los polímeros y composiciones aquí descritas pueden ser sintetizados a partir de materiales fácilmente disponibles.

La síntesis comienza con la preparación del monómero apropiado de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo,



(IV)

donde

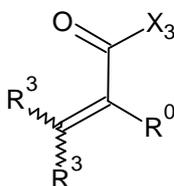
$X_1$  es un grupo seleccionado del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ , preferiblemente  $-N(H)-$ ;

20  $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

cada  $R^3$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

25 que comprende la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula (V), sales y estereoisómeros del mismo, con un grupo protector  $-R_8$ , preferiblemente lábil en medio ácido, o con un compuesto de fórmula  $-N(H_2)-N(H)-R_8$ ,  $-O-N(H)-R_8$ ,  $-N(H)-Alquilo-N(H)-R_8$  y  $-O-Alquilo-N(H)-R_8$



(V)

30

donde

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo;

## ES 2 618 373 B1

cada  $R^3$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$X_3$  se selecciona del grupo que consiste en  $-OH$ , halógeno, O-alquilo,  $-N(H)-N(H_2)$ ,  $-O-N(H_2)$ ,  $-N(H)-Alquilo-N(H_2)$  y  $-O-Alquilo-N(H_2)$ .

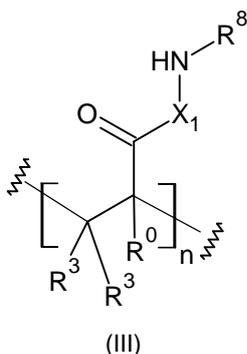
- 5 La reacción tiene lugar típicamente en la presencia de un disolvente apropiado, preferiblemente un disolvente en base acuosa, y una base adecuada. Los compuestos de fórmula  $-N(H_2)-N(H)-R_8$  son carbazatos. Diferentes carbazatos están disponibles al experto en la materia, por ejemplo t-butil carbazato, bencil carbazato, etil carbazato, metil carbazato o mezclas de los mismos. Los compuestos de fórmula  $-O-N(H)-R_8$  son hidroxil aminas protegidas, muchas de las cuales están disponibles comercialmente, tales como N-Boc-hidroxilamina o N-(Benziloxicarbonil)hidroxilamina. Con el fin de preparar los compuestos de fórmula (IV) donde  $X_1$  es  $-N(H)-Alquilo-$  o  $-O-Alquilo-$ , el experto en la materia puede hacer reaccionar un compuesto de fórmula (V) donde  $X_3$  es  $-OH$ , halógeno o  $-OR$ , con un compuesto de fórmula  $-N(H_2)-Alquilo-N(H)-R_8$  o  $-O-Alquilo-N(H)-R_8$ . Alternativamente, es posible proteger directamente con el grupo protector  $-R_8$  un compuesto de fórmula (V) donde  $X_3$  es  $-N(H)-Alquilo-N(H_2)$  o  $-O-Alquilo-N(H_2)$ ; tales compuestos de fórmula (V) están comercialmente disponibles, por ejemplo hidrocloreuro de 2-Aminoetil metacrilato o hidrocloreuro de N-(3-Aminopropil)metacrilamida (disponibles en Aldrich®).

10 Ya que el residuo  $R^8$  actúa como un grupo protector amino durante la polimerización, está diseñado para ser lábil, preferiblemente bajo condiciones ácidas, con el fin de escindirlo una vez que la polimerización esté completa. "Grupo protector" en la presente invención se refiere a un grupo que bloquea un grupo funcional orgánico y puede ser eliminado bajo condiciones controladas. Grupos protectores, sus reactividades relativas y condiciones bajo las cuales permanecen inertes son conocidos por el experto en la materia. "Grupo protector amino" se refiere a un grupo que bloquea la función  $-NH_2$  o  $-N(H)-NH_2$  para otras reacciones y puede ser eliminado bajo condiciones controladas. Los grupos protectores amino son bien conocidos en la técnica, grupos protectores representativos son

- 25
- amidas de fórmula  $-C(=O)R^9$ , tales como acetato amida, benzoato amida; pivalato amida; metoxiacetato amida; cloroacetato amida; levulinato amida;
  - carbamatos de fórmula  $-C(=O)-O-R^9$ , tales como bencil carbamato, p-nitrobencil carbamato, terc-butil carbamato, etil carbamato, 2,2,2-tricloroetil carbamato, 2-(trimetilsilil)etil carbamato.

30 En todas las fórmulas anteriores  $R^9$  representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en alquilo  $C_1-C_6$ , arilo  $C_6-C_{15}$  o aralquilo. Son preferidos los carbamatos de fórmula  $-(O=C)-O-R^9$ , donde  $R^9$  es un grupo alquilo  $C_1-C_{12}$ .

Ejemplos adicionales de grupos protectores amino se pueden encontrar en libros de referencia tales como Greene y Wuts' "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Inc., New York, 4<sup>th</sup> Ed., 2007. La siguiente etapa en la síntesis es la preparación del correspondiente polímero de fórmula (III), sales y estereoisómeros del mismo mediante la polimerización de un compuesto de fórmula (IV), preferiblemente, en presencia de un iniciador de radicales

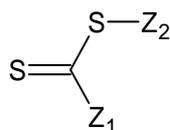


donde

- 40  $n$  es el número promedio de unidades de monómeros que es un número igual o mayor a 10;
- $R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo
- cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;
- 45  $X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ ; y
- $R^8$  es un grupo protector, preferiblemente lábil en medio ácido.

Típicamente la polimerización tiene lugar en medio acuoso. Cuando se usa una polimerización radicalaria diferentes iniciadores de radicales están disponibles en la técnica e incluyen tanto compuestos peróxido como azo compuestos. Ejemplos de iniciadores de radicales libres disponibles son catalizadores peróxido como dibenzoil peróxido, lauroil peróxido, t-amilperoxi-2-etilhexanoato, di-t-butil peróxido, diisopropil peróxido carbonato, t-butil peroxi-2-etilhexanoato, t-butilperpivalato, t-butilperneo-decanoato, t-butilperbenzoato, t-butil percrotonato, t-butil perisobutirato, t-butilperoxi-l-metilpropanoato, t-butilperoxi-2-etilpentanoato, t-butilperoxioctanoato y di-t-butilperftalato. Ejemplos de azo compuestos son azobis-isobutironitrilo (AIBN), ácido 4,4'-azobis(4-cianovalerico) (ACVA) y azobis-(2-metilbutanonitrilo). La cantidad de iniciador puede variar desde 0,01 por ciento en peso a 5 por ciento en peso basado en el peso total de monómero(s).

Típicamente la polimerización tiene lugar en presencia de un Agente de Transferencia de Cadena (CTA), también conocido como "Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer" (RAFT), que es conocido por el experto en la materia. Ejemplos no limitantes son los descritos en US2015024488 o en US2012128743. El CTA puede ser un compuesto de fórmula (XV) o sales de los mismos

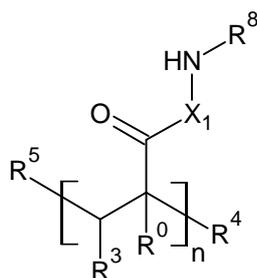


(XV)

donde  $Z_1$  es un grupo hidrofóbico y  $Z_2$  es un grupo hidrofílico. Este grupo de CTAs es ampliamente conocido en la técnica y descrito, por ejemplo, en US2012128743. Preferiblemente,  $Z_1$  es un tiol tal como un grupo  $R^{10}-S-$ , donde  $R^{10}$  es un alquilo  $C_1-C_{20}$ , arilo  $C_1-C_{20}$  o un arilalquilo  $C_1-C_{20}$ , preferiblemente uno de tal manera que el resto  $Z_1-C(=S)-$  es lábil bajo condiciones ácidas con el fin de ser escindido al mismo tiempo que el grupo  $R^8$ . Preferiblemente,  $Z_2$  es un alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$  o un derivado alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$ , como por ejemplo  $-\text{alquil}-CO_2H$ ,  $-\text{alquil}-C(=O)(NH_2)$ ,  $-\text{alquil}-SO_3$ . El CTA es preferiblemente ácido 2-(((etiltio)carbonotioil)tio)-2-metilpropanoico.

El experto en la materia puede reconocer que cualquier otro método para la polimerización de derivados de (met)acrililo está disponible para los propósitos de la presente invención en tanto que el resultado de la reacción es la formación de polímeros de fórmula (III). Otros métodos para polimerizar derivados de (met)acrililo incluyen pero no se limitan a Polimerización Radicalaria de Transferencia Atómica (ATRP), Polimerización mediada por Nitroxido (NMP), Transferencia Degenerativa con Yoduro de Alquilo, Polimerización por Transferencia de Cadena catalizada con Cobalto, Polimerización radicalaria mediada por organometálicos (OMRP), Polimerización Aniónica, Polimerización Catiónica, Polimerización Alqueno Metaloceno o Polimerización viva de alquenos catalizada por metales de transición. Ejemplos adicionales de métodos de polimerización pueden ser encontrados en libros de referencia como Matyjaszewski, K., and Möller, M. (Eds.). Polymer Science: A Comprehensive Reference. Elsevier B.V.

