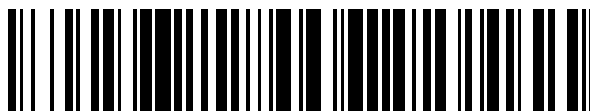


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 965**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C08G 73/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/IB2014/059594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14136100**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14713268 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2964244**

54 Título: **Poli(beta-aminoésteres) para el suministro de fármacos**

30 Prioridad:

08.03.2013 GB 201304245

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

09.09.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT QUÍMIC DE SARRIÀ CETS FUNDACIÓ
PRIVADA (100.0%)**

**Via Augusta 390
08017 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BORRÓS GÓMEZ, SALVADOR;
RAMOS PÉREZ, VÍCTOR;
SEGOVIA RAMOS, NATHALY y
DOSTA PONS, PERE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 781 965 T3

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

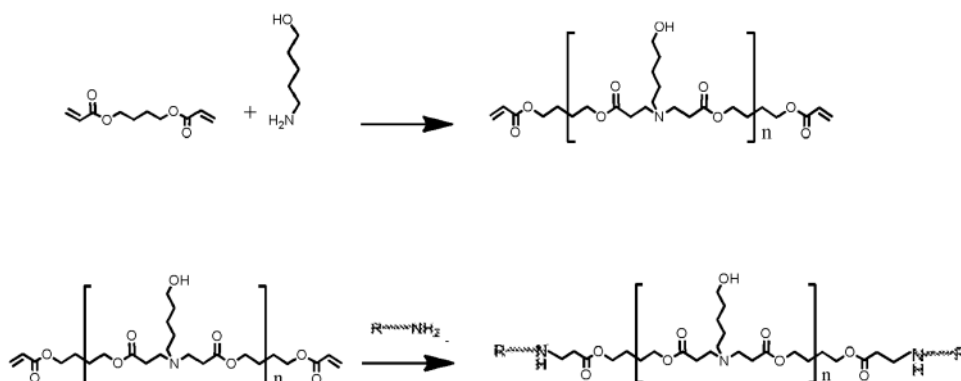
DESCRIPCIÓN

Poli(beta-aminoésteres) para el suministro de fármacos

5 La invención se refiere a polímeros adecuados para su uso en el suministro de agentes activos. La invención también se refiere a nanopartículas que comprenden estos polímeros y a los métodos para su producción.

La falta de vectores seguros y eficaces para la administración de polinucleótidos tales como el ADN y el ARN sigue siendo la principal desventaja para el éxito de la terapia génica (Luo, D. y Saltzman, W.M. Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotech.* 18, 33-37 (2000); Kamimura K. et al, *Advances in Gene Delivery Systems. Pharmaceut Med.* 25, 293-306 (2011); Miele E. et al., *Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. Int. J. Nanomedicine* 7, 3637-3657 (2012)). La mayoría de los protocolos para el suministro de polinucleótidos emplea vectores virales, que son sistemas de suministro altamente eficaces. Sin embargo, los vectores virales tienen ciertas desventajas, incluyendo el riesgo para la seguridad, la capacidad limitada para transportar polinucleótidos y el alto coste de producción a gran escala. Los vectores no virales ofrecen ventajas potenciales, incluyendo una alta capacidad de empaquetamiento, facilidad de producción, baja toxicidad e inmunogenicidad, pero son menos eficaces que los vectores virales (Mintzer, M. A. y Simanek, E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev.* 109, 259-302 (2009)).

20 Se han descrito poli(β -aminoésteres) (PBAE) biodegradables como posibles vectores de suministro de polinucleótidos no virales capaces de condensar tanto ADN como ARN en partículas nanométricas discretas (Green, J.J. et al. *Acc. Chem Res.* 41, 749-759 (2008)). Se ha demostrado que la modificación química en los extremos de los PBAE con aminas primarias (véase el Esquema 1) produce una mayor eficacia de transfección que los agentes de transfección comerciales tales como Lipofectamine 2000, Fugene and polyethylenimine (PEI) (Zugates, G.T. et al. *Bioconjugate Chem.* 18, 1887-1896 (2007); Green, J.J. et al. *Nano letters* 8, 3126-3130 (2008); documento WO02/31025A2).



30 El documento US 2012114759 A1 describe nanopartículas poliméricas, micropartículas y geles para el suministro de una carga, p. ej. un agente terapéutico, a una diana.

