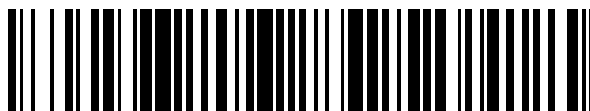


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 094**

51 Int. Cl.:

C08G 73/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C08G 81/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014 PCT/DE2014/000500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15048940**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014 E 14803038 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3052545**

54 Título: **Nuevos copolímeros basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético, particularmente de ADN/ARN, así como método para su fabricación y uso**

30 Prioridad:

02.10.2013 DE 102013016750

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

23.11.2018

73 Titular/es:

**SMARTDYELIVERY GMBH (100.0%)
Botzstrasse 5
07743 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**ENGLERT, CHRISTOPH;
TAUHARDT, LUTZ;
GOTTSCHALDT, MICHAEL y
SCHUBERT, ULRICH S.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 691 094 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos copolímeros basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético, particularmente de ADN/ARN, así como método para su fabricación y uso

5

[0001] Nuevos copolímeros basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético, particularmente de ADN/ARN, así como método para su fabricación y uso

10

La invención se refiere a copolímeros nuevos basados en poli(etilenimina), que consisten en unidades de etilenimina y 2-oxazolona, pero en comparación con copolímeros conocidos basados en poli(etilenimina) (PEI) presentan una funcionalidad sorprendentemente alta según las reivindicaciones 1 y 2. Los PEIs de este tipo son conocidos por el enlace y liberación de ADN/ARN. Además, la invención también comprende el método para su fabricación así como aplicaciones específicas de su función de los copolímeros propuestos, según la reivindicación 3. Los copolímeros propuestos basados en poli(etilenimina) se pueden usar por ejemplo para la funcionalización de superficies, para el desarrollo de sistemas de chip ADN para la analítica móvil y como materiales para recubrimientos antiincrustantes de sensores.

15

[0002] Ya se conoce como monómero (3-butenil)-2-oxazolona-2 (A. Gress, A. Völkel, H. Schlaad; Thio-click modification of poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline] *Macromolecules* 40, 2007, 7928-7933), que se representa mediante la funcionalización de (2-cloretilamina)-hidrocloruro con succinimidil-4-pentenato, seguido de un término anular. El monómero (2-(3-butenil)-2-oxazolona) fabricado en 3 pasos se polimeriza hacia poli(2-(3-butenil)-2-oxazolona). El homopolímero obtenido con mucha inversión de tiempo en términos comparativos no contiene grupos de amina libres que son necesarios para el enlace de material genético, particularmente ADN/ARN.

20

[0003] Se conocen también copolímeros basados en poli(etilenimina) (H. Tian, F. Li, J. Chen, Y. Huang, X. Chen: N-Isopropylacrylamide-Modified Polyethylenimines as Effective Gene Carriers, *Macromolecular Bioscience* 12, 2012, 1680-1688), en los que se realiza la funcionalización con N-isopropilacrilamida por una así llamada adición Michael. Estos derivados sintetizados muestran afinidad de enlace con el ADN plásmido. Sin embargo, la funcionalización del PEI mediante la adición Michael mencionada lleva a cadenas laterales sin enlaces múltiples posibles, por lo cual se limita la funcionalización. Particularmente, de este modo no se pueden fabricar substratos con superficie funcionalizada o hidrogeles estructurados, por ejemplo, para perlas, partículas etc., para el enlace y liberación de material genético.

25

30

[0004] También se conoce que N-hidroxisuccinimida (NHS) o la N-Hidroxisulfosuccina (NHSS) algo más polar reaccionan bajo condiciones más suaves con componentes que contienen carboxilo (p. ej. ácido butánico) hacia los citados "acilésteres de amina" (D. Sehgal, I. K. Vijay: A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation, *Anal. Biochem.* 218, 1994, 87-91). Con estos acilésteres de amina se pueden funcionalizar grupos de amina, sin embargo, esta funcionalización se limita exclusivamente a grupos de amina primarios. Además, no se menciona la introducción de cadenas laterales funcionalizadas en polímeros. Como mencionado anteriormente, aquí tampoco son posibles enlaces múltiples, de modo que a su vez tampoco se puede fabricar hidrogeles estructurados o con superficie funcionalizada, por ejemplo para perlas, partículas etc., para el enlace y liberación de material genético, particularmente ADN/ARN.