Así, un polímero preferido de fórmula (III) es un compuesto de fórmula (IIIa), sales y estereoisómeros del mismo



(IIIa)

donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómeros que es un número igual o mayor a 10;

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

$R^3$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;

$R^4$  se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S-Alquilo}$ ,  $-\text{O-Alquilo}$ ,  $-\text{OH}$  y  $-\text{NH}_2$ , preferiblemente,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S-Alquilo}$ ,  $-\text{O-Alquilo}$ ;

## ES 2 618 373 B1

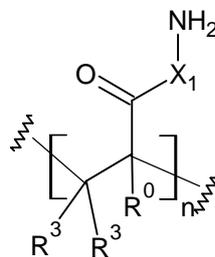
$R^5$  es un alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$  o un derivado de alquilcarboxiácido  $C_2-C_{12}$ ;

$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ , preferiblemente  $-N(H)-$ ; y

$R^8$  es un grupo lábil en medio ácido.

- 5 Ejemplos adicionales de agentes de transferencia de cadena incluyen mercapto compuestos, tales como ácido tioglicólico, ácido tiomálico, ácido tiosalicílico, ácido 2-mercaptopropiónico, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 3-mercaptobutírico, N-(2-mercaptopropionil)glicina, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido 3-[N-(2-mercaptoetil)carbamoil]propiónico, ácido 3-[N-(2-mercaptoetil)amino]propiónico, N-(3-mercaptopropionil)alanina, ácido 2-mercaptoetanosulfónico, ácido 3-mercaptopropanosulfónico, ácido 4-mercaptobutanosulfónico, dodecil (4-metil)fenil éter, 2-mercaptoetanol, 3-mercapto-1,2-propanodiol, 1-mercapto-2-propanol, 3-mercapto-2-butanol, mercaptofenol, 2-mercaptoetilamina, 2-mercaptoimidazol, 2-mercapto-3-piridinol, 2-mercaptobenzotiazol, ácido mercaptoacético, trimetilopropano tris(3-mercaptopropionato), y pentaeritritol tetrakis(3-mercaptopropionato); compuestos disulfuro obtenidos mediante oxidación de los mercapto compuestos citados; y compuestos alquil yodados, tales como ácido yodoacético, ácido yodopropiónico, 2-yodoetanol, ácido 2-yodoetanosulfónico, y ácido 3-yodopropanosulfónico.

Una vez que se obtiene el polímero protegido, la desprotección tiene lugar bajo condiciones ácidas con el fin de proporcionar el polímero correspondiente de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo



(II)

20

donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómeros que es un número entre 10 y 150;

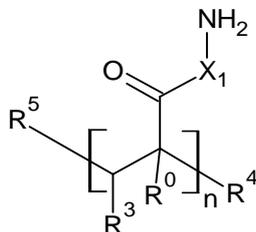
$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

25

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ; y

$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ , preferiblemente  $-N(H)-$ .

Un polímero preferido de fórmula (II) es un polímero de fórmula (IIa), sales y estereoisómeros del mismo



(IIa)

30

donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómeros que es un número entre 10 y 150;

35

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN, por ejemplo, donde  $R^0$  es hidrógeno o metilo

$R^3$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;

$R^4$  se selecciona del grupo que consiste en -SH, -S-Alquilo, -O-Alquilo, -OH y -NH<sub>2</sub>, preferiblemente, -SH, -S-Alquilo, -O-Alquilo;

$R^5$  es un alquilcarboxiácido C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> o un derivado de alquilcarboxiácido C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>; y

5  $X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en -N(H)-, -O-, -N(H)-Alquilo- y -O-Alquilo-, preferiblemente -N(H)-.

La etapa final en la preparación de los polímeros de fórmula (I) es la funcionalización de los átomos de nitrógeno disponibles con los aldehídos de los correspondientes grupos  $R^1$  (lipofílico) y  $R^2$  (catiónico), por ejemplo con aldehídos de fórmula O=C(H)- $R^1$  y O=C(H)- $R^2$ , donde  $R^1$  y  $R^2$  son como se definen en otras partes de la presente descripción. La reacción comprende poner en contacto los aldehídos de fórmula O=C(H)- $R^1$  y O=C(H)- $R^2$  con el polímero en un medio apropiado, preferiblemente medio acuoso, y transcurre suavemente. Ambos aldehídos de fórmula O=C(H)- $R^1$  y O=C(H)- $R^2$  pueden ser simultáneamente o secuencialmente puestos en contacto con el polímero. Como ya se discutió, el método permite cambiar fácilmente la proporción o la cantidad total en la que los aldehídos se incorporan al polímero. Los equivalentes añadidos no son particularmente relevantes y la invención funciona en un amplio rango de cargas de aldehídos. El experto en la materia puede determinar qué cantidades y proporciones son las más adecuadas para cada caso particular y condiciones típicas son aquellas en las que dicho aldehído de fórmula O=C(H)- $R^1$  y dicho aldehído de fórmula O=C(H)- $R^2$  se añaden en cantidades, por ejemplo, comprendidas entre 0.001 y 10 equivalentes con respecto a la cantidad total de restos NH<sub>2</sub> disponibles, por ejemplo entre 0.01 y 4 o entre 0.01 y 3, típicamente entre 0.1 y 2.5 equivalentes.

20

#### Métodos de cribado

El método general de cribado de la presente descripción se muestra en la Figura 5. Un polímero (1) de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo, se mezcla con cantidades seleccionadas de dichos aldehídos (3) de fórmula O=C(H)- $R^1$  y dichos aldehídos (2) de fórmula O=C(H)- $R^2$ , con el fin de proporcionar un polímero (4) de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo, el cual es conjugado entonces con un compuesto negativamente cargado (5), típicamente un ácido nucleico, tal como ADN, ARN o siARN. La composición resultante (6) se somete entonces a transfección en células, membranas o modelos de membrana (7).

Preferiblemente, un polímero (1) de fórmula (IIa), sales o estereoisómeros del mismo, se mezcla con cantidades seleccionadas de dichos aldehídos (3) de fórmula O=C(H)- $R^1$  y dichos aldehídos (2) de fórmula O=C(H)- $R^2$ , con el fin de proporcionar un polímero (4) de fórmula (VII), sales y estereoisómeros del mismo, el cual se conjuga entonces con un compuesto cargado negativamente (5), típicamente un ácido nucleico, tal como ADN, ARN or siARN. La composición resultante (6) se somete entonces a transfección a una membrana o modelo de membrana (7).

Ejemplos adicionales de ácidos nucleicos son posibles y pueden comprender, por ejemplo, uno o más de plásmidos de DNA (pDNA), cosmidos, ARN de doble cadena (dsRNA), ARN de interferencia (siRNA), microARN endógeno (miRNA), ARN de horquilla corta (shRNA), oligodesoxinucleótidos (ODN), transcritores de ARN primario (pri-miRNA). Estos y otros se describen en bibliografía, como (1) Deng, Y., Wang, C. C., Choy, K. W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T. K. H., and Tang, T. (2014) "Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies" *Gene* 538, 217–227; (2) Li, Z., and Rana, T. M. (2014) "Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges" *Nat. Rev. Drug Discovery* 13, 622–638; or (3) Alexander, C., and Fernandez-Trillo, F. (2013) "Bioresponsive Polyplexes and Micelleplexes, in Smart Materials for Drug Delivery" (Alvarez-Lorenzo, C., and Concheiro, A., Eds.) 1st ed., pp 256–282. Royal Society of Chemistry.

Ácidos nucleicos artificiales tales como XNAs o PNAs también se pueden usar. Ejemplos de los mismos se pueden encontrar en (1) Turner, J. J., Jones, S., Fabani, M. M., Ivanova, G., Arzumanov, A. A., and Gait, M. J. (2007) "RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA" *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 1–7; (2) Pinheiro, V. B., and Holliger, P. (2012) "The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers" *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 245–252; (3) Pinheiro, V. B., and Holliger, P. (2014) "Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers" *Trends Biotechnol.* 32, 321–328.

Una de las ventajas claves del presente método de cribado es que todas las etapas desde el polímero (1) al ensayo de transfección del compuesto (6) pueden ser llevadas a cabo en medio acuoso sin purificación de los intermedios. Por ejemplo, se pueden hacer soluciones del polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo, para almacenar y más tarde mezclarlas con diferentes aldehídos en paralelo y/o experimentos automatizados, cada polímero resultante conjugado con una molécula de interés estando negativamente cargada, y la composición resultante sometida a transfección.

Así, un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende un polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo.

Un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende un polímero de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo.

5 Un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende la composición de la invención que comprende un polímero de fórmula (I), sales y estereoisómeros del mismo y una molécula negativamente cargada.

10 Las composiciones resultantes del método de cribado de la invención pueden así ser usadas como medicamento, específicamente en la cesión de moléculas biológicamente activas que tienen una carga negativa las cuales de otra manera con incapaces de traspasar la membrana lipídica. La presente invención incluye así una composición farmacéutica que comprende las composiciones de la invención y vehículos farmacéuticamente aceptables y/o otras sustancias auxiliares.

15 El medicamento o composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la aplicación a humanos y/o a animales, preferiblemente humanos incluyendo bebés, niños y adultos y pueden ser producidos por procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia. El medicamento puede ser producido mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo de la tabla de contenidos de "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms", Second Edition, Aulton, M.E. (ED. Churchill Livingstone, Edinburgh (2002); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Second Edition, Swarbrick, J. and Boylan J.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York (2002); "Modern Pharmaceutics", Fourth Edition, Banker G.S. and Rhodes C.T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York 2002 y "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. And Kanig J. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia (1986). La composición del medicamento puede variar dependiendo de la ruta de administración, y generalmente comprende mezclar las composiciones de la invención con vehículos adecuados y/o otras sustancias auxiliares. Los vehículos y sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica de administración deseada de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricará de acuerdo a métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Una revisión de métodos de administración de diferentes ingredientes activos, excipientes empleados y procesos para producirlos se pueden encontrar en "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

25 Ejemplos no limitantes son preparaciones para administración oral, por ejemplo, tabletas, cápsulas, jarabes o suspensiones. También, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir composiciones tópicas, por ejemplo cremas, ungüentos y pastas, o preparados transdérmicos como parches o emplastos.