35

40

[0005] Además, se conoce la funcionalización de PEI ramificado con acetato, butanoato y hexanoato a través de EDAC/NHS (A. M. Doody, J. N. Korley, K. P. Dang, P. N. Zawaneh, D. Putnam: Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro, *J. Control. Release* 116, 2006, 227-237). Como se ha mencionado anteriormente, la funcionalización se limita también solamente a grupos de amina primarios. Además, se describe la funcionalización de polietilenimina mediante anhídrido de ácido acético, propiónico y butánico (S. Nimesh, A. Aggarwal, P. Kumar, Y. Singh, K.C. Gupta, R. Chandra: Influence of acyl chain length on transfection mediated by acylated PEI nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 337, 2007, 265-274). En ambos casos existe la afinidad de enlace con material genético, como ADN/ARN, sin embargo, a su vez no se mencionan enlaces múltiples de las cadenas laterales introducidas, con lo cual se dan igualmente las desventajas de la limitación de la funcionalidad de aplicación descrita anteriormente.

45

50

[0006] También se conocen polialquilenimina-hidrogeles con tasas de degradación regulables (M. Carnahan, J. Butlin: Crosslinked Polyalkyleneimine Hydrogels with Tunable Degradation Rates, WO 2009/102952 A2). Aquí se reticularon polialquileniminas funcionalizadas o polietilenimina ramificada mediante polietilenoglicol activado de forma diversa, de manera que solo está a disposición una parte de los grupos de amina originarios del PEIs para una aplicación biológica posterior. Sobre la proporción de las cantidades del polímero de salida y del reticulante se realiza el control del grado de reticulación únicamente por vía indirecta. El foco se encuentra aquí en la síntesis de redes de hidrogel. La reutilización de funcionalidades existentes, por ejemplo, sobre superficies o para la síntesis de hidrogeles estructurados para el enlace y liberación de material genético, no se explica más detalladamente.

55

60

[0007] Además se conoce la hidrólisis alcalina parcial de poli (N-acetiltilimina) (Y. Chujo, Y. Yoshifuji, K. Sada, T. Saegusa: A Novel Nonionic Hydrogel from 2-Methyl-2-oxazoline, *Macromolecules* 22, 1989, 1074-1077). Una reticulación sucesiva a redes de polímeros, como ya se ha descrito previamente, solo es posible por medio de unidades sucesivas de etilimina. Estas ya no están a disposición para el enlace y liberación posterior de material

65

genético. No es posible una cuantificación exacta de unidades de etilimina en el hidrogel fabricado. Además, no se menciona la introducción de cadenas laterales funcionalizadas en los polímeros, con lo que se suprimen las posibilidades de aplicación, por ejemplo, una funcionalización superficial. No es posible una introducción de cadenas laterales con funcionalidades insaturadas por el camino de la hidrólisis.

5

[0008] Se conoce la alquilación o acilación de polietileniminas y el examen de la liberación de ADN plásmido de estos (M. Thomas, A. M. Klibanov: Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells, PNAS 99, 2002, 14640-14645). No se menciona aquí tampoco la introducción de grupos útiles insaturados y la posibilidad de implementar los copolímeros mediante agentes de reticulación a hidrogeles.

10

[0009] Además, se examina especialmente en detalle la acetilación parcial de polietilenimina por medio de anhídrido acético (M. L. Forrest, G. E. Meister, J. T. Koerber, D. W. Packl: Partial Acetylation of Polyethylenimine Enhances In Vitro Gene Delivery, Pharm. Res. 21, 2004, 365-371). A través de la ausencia de enlaces múltiples en las cadenas laterales se dan igualmente las desventajas de la restricción de las posibilidades de empleo descritas anteriormente.

15

[0010] También se menciona la funcionalización y reticulación de polietilenimina ramificada con componentes monofuncionales, bifuncionales o multifuncionales (P. Tarcha, T. Merdan, E. Wagner, J. Klöckner: Chemically modified polycation polymer for siRNA delivery, WO 2007/084797). Se menciona la posibilidad de introducir grupos funcionales insaturados mediante la adición de Michael, pero no se describe con más detalle respecto a una transformación práctica. Por consiguiente resulta también aquí una falta de referencia respecto a una posible aplicación de estos polímeros para la funcionalización de superficie o estructuración de hidrogeles, por ejemplo para perlas, partículas etc., para el enlace y liberación de material genético, particularmente ADN/ARN. Además, posibles unidades presentes de etilenimina están unidas dentro de un copolímero a través de un ligador.

20

25

[0011] También se conoce la funcionalización con haluros de ácido de cadena larga (L. Yan, W. T. S. Huck, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides: Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) on a Reactive SAM Using Microcontact Printing, Langmuir 15, 1999, 1208-1214), pero trae consigo nuevamente la desventaja de la falta de enlaces múltiples en la cadena lateral y con ello posibilidades de aplicación relacionadas.