30 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen reacciones alérgicas o similares reacciones adversas, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en los seres humanos.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1: Materiales y Métodos**

40 Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III 300 MHz, Bruker Avance III 400 MHz, Varian Mercury 300 MHz o un Varian Inova 500 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$  units) respecto a las siguientes señales de disolventes de referencia: DMSO-d<sub>6</sub>  $\delta$ H 2.50, D<sub>2</sub>O  $\delta$ H 4.79 and CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ H 7.26. El grado promedio de polimerización (DP) (por ejemplo la relación entre unidades de monómero y grupos terminales) en polímeros de fórmula (II) se calculó mediante espectro <sup>1</sup>H-NMR por comparación de la integración de los sustituyentes metilo en los grupos terminales (0.95 and 1.01 ppm, 6 H) con la integración de la región alifática en el esqueleto del polímero (1.59-2.08 ppm). La espectroscopía de masas de ionización de electrospray (ESI-MS) para la caracterización de los nuevos compuestos se llevó a cabo en un instrumento Finnigan MAT SSG 7000 o un ESI API 150EX y se registró como la relación de la masa por la carga m/z (intensidad en %, [asignación]). Las determinaciones precisas de masa (HR-MS) usando ESI-MS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas Sciex QSTAR Pulsar. Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum Two FT-IR. Los espectros de Ultravioleta-visible (UV-vis) se registraron en un Campsec M550 Double Beam Scanning UV-vis Spectrophotometer. DP en el polímero de fórmula (III) se calculó midiendo la absorbancia a 300, 305 y 310 nm y comparándolas frente a una curva de calibración usando CTA. La cantidad (mg·mL<sup>-1</sup>) de CTA en polímeros de fórmula (III) se obtuvo de este modo y se calculó el DP. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrofluorímetro FluoroMax-2 (Jobin-Yvon Spex) equipado con un agitador y un controlador de temperatura. Los espectros de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se registraron en un Shimadzu Prominence LC-20A equipado con un Thermo Fisher

Refractomax 521. Los polímeros de fórmula (III) se analizaron usando 0.05 M LiBr en DMF a 60 °C como eluyente y un flujo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. El instrumento se equipó con una precolumna Polymer Labs PolarGel (50 × 7.5 mm, 5 µm) seguida de dos columnas PLGel PL1110-6540 (300 × 7.5 mm, 5 µm). Los pesos moleculares se calcularon en base al método de calibración estándar usando polimetilmetacrilato (ver (1) Pasch, H. Chromatography, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Matyjaszewski, K., and Möller, M., Eds.), pp 33–64. Elsevier B.V.). Para HPLC analítico usamos una columna de HPLC C18 en fase reversa [Nucleosil 100-7 C18, H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5 (0→5 min), 100:0→25:75 (5→35 min), 0:100 (>35 min)] con un gradiente binario de Disolvente A y Disolvente B, las fracciones recogidas se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C.

El ácido 2-(((etilio)carbonotioil)tio)-2-metilpropanoico (CTA) (J. Skey, R. K. O'Reily, *Chem. Commun.* **2008**, 4183) se sintetizó de acuerdo a los protocolos descritos en la bibliografía. La sal trisódica del ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS) se adquirió a Sigma-Aldrich® y el bromuro de p-xileno-bis-piridinio (DPX) se adquirió a Invitrogen™. L-α-fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC) se adquirió a Avanti Polar Lipids, Inc. Todos los demás reactivos se adquirieron a Sigma-Aldrich®, Scharlau, Panreac Química SLU, Fisher Scientific® o Acros® y se usaron sin purificaciones adicionales. Todos los disolventes tenían grado HPLC, se adquirieron a Sigma-Aldrich® o Fisher Scientific®, y se usaron sin purificación adicional.

Ejemplo 2: Síntesis del monómero *tert*-Butil-2-acriloilhidracina-1-carboxilato (compuesto de fórmula (IV))

Se disolvieron ácido acrílico (3.81 mL, 54.95 mmol) y *tert*-butil carbazato (8.89 g, 65.95 mmol) en una mezcla H<sub>2</sub>O/THF (2:1, 180 mL) a temperatura ambiente. Se añadió hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC) (11.75 g, 61.29 mmol) en porciones a la solución durante 15 minutos y se mantuvo en agitación durante 3 h. El crudo de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL) y la fase orgánica se lavó con 0.1 M HCl (3 x 75 mL), H<sub>2</sub>O (50 mL) y una disolución de cloruro sódico saturada (2 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el producto crudo como un sólido blanco. El producto crudo se purificó mediante recristalización de acetato de etilo (70 °C to rt) para obtener 5.05 g de un polvo cristalino blanco (50%). *R*<sub>f</sub> = 0.87 (100% Acetato de etilo); IR (neto) *v*<sub>max</sub> 3311m sh (N-H), 3221m sh (N-H), 2981w sh (C-H), 1715s sh (C=O), 1668s sh (C=O) cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 9.79 (s, 1H, C<sup>4</sup>(O)NH), 8.84 (s, 1H, C<sup>3</sup>(O)NH), 6.17-6.20 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 5.69 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.8, 4.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 164.3 (C<sup>4</sup>), 155.3 (C<sup>3</sup>), 129.4 (C<sup>5</sup>), 126.2 (C<sup>6</sup>), 79.2 (C<sup>2</sup>), 28.1 (C<sup>1</sup>).

Ejemplo 3: Síntesis de poli(*tert*-butil-2-acriloil)hidracina-1-carboxilato **A** precursor del polímero (polímero de fórmula (III))

Una disolución de ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) (ACVA) (18.4 mg, 0.064 mmol) en DMSO (1.5 mL) y una disolución de CTA (72.3 mg, 0.322 mmol; ácido 2-(((etilio)carbonotioil)tio)-2-metilpropanoico) en DMSO (1.5 mL) se añadieron secuencialmente a una solución de *tert*-butil-2-acriloilhidracina-1-carboxilato (3.00 g, 16.095 mmol) en DMSO (14.88 mL). Se tomó una alícuota de 50 µL de esta disolución en este estadio para ser usada en el cálculo de la conversión. Entonces se selló la mezcla de reacción y se desoxigenó con Argon durante 30 min. La disolución desoxigenada se mantuvo a 70 °C durante 7 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se expuso al aire. Se tomó una alícuota de 50 µL de esta disolución en este estadio para ser usada en el cálculo de conversión. El polímero se purificó mediante diálisis frente agua. El agua se eliminó mediante liofilización y secado en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para obtener 2.2 g de poli(*tert*-butil-2-acriloil)hidracina-1-carboxilato **A** (un polímero de fórmula (III)) como un polvo blanquecino (73% de rendimiento). UV (DMSO) λ<sub>max</sub> 300 nm. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 9.22 (br, 1H, NH), 8.60 (br, 1H, NH), 2.03 (br, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 1.41 (br, 11H, 9H en C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 2H en CHCH<sub>2</sub>). Conversión 40%. El número promedio de masa molecular *M*<sub>n</sub> 10270, dispersión en la masa molecular *D*<sub>M</sub> 1.39 (como se define en *Pure Appl. Chem.* **2009**, Vol. 81, No. 2, pp. 351–353). DP (UV-vis) 45.

Ejemplo 4: Síntesis de un andamiaje polimérico reactivo – síntesis de poli(acrilohidrazida) (polímero de fórmula (II))

Se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (15 mL) gota a gota a poli(*tert*-butil-2-acriloil)hidracina-1-carboxilato **A** (1.5 g) (un polímero de fórmula (III)) obtenido en el ejemplo 3 y la disolución amarilla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El exceso de TFA se eliminó insuflando una corriente constante de Argon y el aceite resultante se diluyó en agua (15 mL). La sal TFA del polímero se neutralizó añadiendo NaHCO<sub>3</sub> hasta que no se observó formación de espumas. La disolución incolora se mantuvo en agitación toda la noche. El polímero crudo se purificó mediante diálisis frente a agua. El agua se eliminó mediante liofilización y secado en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para obtener 650 mg de poli(acrilohidrazida) **B** (un polímero de fórmula (II)) como un polvo blanco (92%). IR (neto) *v*<sub>max</sub> 3254w br (N-H), 1609m br (C=O), 1428s sh cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 1.59-2.08 (br, (3 x DP)H, CHCH<sub>2</sub>), 1.01 (s, 3H, HOOCCH<sub>3</sub><sup>a</sup>), 0.95 (s, 3H, HOOCCH<sub>3</sub><sup>b</sup>). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 174.9 (CONH), 40.2-40.5 (CH), 34.4-35.7 (CH<sub>2</sub>). Grado de polimerización (<sup>1</sup>H-NMR) 40.

Ejemplo 5: Síntesis de 3-guanidino-*N*-(3-oxopropil)propanamida (**GA-5**) (un aldehído de fórmula O=C(H)-R<sup>1</sup>)

Una disolución de ácido 3-(2,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidino)propanoico (520 mg, 1.57 mmol) en diclorometano (30 mL) se trató con tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)uronio

(TBTU) (519.67 mg, 1.57 mmol), 2-(1,3-dioxolan-2-il)etanamina (316 µl, 2.83 mmol) y *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) (1 mL, 6.28 mmol, añadido gota a gota). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de Argon durante 1 hora. El crudo de reacción se lavó con HCl acuoso (5%, 3 x 20 mL) y disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gradiente MeOH/Diclorometano 1-10%,  $R_f = 0.76$ ) para obtener 542.6 mg de 2-(1,3-dioxolan-2-il)etil-3-(2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino)propanamida (80%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 11.4 (s, 1H), 8.7 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, 1H), 6.66-6.57 (m, 1H), 4.8 (td, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.3, 0.7 Hz, 1H), 3.95-3.91 (2H, m), 3.85-3.81 (2H, m), 3.70-3.59 (2H, m), 3.4-3.3 (2H, m), 2.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, m), 1.86-1.84 (2H, m), 1.4 (18H, s). <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 170.79 (s), 163.40 (s), 156.25 (s), 152.84 (s), 103.89 (d), 83.09 (s), 79.28 (s), 64.89 (t), 36.05 (t), 35.40 (t), 34.71 (t), 32.80 (t), 28.28 (q). ESI-MS (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) m/z 431 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 453 (20, [M+Na]<sup>+</sup>).

Una disolución de 2-(1,3-dioxolan-2-il)etil-3-(2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino)propanamida (0.69 mmol, 300 mg) en agua se trató con una solución acuosa de HCl (3M, 10 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 1 h. Entonces el disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción se disolvió en H<sub>2</sub>O y se purificó mediante RP-HPLC. Las fracciones recogidas ( $t_R$  4.0 min) se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C para obtener 90 mg de 3-guanidino-N-(3-oxopropil)propanamida (**GA-5**) (70%). RP-HPLC [Nucleosil 100-7 C18 H<sub>2</sub>O (0.1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0.1% TFA) 100:0→75:35 (10→35 min), 0:100 (>35 min)]. La pureza y caracterización se confirmaron mediante RP-HPLC analítico, <sup>1</sup>H-NMR y ESI-MS. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 9.53 (s, 1H), 5.00-4.77 (m, 1H), 3.40-3.25 (m, 2H), 3.24-3.04 (m, 2H), 2.65-2.60 (m, 2H), 2.52-2.29 (m, 2H), 1.94-1.73 (m, 1H), 1.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.7, 6.9 Hz, 2H). ESI-MS (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) m/z 187 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 205 (30, [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>). HR-MS (MS): Calcd para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 187.1185; encontrado: 187.1190.

#### Ejemplo 6: Condiciones generales para la síntesis de polímeros anfifílicos

En un experimento tipo, se mezclaron 25 µl de una disolución de un polímero de fórmula (II) (100 mM) en tampón acetato (100 mM, pH 4.5), 3.8 µl de una disolución de un aldehído hidrofóbico (200 mM) de fórmula O=C(H)-R<sup>2</sup> en DMSO seco y 21.2 µl de una disolución de aldehído hidrofílico (200 mM) de fórmula O=C(H)-R<sup>1</sup> en DMSO seco para obtener una concentración final de polímero anfifílico de 50 mM. Esta mezcla de agitó a 60 °C durante 2 h.

#### Ejemplo 7: Ejemplos específicos de síntesis de polímeros anfifílicos

Se hizo reaccionar poli(acrilohidracida) (**B**) en tampón acetato (100 mM, pH 3.0) con 2 equivalentes de diferentes fracciones molares de **GA-5** y diferentes aldehídos lipofílicos de fórmula O=C(H)-R<sup>1</sup>. En un experimento tipo con mezclas de moduladores, se mezclaron 25 µl de una disolución de poli(acrilohidracida) (**B**) (100 mM) en tampón acetato (100 mM, pH 3.0), 3.8 µl de una disolución de aldehído hidrofóbico de fórmula O=C(H)-R<sup>1</sup> (200 mM) (Tabla 1) en DMSO seco y 21.2 µl de una disolución de aldehído **GA-5** (200 mM) en DMSO seco para obtener una concentración final de polímeros anfifílicos de 50 mM. Esta mezcla se agitó a 60 °C durante 2 h. Los polímeros anfifílicos se usaron sin purificación adicional en los experimentos de transporte de vesículas y en experimentos de transfección de células HeLa.

#### Ejemplo 8: Condiciones generales para la evaluación de transporte a través de membranas modelo de ácidos nucleico – Experimentos con vesículas.

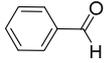
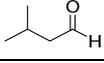
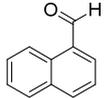
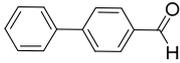
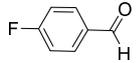
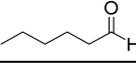
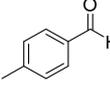
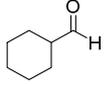
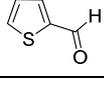
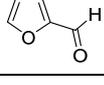
Disoluciones stock de vesículas largas unilamelares (LUVs) (5 µl) se diluyeron con tampón (10 mM Tris, 107 mM NaCl, pH 7.4), en una cubeta de fluorescencia con control de temperatura (25 °C) y con suficiente agitación (volumen total ~2000 µl; concentración final de lípidos ~13 µM). El eflujo de HPTS se monitorizó a una longitud de onda λ 511 nm (λ<sub>ex</sub> 413 nm) en función del tiempo después de la adición del polímero anfifílico (20 µl en DMSO/AcOH tampón, t = 25 s), ácido nucleico (NA, 20 µl solución stock en tampón, t = 50 s) y triton X-100 acuoso (1.2%, 40 µl, 370 µM concentración final, t = 225 s). Tiempo total del experimento = 250 s. La intensidad de emisión fluorescente se normalizó a la intensidad de emisión fraccionada I(t) usando la Ecuación Ecuación S1.

$$\text{Ecuación S1: } I(t) = (I_t - I_0) / (I_\infty - I_0)$$

donde  $I_0 = I_t$  a la adición del ácido nucleico,  $I_\infty = I_t$  a la saturación después de la ruptura. Concentración efectiva de polímero anfifílico o ácido nucleico -  $EC_{50}$  - y el coeficiente de Hill -  $n$  - se determinaron mediante la representación de la actividad fraccionada  $Y (= I(t) \text{ a saturación justo antes de la ruptura, } t = 200 \text{ s})$  en función de la concentración de polímero anfifílico o ácido nucleico [Analyte] y ajustando estos datos a la ecuación de Hill (Equation S2).

$$\text{Equation S2: } Y = Y_0 + (Y_{max} - Y_0) / \left\{ 1 + \left( \frac{EC_{50}}{[Analyte]} \right)^n \right\}$$

donde  $Y_0$  es la  $Y$  sin ácido nucleico (o polímero anfifílico),  $Y_{max}$  es  $Y$  saturada en presencia de un exceso de polímero anfifílico (o ácido nucleico),  $EC_{50}$  es la concentración de ácido nucleico (o polímero anfifílico) necesaria para alcanzar el 50% de actividad y  $n$  es el coeficiente de Hill. Los resultados se muestran en la tabla 1.

	<b>Aldehído</b>	<b>EC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>Y<sub>max</sub> (%)</b>	<b>n</b>
<b>1</b>		12.54 ± 2.25	56.00 ± 5.04	2.94 ± 1.51
<b>2</b>		17.27 ± 6.88	35.72 ± 7.73	1.50 ± 0.63
<b>3</b>		8.38 ± 0.53	23.12 ± 1.31	4.82 ± 1.34
<b>4</b>		2.40 ± 0.20	53.58 ± 3.32	3.71 ± 1.02
<b>5</b>		1.32 ± 0.16	50.9 ± 2.60	2.88 ± 0.96
<b>6</b>		3.49 ± 0.19	48.48 ± 1.90	5.28 ± 1.42
<b>7</b>		9.17 ± 7.60	28.34 ± 9.07	1.02 ± 0.57
<b>8</b>		2.97 ± 0.52	26.71 ± 1.51	2.36 ± 0.89
<b>9</b>		9.19 ± 1.97	17.84 ± 1.79	1.61 ± 0.50
<b>10</b>		2.10 ± 0.51	11.51 ± 0.57	1.70 ± 0.67
<b>11</b>		16.28 ± 13.17	18.27 ± 5.05	0.92 ± 0.39

**Tabla 1:** EC<sub>50</sub> (μM), Y<sub>MAX</sub> (%) y n para el transporte de ADN Herring (125 μM) en EYPC-LUVs→HPTS/DPX con concentraciones crecientes de polímero anfifílico preparado a partir de un porcentaje del 15% de modulador hidrofóbico y 85% del modulador GA-5 (4). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

En la figura 1 se muestran la intensidad de emisión normalizada I(t) (A) y las curvas de dosis-respuesta (B).

Ejemplo 9: Cribado *In Vitro* de cesión de siRNA con polímeros anfifílicos

Células HeLa que expresan establemente la proteína verde fluorescente mejora (EGFP) se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium de Life Technologies™ (DMEM, glucosa alta, GlutaMAX™, piruvato) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) de Hyclone™ (Thermo Fisher Scientific Inc) y 500 μg·mL<sup>-1</sup> de Geneticin® (Life Technologies™). La transfección de HeLa-EGFP se llevó a cabo en el mismo medio, libre de antibióticos. La incubaciones de células se llevaron a cabo en un incubador con camisa de agua 37 °C/5% CO<sub>2</sub>.