30

[0012] Se conoce la síntesis de diferentes copolímeros hidrosolubles de diferentes composiciones (WO 2011/162366 A1). La introducción de enlaces múltiples en polietilenimina ramificada se describe únicamente en relación con unidades de etilenglicol en la cadena lateral, cuyo objetivo es la síntesis de polímeros hidrosolubles. Un enlace de material genético se restringe de modo extremo a través de la densidad reducida de forma porcentual en cargas positivas, especialmente para cadenas laterales más largas. La característica de solubilidad deseada se consigue especialmente por el número alto de unidades de etilenglicol, que, sin embargo, dificultan un enlace, particularmente de ADN. No obstante, para poder observar un enlace lo más eficiente posible de material genético, la proporción de etilenimina debe lograr en el copolímero una dimensión determinada. Partiendo de esta composición ya no es posible, sin embargo, una hidrosolubilidad. No se menciona una aplicación de estos copolímeros insaturados, funcionalizados, por ejemplo, para la estructuración de hidrogeles.

35

40

[0013] Además, se conoce la hidrólisis parcial de poli(2-poli(2-oxazolininas) (F. Wiesbrock, F. Stelzer, C. Slugovic, N. Noormofidi, V. Kaltenhauser, E. Kreutzwiesner, K. Rametsteiner: Use of contact biocides based on poly(2-substituted) oxazolines, WO 2012/149591). No es posible por este camino de reacción la síntesis de un copolímero que contiene funcionalidad de enlace múltiple. Una hidrólisis conduce a la destrucción de la funcionalidad de enlace múltiple bajo las condiciones requeridas.

45

[0014] La patente US 3 251 778 divulga polialquilimininas y derivados de estas, como en particular polietilenimina y derivados de polietilenimina, que contienen grupos diferentes, como por ejemplo, los derivados oxilalquilados, acilados, alquilados, carbonilados, derivados de olefinas y otros, que se fabrican a través de la introducción de estos grupos, de forma individual, alternativa, en combinación etc., incluyendo tales derivados, que se fabrican modificando de añadir tales grupos, aumentando el número y orden del añadir tales grupos.

50

[0015] La patente EP 2 586 815 A1 divulga la formación de un complejo de nanopartículas hidrosolubles a partir de polímeros, particularmente unidades de etilenglicol, en el que se acumulan una multiplicidad de nanopartículas.

55

[0016] La homogeneidad y estabilidad a través de formación de un complejo de nanopartículas bajo aplicación de este polímero hidrosoluble permite esencialmente la utilización de estas nanopartículas en aplicaciones bioquímicas.

60

[0017] Con esta síntesis de complejos de nanopartículas hidrosolubles se puede usar por ejemplo un copolímero que consiste en 3 unidades de monómeros, donde pueden surgir en la cadena de la columna polimérica grupos terminales funcionales insaturados (descritos aquí como grupos hidrófilos), pero solamente bajo la condición de que estén enlazados por unidades de etilenglicol con la columna polimérica.

65

[0018] Además, el copolímero según esta solución técnica contiene unidades de etilenimina y otra cadena lateral funcional (grupos de amida y al menos otro grupo funcional adicional).

5 [0019] La patente WO 2013/137736 A1 divulga un producto médico biocompatible en forma de implantes, en particular implantes óseos y de tejido blando, recubrimientos adhesivos de implantes, material de sutura, adhesivos tisulares y bandas adhesivas de tejidos, que presenta al menos 1% de sustancia seca de un polímero reticulado covalente, que se obtiene a través de la transformación de una polioxazolina activada nucleófilamente (NU-POX) con un medio reticulante electrófilo.

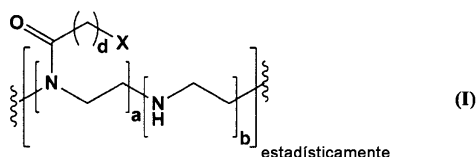
10 [0020] La patente WO 2012/057628 A2 divulga un adhesivo de tejido biocompatible en forma de un polímero reticulado de forma covalente, que se obtiene a través de la transformación de una polioxazolina activada electrofílicamente (EL-POX) con un reticulante nucleófilo.

15 [0021] Por lo tanto, la invención tiene la tarea de crear nuevos copolímeros basados en poli(etilenimina) que se pueden fabricar con el menor coste posible y a medida, y que presentan una funcionalidad alta para aplicaciones efectivas universales, sin limitar, sin embargo, su facultad de enlace frente a material genético, particularmente ADN/ARN.