Células HeLa-EGFP se transfectaron con Ambion® Silencer® GFP (EGFP) siRNA (siEGFP) de Life Technologies™ o RNA (siMOCK, All Star Negative Control) de Qiagen. Tras 72 h después de la transfección de siRNA, el sobrenadante celular se eliminó y se midió la expresión de EGFP mediante fluorimetría (λ<sub>ex</sub> 489nm; λ<sub>em</sub> 509nm). El porcentaje de EGFP knockdown se calculó como el porcentaje de descenso de fluorescencia observado en células transfectadas con siEGFP comparado a la transfección con siMOCK con los mismos reactivos en las mismas condiciones. El porcentaje de viabilidad celular se calculó como el porcentaje de fluorescencia remanente en muestras transfectadas con siMOCK comparada con células no transfectadas en DMEM, glucosa alta, GlutaMAX™ y piruvato, suplementado con 0.125% (v/v) DMSO.

Lipofectamine® 2000 se usó como control positivo de la transfección de siRNA en el cribado *in vitro* de polímeros anfifílicos en HeLa-EGFP. La calidad de los experimentos de transfección se evaluó calculando la factor Z usando la Ecuación S3,

Ecuación S3:  $Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$

Con la media y desviación standard de unidad relativa (RFU) de ambos el positivo ( $p$  = células transfectadas con mezcla de siEGFP y polímeros anfifílicos o Lipofectamine® 2000) y negativo ( $n$  = células no transfectadas en medio suplementado con 0.125% (v/v) DMSO) controles ( $\mu_p, \sigma_p,$  y  $\mu_n, \sigma_n$ ). Donde  $\mu$  es el valor medio y  $\sigma$  es la desviación estandar. Un factor Z entre 0.5 y 1.0 indica un ensayo excelente, 0.5 es equivalente a separación de 12 desviaciones estándar entre  $\mu_p$  y  $\mu_n$ .

5

Como se muestra en la Figura 2, las composiciones de la presente invención son tan efectivas como Lipofectamine® 2000 pero a concentraciones 10 veces menores.

Ejemplo 10: Condiciones generales para el cribado In Vitro de polímeros anfifílicos en la cesión de siRNA

10

Las soluciones madre de los polímeros anfifílicos recién preparados, se prepararon en DMSO / tampón (v / v) como se describe anteriormente. Las soluciones de siRNA / composiciones de polímeros anfifílicos se prepararon justo antes de los experimentos de transfección . 10  $\mu$ l de la solución de siRNA (1  $\mu$ M en DMEM) y 8  $\mu$ l de solución de polímeros anfifílicos en DMEM, glucosa alta, GlutaMAX™, piruvato, 10 % (v / v) de DMSO, suplementado con 10 % (v / v) FBS, fueron añadidos a 190  $\mu$ l DMEM, glucosa alta, GlutaMAX™, piruvato, suplementado con 10 % (v / v) de FBS y la mezcla se homogeneizó mediante pipeteo. Entonces, el medio celular se aspiró de la placa de 96 pocillos y se añadieron 50  $\mu$ l de la mezcla en cada pocillo. La concentración final de DMSO en cada pocillo fue 0,125 % (v / v). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Figura 3.

15

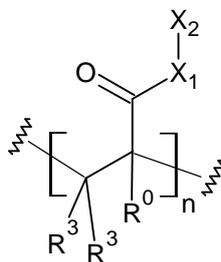
Ejemplo 11: Condiciones generales para la evaluación de la viabilidad celular: ensayo MTT

20

La viabilidad celular de las células HeLa- EGFP se midió inicialmente como el porcentaje de disminución de la fluorescencia en las muestras transfectadas con siMOCK / complejos de polímeros anfifílico y se comparó con las células no tratadas en medio suplementado con 0.125 % (v / v) de DMSO . Los resultados se muestran en la Figura 4.

**Reivindicaciones**

1. Un polímero, sales y estereoisómeros del mismo, de fórmula (I)



5

(I)

donde

$n$  es el número promedio de unidades de monómeros que es un número igual o mayor que 10;

$R^0$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_3$  y CN;

10

cada  $R^3$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;

$X_1$  es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en  $-N(H)-$ ,  $-O-$ ,  $-N(H)-Alquilo-$  y  $-O-Alquilo-$ ;

$X_2$  se selecciona de manera independiente en cada unidad del grupo que consiste en  $-NH_2$ ,  $-N=C(H)R^1$  y  $-N=C(H)R^2$ ; donde  $R^1$  es un resto lipofílico y  $R^2$  es un resto catiónico; y

15

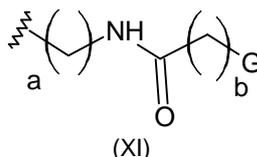
donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 1 y 99%;

donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 1 y 99%; y

20

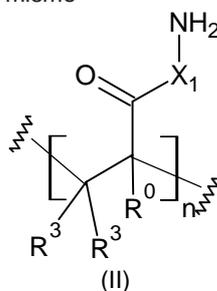
la suma del porcentaje de restos lipofílicos y de restos catiónicos está comprendido entre 2 y 100%.

2. El polímero según la reivindicación 1, donde  $n$  es un número comprendido entre 10 y 300, preferiblemente igual o menor de 150, preferiblemente entre 20 y 120, más preferiblemente entre 30 y 100.
3. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $X_1$  es  $-N(H)-$ .
4. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo  $C_1-C_{40}$ , alquenilo  $C_2-C_{40}$ , alquinilo  $C_2-C_{40}$ , cicloalquilo  $C_3-C_{40}$ , cicloalquenilo  $C_4-C_{40}$ , cicloalquinilo  $C_5-C_{40}$ , arilo  $C_6-C_{40}$ , alquilarilo  $C_7-C_{40}$ , heterociclilo  $C_3-C_{40}$  y heteroarilo  $C_5-C_{40}$ , opcionalmente sustituido con 1 a 10 grupos seleccionados de halógenos tales como flúor o enlaces éter.
5. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquenilo  $C_2-C_{10}$ , alquinilo  $C_2-C_{10}$ , cicloalquilo  $C_3-C_{10}$ , cicloalquenilo  $C_4-C_{40}$ , cicloalquinilo  $C_5-C_{10}$ , alquilarilo  $C_7-C_{15}$  y heteroarilo  $C_5-C_{15}$ , opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados de halógeno tales como flúor o enlaces éter.
6. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo ramificado  $C_1-C_7$ .
7. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^2$  comprende un heteroátomo cargado positivamente.
8. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^2$  comprende un grupo catiónico que tiene un pKa superior a 4 cuando está protonado.
9. El polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R^2$  es un resto de fórmula  $-L-G$ , donde L es un grupo conector que comprende un resto orgánico, y G un grupo cargado positivamente.
10. El polímero según la reivindicación 10, donde el resto de fórmula  $-L-G$  tiene la fórmula (XI)

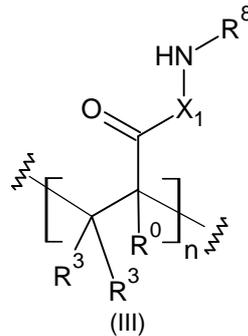


donde a es un número entre 1 y 6,; b es un número entre 1 y 6; y G es un amonio, fosfonio o guanidinio positivamente cargado.

- 5 11. Un polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el porcentaje de restos lipofílicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 5 y 70%, preferiblemente entre 7 y 60%, preferiblemente entre 7 y 20%, más preferiblemente entre 10 y 20%.
- 10 12. Un polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el porcentaje de restos catiónicos presentes en el polímero con respecto al número total de grupos  $X_2$  está comprendido entre 10 y 99%, preferiblemente entre 40 y 95%, preferiblemente entre 60 y 90%, más preferiblemente entre 65 y 85%.
13. Un polímero según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la suma del porcentaje de restos lipofílicos y el porcentaje de restos catiónicos está comprendido entre 40 y 80%.
- 15 14. Una composición que comprende el polímero definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un compuesto cargado negativamente.
- 15 15. La composición según la reivindicación 14, donde dicho compuesto cargado negativamente es un ácido nucleico o poli(nucleótido).
- 20 16. Un método de cribado que comprende la etapa de poner en contacto la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, y una membrana lipofílica.
17. Un polímero, sales y estereoisómeros del mismo, como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso como medicamento.
18. Un polímero, sales y estereoisómeros del mismo, como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en la transfección a células.
- 25 19. Una composición como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, para uso como medicamento.
20. Una composición como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, para uso en la transfección a células.
- 30 21. Una composición farmacéutica que comprende la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15.
22. Un procedimiento para la preparación del polímero sales y estereoisómeros del mismo como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende la etapa de poner en contacto un polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo

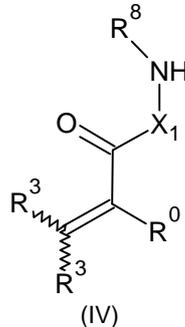


- 35 con un aldehído de fórmula  $O=C(H)R^1$  y un aldehído de fórmula  $O=C(H)R^2$ ;  
donde n,  $X_1$ ,  $R^0$ ,  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son como se definieron en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
23. El procedimiento según la reivindicación 22, donde dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^1$  y dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^2$  se mezclan juntos simultáneamente con el polímero de fórmula (II).
- 40 24. El procedimiento según la reivindicación 22, donde dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^1$  y dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^2$  se mezclan juntos consecutivamente con el polímero de fórmula (II).
25. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^1$  y dicho aldehído de fórmula  $O=C(H)R^2$  se añaden en cantidades comprendidas entre 0.001 and 10 equivalentes con respecto al número total de restos  $NH_2$  disponibles.
- 45 26. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde la preparación del polímero de fórmula (II), sales y estereoisómeros del mismo, comprende la etapa de eliminar el grupo  $R_8$  de un polímero de fórmula (III), sales y estereoisómeros del mismo,



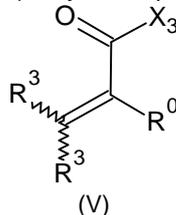
donde n, X<sub>1</sub>, R<sup>0</sup> y R<sup>3</sup> son como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y R<sup>8</sup> es un grupo protector.

- 5 27. El procedimiento según la reivindicación 26, donde R<sup>8</sup> es un grupo protector de fórmula -(O=)C-O-R<sup>9</sup>, donde R<sup>9</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>.
28. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, donde la reacción tiene lugar en medio acuoso.
- 10 29. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, donde la preparación del polímero de fórmula (III), sales y estereoisómeros del mismo, comprende polymerizar un compuesto de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo,



donde

- 15 X<sub>1</sub> es un grupo que se selecciona del grupo que consiste en -N(H)-, -O-, -N(H)-Alquilo- y -O-Alquilo-;
- R<sup>0</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y CN;
- cada R<sup>3</sup> se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y
- 20 R<sup>8</sup> es un grupo protector.
30. El procedimiento según la reivindicación 29, donde la preparación de un compuesto de fórmula (IV), sales y estereoisómeros del mismo, comprende la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula (V), sales y estereoisómeros del mismo, con un grupo protector -R<sup>8</sup> o con un compuesto de fórmula -N(H<sub>2</sub>)-N(H)-R<sub>8</sub>, -O-N(H)-R<sub>8</sub>, -N(H<sub>2</sub>)-Alquil-N(H)-R<sub>8</sub> y -O-Alquil-N(H)-R<sub>8</sub>



donde

- 25 R<sup>0</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y CN;
- cada R<sup>3</sup> se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y
- 30 X<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en -OH, halógeno, O-alquilo, -N(H)-N(H<sub>2</sub>), -O-N(H<sub>2</sub>), -N(H)-Alquilo-N(H<sub>2</sub>) y -O-Alquilo-N(H<sub>2</sub>).
31. El procedimiento según la reivindicación 30, donde dicho carbazato se selecciona del grupo que consiste en t-butil carbazato, bencil carbazato, etil carbazato, metil carbazato y mezclas de los mismos.