20 [0022] Por ejemplo, se pueden representar hidrogeles a partir de copolímeros basados en poli(etilenimina) con gran afinidad de enlace a ADN/ARN.

[0023] Esta tarea se resuelve con copolímeros nuevos basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético, particularmente ADN/ARN, que consisten en unidades de etilenimina y 2-oxazolina, que presentan un enlace con la siguiente fórmula general:

25

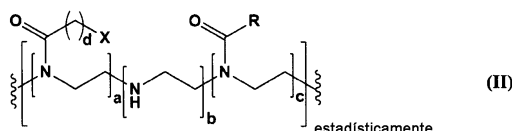


con

30 a, b: proporción de las unidades respectivas de monómeros (a, b > 0)
d: longitud de la cadena lateral (1 hasta 20),
X: grupo funcional de la unidad de 2-oxazolina (por enlace doble o triple)

35 una longitud de cadena de copolímero entre 2 y 1000000 unidades

[0024] Es ventajoso que estos copolímeros nuevos basados en poli(etilenimina) presenten respectivamente diferentes unidades de oxazolina según la fórmula general II:



40

con:

a, b, c: proporción de las unidades respectivas de monómeros con (a, b, c > 0)
d: longitud de la cadena lateral (1 hasta 20)
45 X: grupo funcional de la unidad de 2-oxazolina (por enlace doble o triple),
R: Grupo H u orgánico (p. ej. grupo alquilo o arilo)

una longitud de cadena de copolímero entre 2 y 1000000 de unidades

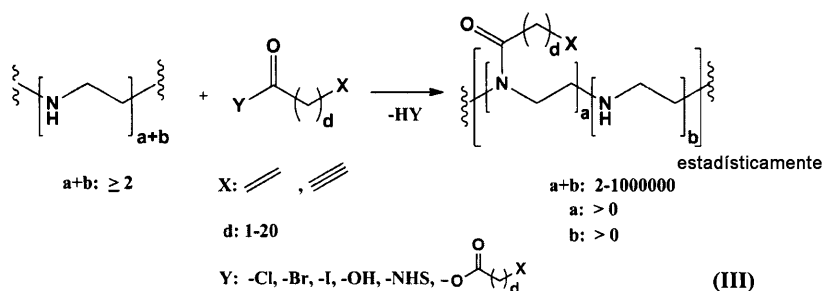
50 [0025] La composición de los copolímeros a medida se puede determinar de forma sencilla y rápida con ayuda de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. La estructura de los copolímeros según la invención permite enlaces múltiples en la columna copolimérica y crea de esta manera las condiciones para funcionalidades, sin limitar sin embargo la afinidad de enlace a material genético frente al estado de la técnica conocido. Estas funcionalidades mencionadas permiten por consiguiente otras aplicaciones, en las que se apoya completamente

el enlace/liberación, particularmente de ADN y ARN. Por ejemplo, mediante química clic conocida en sí (Thiol-en Photoaddition, Azid-Click) se puede añadir otro componente al copolímero descrito. La gran ventaja del copolímero fabricado es la característica de que los grupos amínicos presentes y cuantificados de forma exacta no se ven afectados por esta reacción. Su afinidad con el enlace y liberación de material genético no se ve por tanto dañado tampoco y se puede seguir influyendo en ella ajustando el contenido de PEI en el copolímero. El foco sigue estando en la introducción de cadenas laterales cortas sencillas, que no tienen ninguna influencia en una aplicación biológica y permiten por lo tanto declaraciones cuantitativas para el enlace de material genético.

[0026] En las reivindicaciones secundarias se exponen aplicaciones especiales de los copolímeros propuestos en base a las funcionalidades descritas anteriormente. Los copolímeros se pueden aplicar por ejemplo sobre superficies funcionalizadas y pueden hacer posible un enlace y liberación de material genético sobre estos. A través de enlace superficial están presentes varios enlaces múltiples, que se pueden usar para formar la estructura gradual de capas de hidrogel sobre la superficie deseada. Otra ventaja es la posibilidad de la estructuración de redes de polímeros tridimensionales, los llamados hidrogeles. Con ayuda de un enlazador bifuncional (ditiol) se pueden reticular los copolímeros hacia tales hidrogeles. Una desventaja decisiva de tales redes de polímeros es la característica de su absoluta insolubilidad en cualquier solvente. Por lo tanto, no es posible una determinación del contenido de PEI definido en la estructura de gel por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (de solución) (como para los copolímeros). Sobre la caracterización del copolímero mencionada anteriormente y la reticulación sucesiva sobre las funcionalidades insaturadas (los grupos amínicos permanecen intactos) no puede hacerse, sin embargo, una declaración exacta sobre la proporción de PEI presente en el hidrogel.