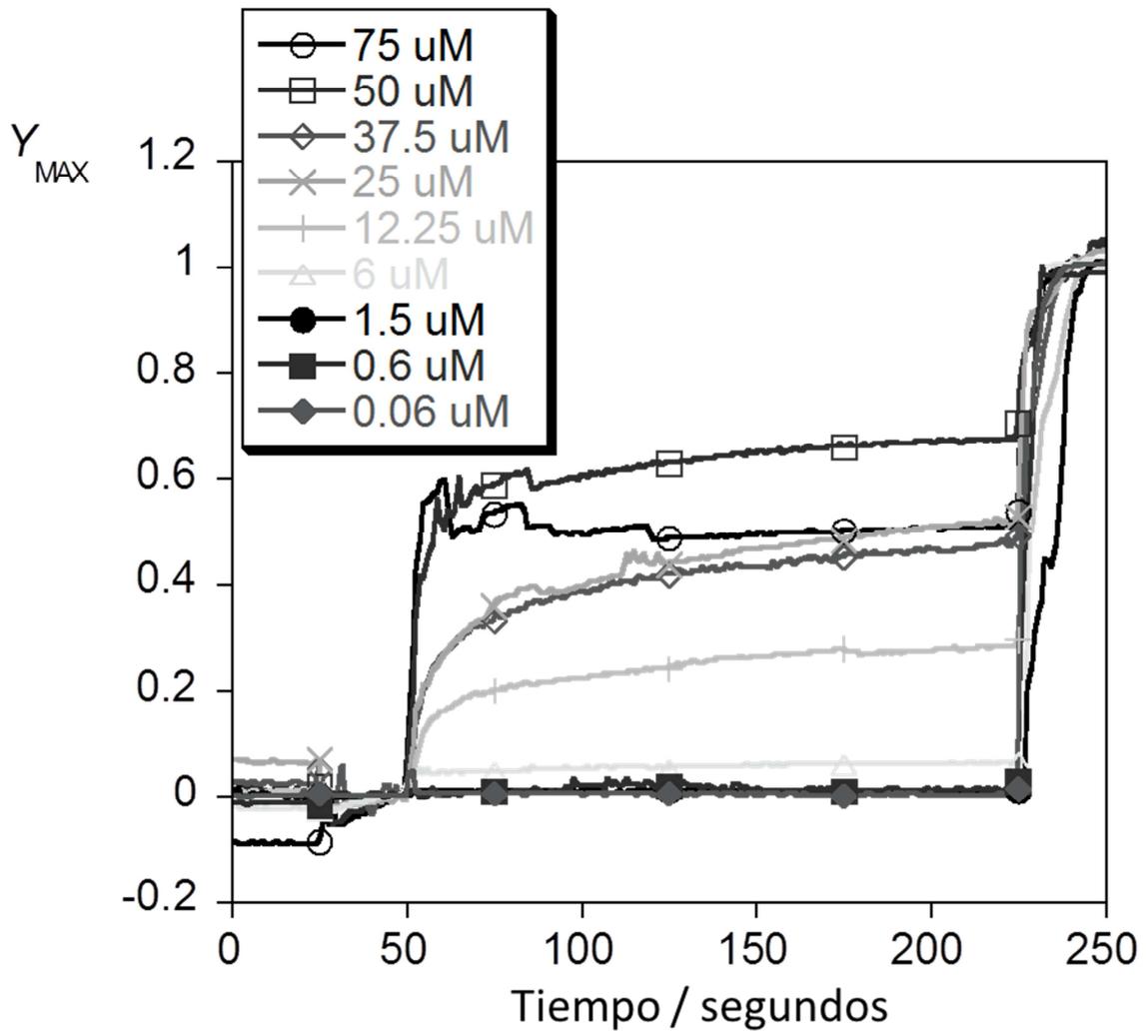


Figura 1A

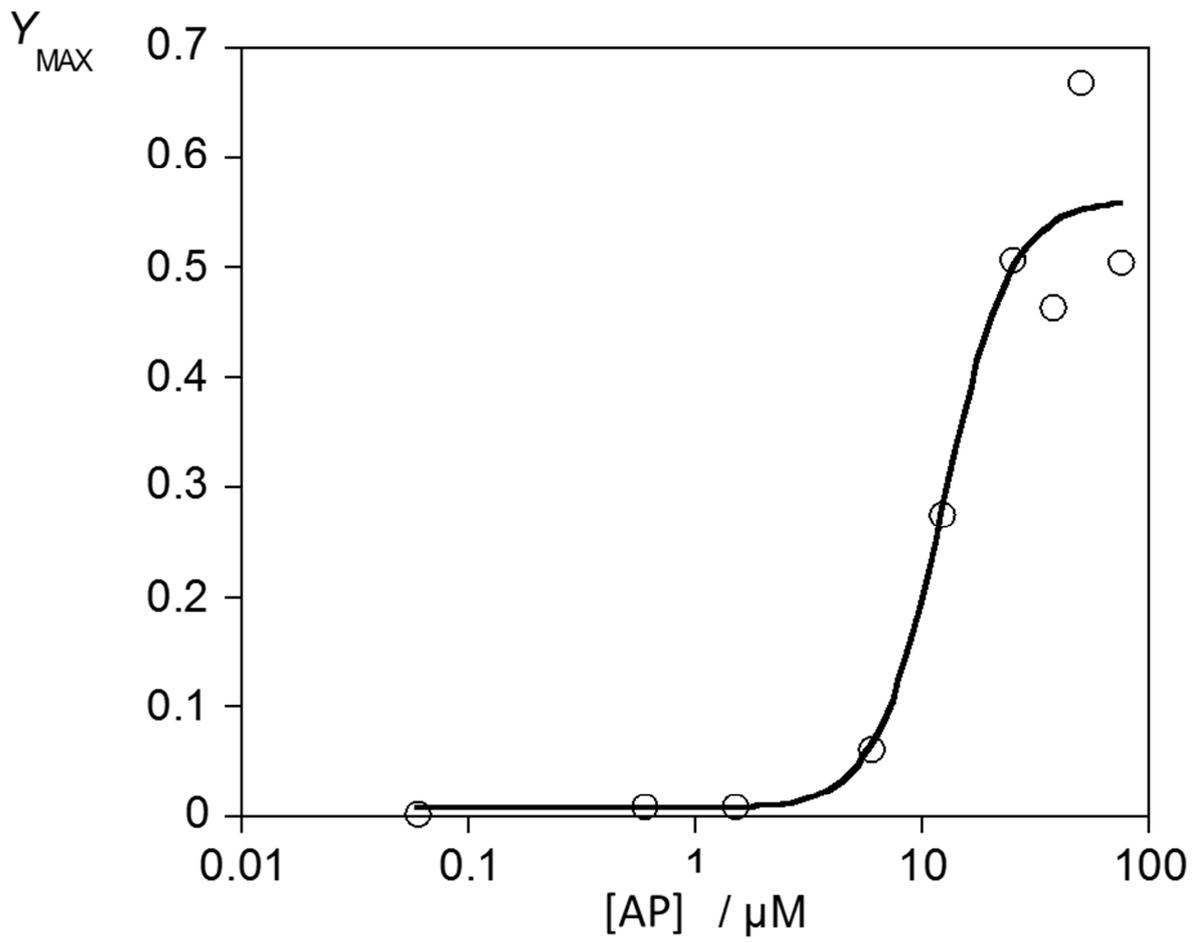


Figura 1B

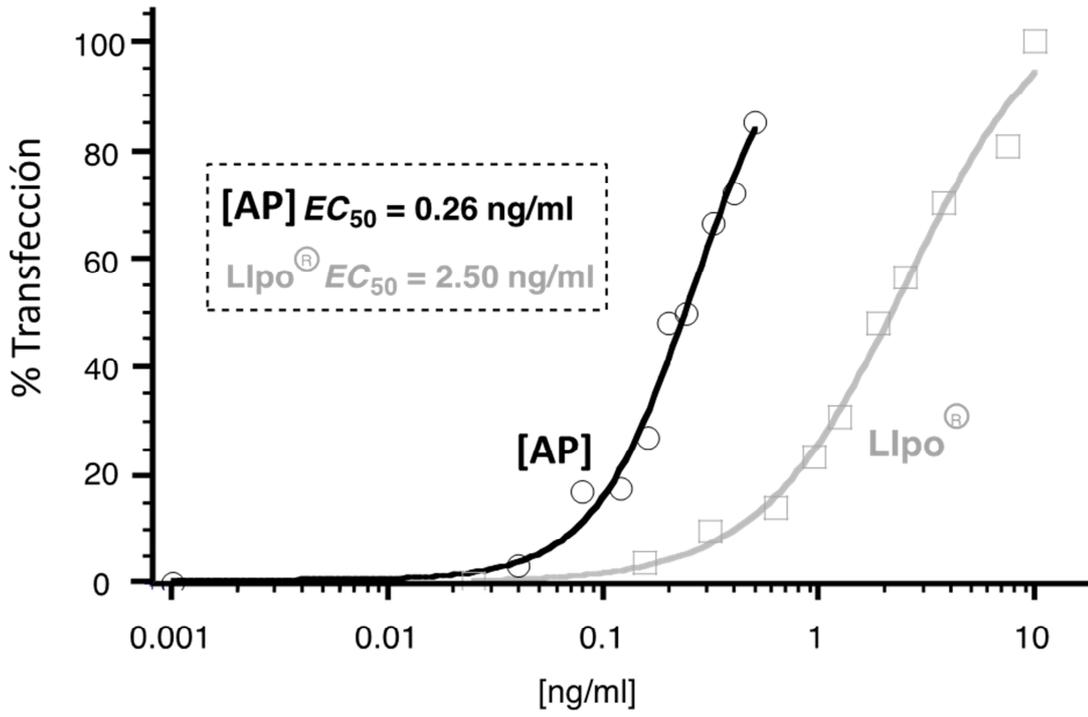


Figura 2

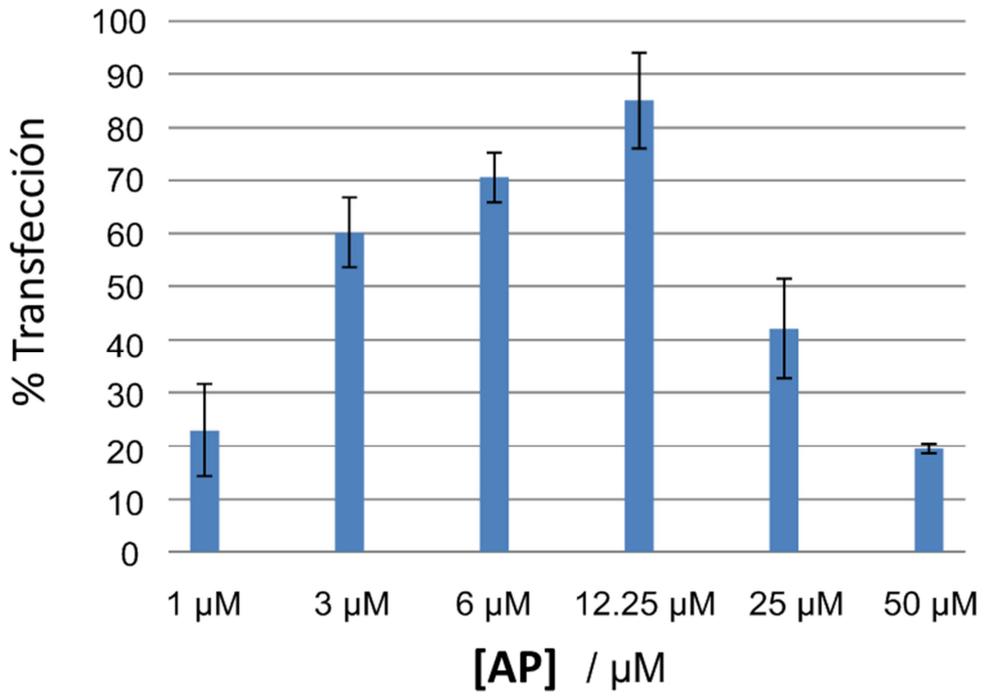


Figura 3A

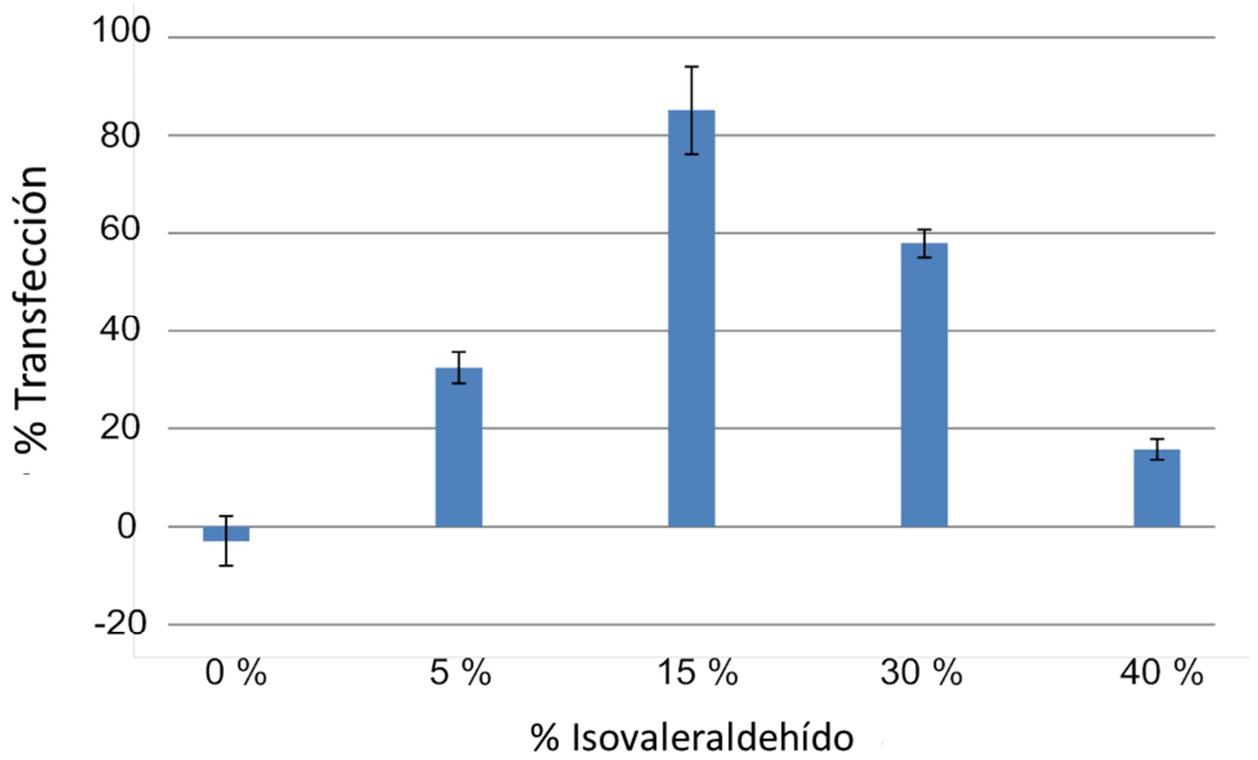


Figura 3B

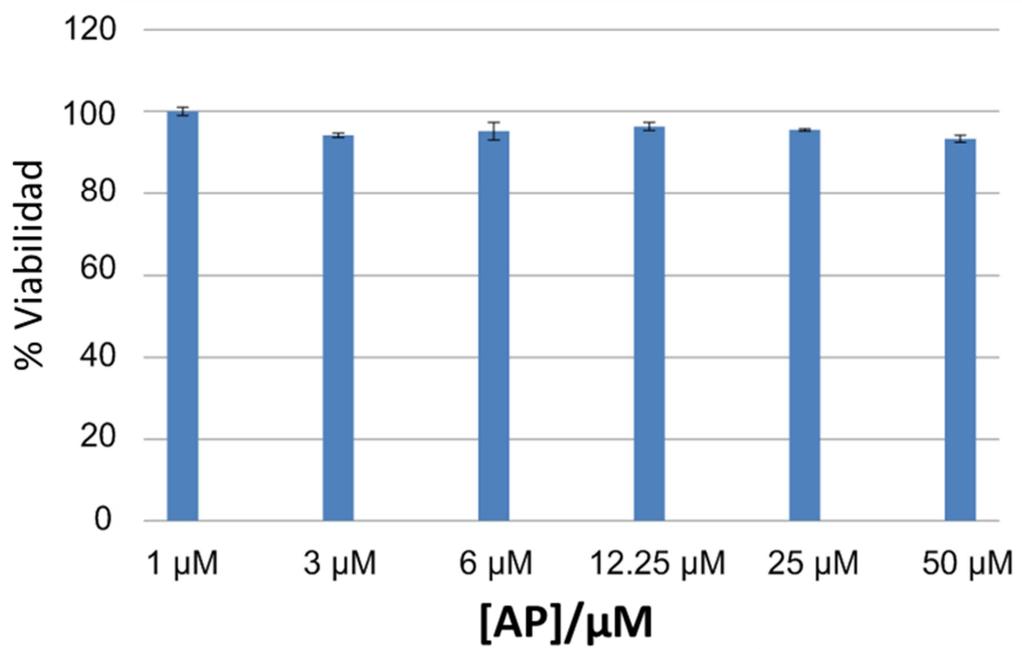


Figura 4A

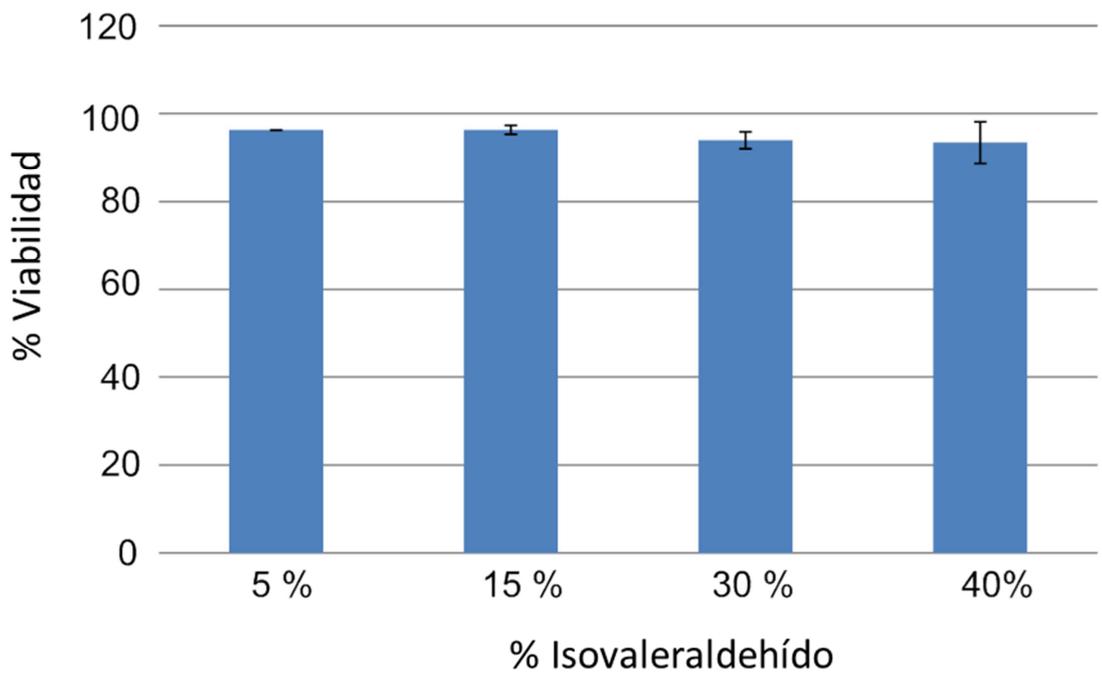


Figura 4B

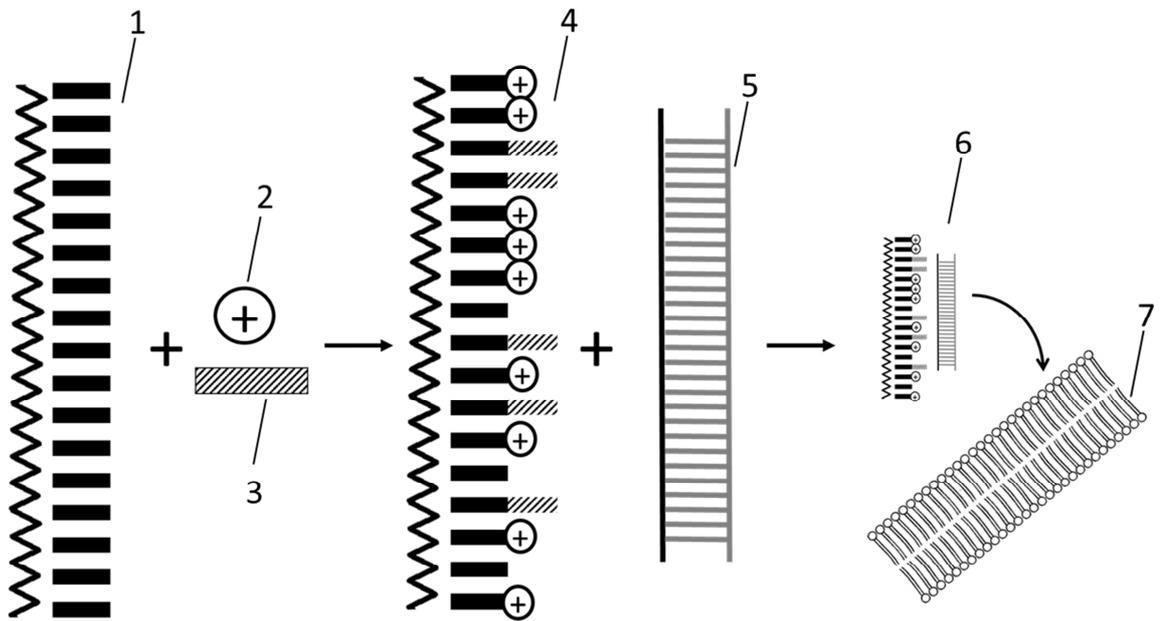


Figura 5



②① N.º solicitud: 201531831

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KUMAR, A. et al. "Polyacryloyl Hydrazide: An Efficient, Simple, and Cost Effective Precursor to a Range of Functional Materials through Hydrazide Based Click Reactions". Applied Materials & Interfaces, 2014, Vol. 6, páginas 1855-1865. Ver resumen; página 1856, columna 1, párrafo 2; esquema 1, compuestos VI y IV; página 1857, columna 2, párrafos 3 y 5; página 1864, columna 1, párrafo 3.	1-31
A	BAE, Y. "Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property; tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy". Bioconjugate Chemistry, 2005, Vol. 16, página 122-130. Ver resumen; figura 1; procedimientos experimentales.	1-31
A	BAE, Y. et al. "Design of Environment-Sensitive Supramolecular Assemblies for Intracellular Drug Delivery: Polymeric Micelles that are Responsive to Intracellular pH Change". Angewandte Chemie International Edition, 2003, Vol. 42, páginas 4640-4643. Ver página 4640, columna 2, párrafo 2; página 4641, columna 1, párrafo 1; esquema 1.	1-31

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.07.2016

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/5



21 N.º solicitud: 201531831

22 Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2015

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 3395134 (D'ALELIO GF) 30/07/1968, columna 1, líneas 15-62.	1-31
A	MONTENEGRO, J. et al. "Dynamic octopus amphiphiles as powerful activators of DNA transporters: differential fragrance sensing and beyond". Chemistry: a European Journal, 2010, Vol. 16, páginas 14159-14166. Ver resumen; figura 1.	1-31

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.07.2016

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
2/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08F20/60** (2006.01)

**C08F20/56** (2006.01)

**A61K31/16** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08G, C07C, A61K, C08F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXT, NPL, BIOSIS, XPESP, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.07.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-31	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-31	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KUMAR, A. et al. "Polyacryloyl Hydrazide: An Efficient, Simple, and Cost Effective Precursor to a Range of Functional Materials through Hydrazide Based Click Reactions". Applied Materials & Interfaces, 2014, Vol. 6, páginas 1855-1865.	2014

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a polímeros poli(acrilóil hidrazida) de fórmula general I, a su método de preparación, a composiciones que comprenden dichos polímeros y a un método de cribado que utiliza dichas composiciones.

El documento D01, considerado el más cercano en el estado de la técnica, divulga polímeros poli(acrilóil hidrazida) estructuralmente próximos a los definidos en la solicitud, en los que el grupo hidrazido está funcionalizado con un grupo hidroxil-naftilo o un grupo hidroxil-fenil-diazenil-fenil sulfónico. Dichos polímeros pueden ser utilizados como complejantes para la liberación de fármacos (resumen; página 1856, columna 1, párrafo 2; esquema 1, compuestos VI y IV; página 1857, columna 2, párrafos 3 y 5; página 1864, columna 1, párrafo 3).

Los polímeros recogidos en el documento D01 se diferencian de los definidos en la reivindicación 1 de la solicitud en que el grupo hidrazido está funcionalizado en unas unidades del polímero con un grupo lipofílico (R1) y en otras unidades del mismo polímero con un resto catiónico (R2), lo que confiere al polímero un carácter anfifílico, haciéndole apto para conjugarse a la vez con moléculas lipofóbicas como son los ácidos nucleicos y a la vez con las membranas celulares que tienen carácter lipofílico, pudiendo así atravesar las membranas celulares.

No existe ningún indicio en el documento D01, el cual recoge únicamente polímeros poli(acrilóil hidrazida) funcionalizados con restos lipofílicos, que oriente a un experto en la materia hacia la funcionalización simultánea de los polímeros poli(acrilóil hidrazida) con restos lipofílicos y lipofóbicos como son los definidos en la solicitud.

En consecuencia, la invención definida en las reivindicaciones 1-31 es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).