[0027] La realización sencilla y rápida, por ejemplo, de la fotoadición de tiol a través de radiación de la muestra con luz ultravioleta (365nm) conduce además a la posibilidad de fabricar in situ perlas de hidrogel a medida. También aquí puede tener lugar la liberación y enlace deseados de material genético.

[0028] Los nuevos copolímeros basados en poli(etilenimina) se representan según la invención por una síntesis de la fórmula general III:



[0029] Es ventajoso, cuando en el caso de -OH o NHS se introduce como ácido la funcionalización en presencia de un reactivo de activación, particularmente EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) o DCC (diciclohexilcarbodiimida).

[0030] Sin embargo, la cadena lateral funcional también se puede introducir por una funcionalización posterior mediante haluro o anhídrido de ácido insaturado (-Cl, -Br, -I).

[0031] Los copolímeros según la invención presentan, debido a su camino de síntesis tanto funcionalidades insaturadas como también grupos amínicos libres. La síntesis de un copolímero de la fórmula el o II se basa según la invención en una funcionalización posterior del homopolímero polietilenimina (fórmula III). El método de síntesis permite una realización de bajo coste y sencilla desde el punto de vista de la técnica del método, que es posible tanto a pequeña escala como también en el método de alto rendimiento. La fabricación de copolímeros a medida conduce a sustancias con composiciones exactamente definidas, que pueden variar según el propósito de la aplicación. Su composición exacta se puede determinar de manera sencilla y rápida mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear. De esta manera, mediante una sencilla variación de las cantidades de material de partida se pueden elaborar bibliotecas detalladas de copolímeros de las composiciones más variadas.

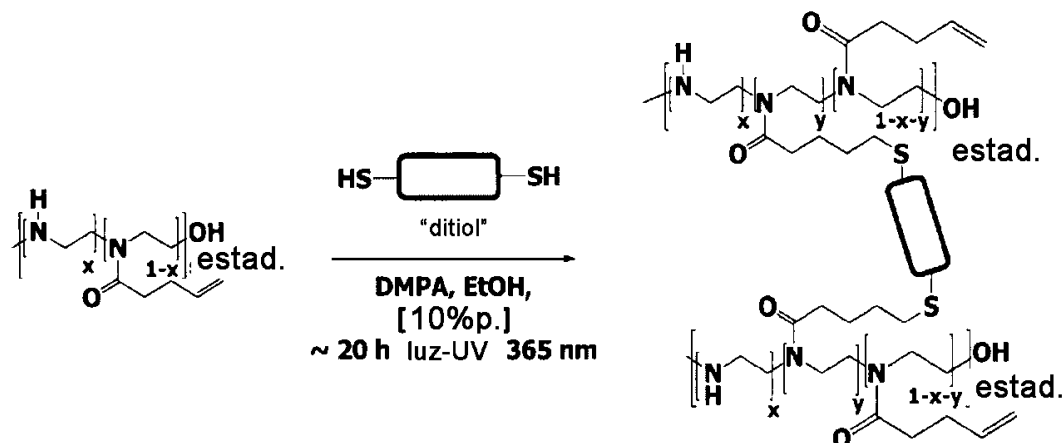
[0032] La invención se explica más detalladamente a continuación por medio de ejemplos de realización.

Ejemplo 1:

[0033] La síntesis de hidrogeles con proporción de PEI ajustable de forma exacta (para el posterior enlace y liberación de ADN de arenque genómico), donde la reticulación de los copolímeros se realiza mediante fotoadición

de tiol fotoiniciada análogamente a Dargaville (T.R. Dargaville et al.: Poly(2-oxazoline) hydrogel monoliths via thiolene coupling, *Macromol. Rapid Commun.* 33, 2012, 1695-700)

5 [0034] La fórmula que sigue muestra la representación esquemática de la fotoadición de tiol Photoaddition de P(ButEnOx-co-EI) con 2,2'-(etilenedioxi)dietantiol en presencia del catalizador DMPA bajo luz ultravioleta (365 nm).



10 Hidrogeles basados en poli[2-(3-butenil)-2-oxazolina-co-etilenimina]:

[0035] En un vial de microondas se disolvió el copolímero P(ButEnOx-co-EI) en etanol. En un segundo vial se realizó la solución del fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenol y del tiol bifuncional, 2,2'-(etilenedioxi)dietanetiolo, igualmente en etanol (0,9:1,0 tiol: enlace doble). Las soluciones combinadas, claras (10 % p) se desgasificaron 30 minutos con nitrógeno y a continuación se expusieron 24 horas completas a luz ultravioleta (365 nm). La formación de gel por aplicar mostró la síntesis de hidrogel realizada con éxito. El gel obtenido se lavó varias veces con agua y metanol. A continuación se realizó una liofilización.

[0036] Se pudo producir una biblioteca de hidrogeles diferentes partiendo de copolímeros correspondientes. Las sustancias sintetizadas se pudieron caracterizar de modo amplio (valor de engrosamiento, vapor TGA, FT-IR, EA, sólido ¹H-/¹³C- RMN, SEM).

Estudios de ADN – prueba de bromuro de etidio de hidrogeles basados en P(ButEnOx-co-EI):

25 [0037] Los hidrogeles se pusieron a remojo 24 horas en tampón-HBG (pH 7). A continuación se añadió una solución de bromuro de etidio de ADN genómico. En momentos definidos se tomó respectivamente una parte alícuota y se pipeteó nuevamente después de realizar la medición fluorescente. La liberación deseada del ADN enlazado previamente se pudo realizar en un periodo de tiempo muy corto añadiendo una solución de heparina y aumentando la temperatura a 70°C.

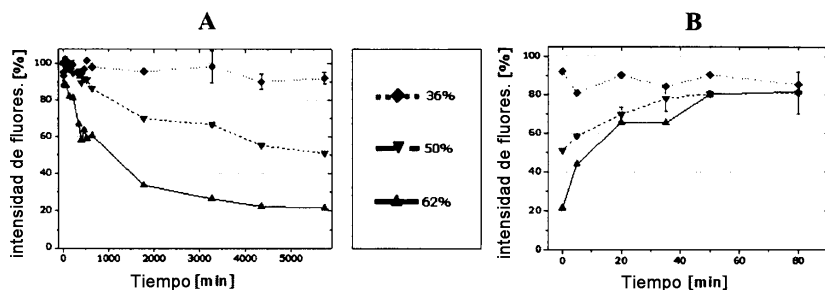


Diagrama 1: Representación esquemática del enlace (A) y liberación (B) de ADN de arenque genómico de hidrogeles con contenido diferente de PEI con test EB

30 Resultados:

[0038] Una formación de gel tiene lugar por debajo de un contenido-PEI de 75%. Los hidrogeles muestran además de su no solubilidad esperada, un comportamiento típico de engrosamiento en agua, que depende fuertemente del

contenido de PEI y del grado de reticulación (cantidad del ditiol) de los geles. La capacidad de enlace y liberación de ADN depende de la proporción de PEI dentro de la estructura del hidrogel. Para la liberación deseada se necesita además de un aumento de la temperatura también la presencia de heparina. En este caso se puede liberar el ADN nuevamente de forma casi completa (< 60 min).

5

Ejemplo 2:

[0039] Formulación de perlas de hidrogel por medio de una fotoadición de tiol de forma análoga a una polimerización de suspensión.

10

[0040] Con la representación de los copolímeros nuevos propuestos como perlas de hidrogel se consigue un agrandamiento superficial extremo y relacionado con esto un enlace de ADN más efectivo. Además, existe la posibilidad de ajustar tamaños de perlas definidos exactamente cambiando las condiciones de reacción.

15 Perlas de hidrogel basadas en P(ButEnOx-co-EI):

[0041] Como material de partida servía el copolímero P(ButEnOx-co-EI_{50%}). Este copolímero y una cantidad correspondiente del catalizador DMPA se disolvieron en etanol (8 % p) y a continuación se mezcló con ditiol 2,2'-(etilenodioxo)diethanethiol. Añadiendo aceite de parafina y el estabilizador Span®80 se pudo producir una mezcla bifásica. Después de una desgasificación de 25 min. con N₂ se realizó la fotoadición de tiol mediante agitación (375 rpm) a temperatura ambiente y radiación ultravioleta (365 nm). Después de 2,5 h se separó el hidrogel y se lavó de forma intensiva con agua y etanol. A continuación el gel se dejó en remojo seis horas en agua y se liofilizó.

20

Ejemplo 3:

25

[0042] Yuxtaposición de monocapas en superficies de vidrio funcionalizadas por medio de una fotoadición de tiol y la producción gradual de hidrocapas unidas de forma covalente.

[0043] Con el enlace covalente de los copolímeros nuevos propuestos a superficies tiolfuncionalizadas se puede lograr el enlace efectivo de ADN y la liberación de superficies. A través de la instalación del ditiol ya mencionado se pueden formar gradualmente capas de hidrogel (vista en conjunto 1), que presentan afinidad de ADN diversa según del grosor de la capa. Esta aplicación del enlace y liberación de material genético, particularmente ADN/ARN, de superficies recubiertas debe emplearse por ejemplo en la analítica móvil (Diagnóstico de chip).

30

[0044] En un vial de microondas cónico el copolímero P(ButEnOx-co-EI_{50%}) se disolvió junto al fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenon en etanol. Una plaquita de vidrio calentada previamente y funcionalizada con 3-(trimetoxisilil)-1-propanetiol con un tamaño de 1 x 1 cm² se colocó de tal manera que seguía siendo posible la agitación de una barra de agitación debajo de la placa de vidrio introducida. El vial se desgasificó 30 minutos con nitrógeno y a continuación se expuso 24 horas a luz ultravioleta (365 nm). La superficie de vidrio revestida (1^{er} clic) se lavó repetidas veces con agua y metanol. De forma análoga se realizó el segundo clic añadiendo el reticulante 2,2'-(etilenodioxo)diethanethiol en vez del copolímero.

35

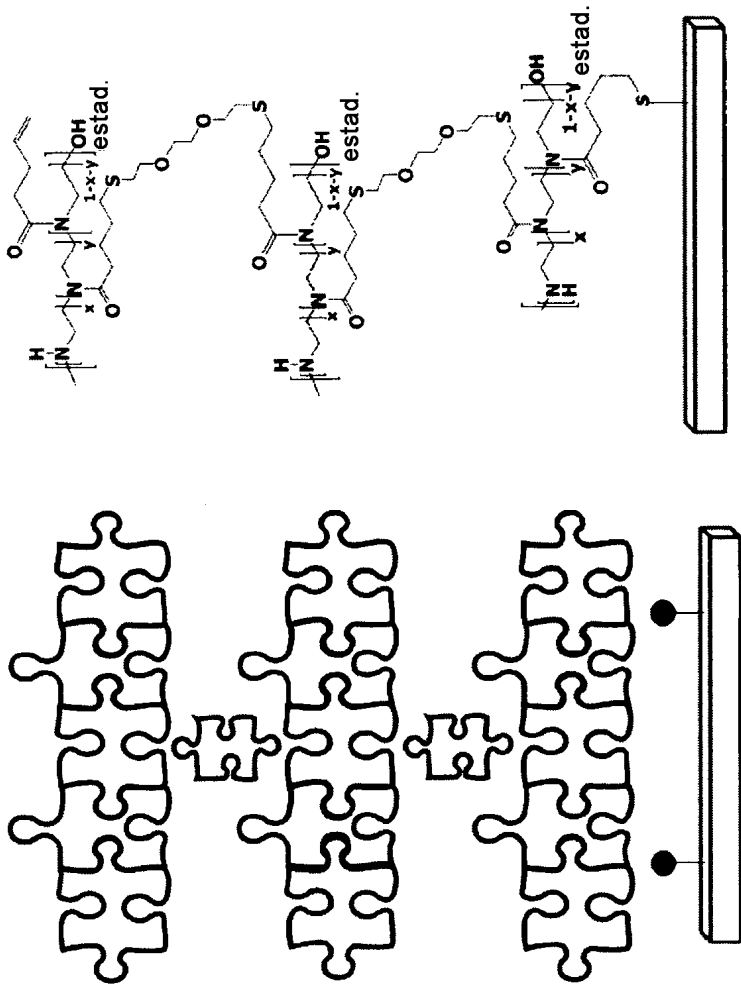
40

Se realizaron nuevamente los pasos de lavado. La reacción repetida con el copolímero descrito (tercer clic) condujo a la formación formal de la capa de hidrogel. A través de enlaces dobles disponibles se pudo realizar la estructura en capas hasta el 7^o clic, siendo posibles además más capas.

45

5. Clic
4. Clic
3. Clic
2. Clic
1. Clic

Funcionalización limpieza de plasma

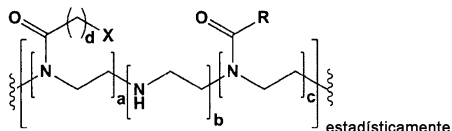


Vista en conjunto 1: Fondo químico del revestimiento

5 [0045] El revestimiento realizado de las superficies de vidrio se pudo mostrar mediante microscopia fluorescente. Para ello se marcó (~1 %) el copolímero descrito con el colorante fluoresceína y este se añadió a la superficie después de añadir el paso de clic. Aquí la superficie tratada también mostró un enlace covalente realizado con éxito también después de lavado intensivo por una fluorescencia aumentada de la muestra marcada en comparación con un revestimiento sin colorante. Las mediciones de un araño sobre las superficies revestidas mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear dieron como resultado para la primera capa (1^{er} clic) 10 un espesor de 15 nm. Para la formación de una capa de hidrogel (3^{er} clic) se pudo determinar una altura de 35 nm. Además, se pudo mostrar un enlace realizado con éxito con ayuda de la espectroscopia de infrarrojo.

REIVINDICACIONES

5 1. Copolímeros basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético en forma de ADN/ARN que consisten en unidades de etilenimina y 2-oxazolona con la siguiente fórmula general y presentan respectivamente diferentes unidades de oxazolona:

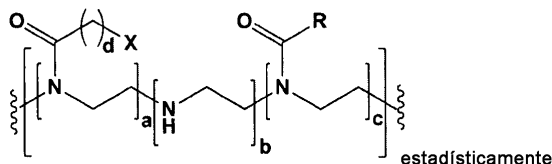


con:

10 a, b, c: proporción de las unidades respectivas de monómeros con $a, b > 0, c > 0$,
 d: longitud de la cadena lateral con $d = 1$,
 X: enlace doble o triple,
 R: Grupo H, alquilo o arilo

15 y una longitud de cadena de copolímero entre 2 y 1000000 unidades.

2. Copolímeros basados en poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético en forma de ADN/ARN que consisten en unidades de etilenimina y 2-oxazolona con la siguiente fórmula general:

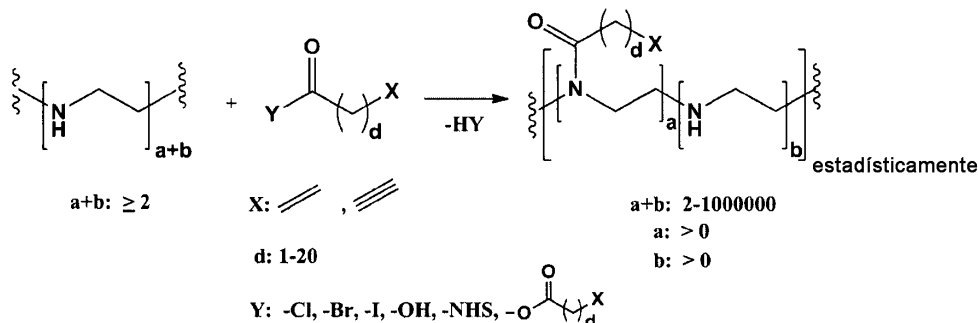


20 con:

a, b, c: proporción de las unidades respectivas de monómeros con $a, b > 0, c > 0$,
 d: longitud de la cadena lateral con $d = 2$,
 X: enlace doble,
 R: Grupo H, alquilo o arilo

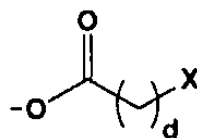
25 y una longitud de cadena de copolímero entre 2 y 1000000 unidades.

30 3. Método para la fabricación de copolímeros basados de poli(etilenimina) para el enlace y liberación de material genético en forma de ADN/ARN que consisten en unidades de etilenimina y 2-oxazolona, donde se realiza una síntesis según la fórmula general:



35 4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** en el caso de $-\text{OH}$ o $-\text{NHS}$ como ácido se realiza la funcionalización en presencia de un reactivo de activación en forma de etil-3-(3-dimetilaminopropil)-1 carbodiimida o dicitohexilcarbodiimida.

40 5. Método según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** la cadena lateral funcional se introduce por una funcionalización posterior mediante anhídridos de ácido insaturados (



o de haluros de ácido en forma de Cl, Br o I.

- 5 6. Aplicación de los copolímeros basados en poli(etilenimina) según la reivindicación 1 o 2 para la funcionalización de la superficie de un sustrato para el enlace y liberación de material genético.
7. Aplicación según la reivindicación 6, **caracterizada por el hecho de que** el sustrato está presente en forma de perlas o partículas.
- 10 8. Aplicación de los copolímeros basados de poli(etilenimina) según la reivindicación 1 o 2 para la fabricación o como componente de hidrogeles estructurados en forma de perlas o partículas para el enlace y liberación de material genético.
- 15 9. Aplicación según la reivindicación 8, **caracterizada por el hecho de que** el hidrogel está presente en forma de perlas o partículas.