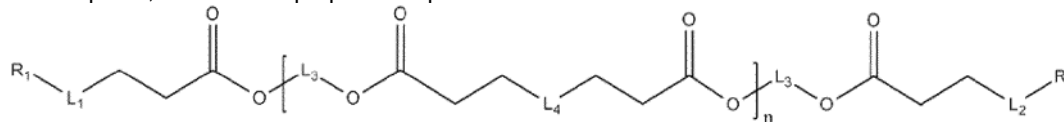
Existe una necesidad continua de polímeros mejorados, no tóxicos, biodegradables y biocompatibles que se puedan utilizar para transfectar polinucleótidos de manera eficaz y que se puedan preparar económicamente. Tales polímeros serían útiles en el empaquetamiento y suministro de ADN y ARN en terapia génica y para el empaquetamiento y suministro de otros agentes de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos.

En particular, existe la necesidad de polímeros que se puedan utilizar para transfectar eficazmente polinucleótidos cortos, particularmente ARNip y microARN (miARN), que tienen poca estabilidad en la circulación. Los vectores de suministro de polinucleótidos poliméricos existentes no pueden encapsular ARNip y miRNA con alta carga debido a la longitud relativamente corta de estas secuencias. Además, muchos vectores de suministro poliméricos existentes para ARNip y miARN son citotóxicos.

La presente invención proporciona nuevos PBAE con extremos modificados útiles en una variedad de aplicaciones médicas que incluyen el suministro de fármacos, particularmente en el suministro de polinucleótidos; ingeniería de tejidos y biomateriales. La presente invención está particularmente dirigida a las aplicaciones médicas de los PBAE. La invención también proporciona complejos de los polímeros con extremos modificados de la invención con polinucleótidos, dispositivos de suministro de fármacos (p. ej., micropartículas, nanopartículas) que incluyen los polímeros de la invención, los métodos de preparación de polímeros con extremos modificados y los métodos de uso de los polímeros con extremos modificados de la invención.

La naturaleza de poliéster de estos sistemas da como resultado un perfil biocompatible atractivo debido a su alta biodegradabilidad y su toxicidad reducida. Por lo tanto, estos polímeros tienen aplicaciones como vectores de suministro de polinucleótidos no virales en el tratamiento de muchas enfermedades tales como cáncer, enfermedades monogénicas, enfermedades vasculares y enfermedades infecciosas. Otra aplicación de estos vectores de suministro de polinucleótidos es en la investigación *in vitro* como herramienta para investigar la función o regulación génica dentro de un contexto celular y fisiológico.

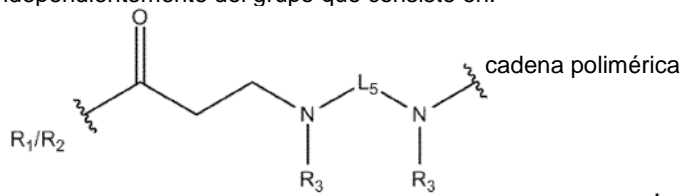
En un primer aspecto, la invención proporciona polímeros de **Fórmula I**:



Fórmula I

en donde

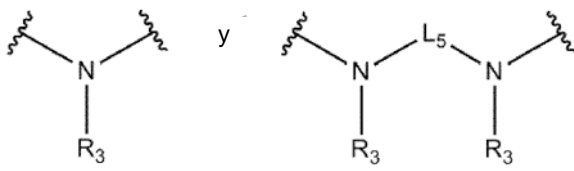
L₁ y L₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:



O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

L₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alqueno, alquenoileno, heteroalqueno, heteroalquenoileno, arileno o heteroarileno;

L₄ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



L₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alqueno, alquenoileno, heteroalqueno, heteroalquenoileno, arileno o heteroarileno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre un oligopéptido y R_y;

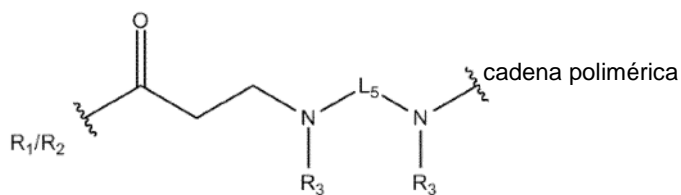
en donde al menos uno de R₁ y R₂ es un oligopéptido; en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7; o en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende una mezcla de aminoácidos naturales que están cargados negativamente a pH 7 y aminoácidos naturales que están cargados positivamente a pH 7;

y en donde R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; y n es un número entero de 5 a 10.000;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un segundo aspecto de la descripción se proporcionan polímeros de **Fórmula I**, en donde L₁ y L₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

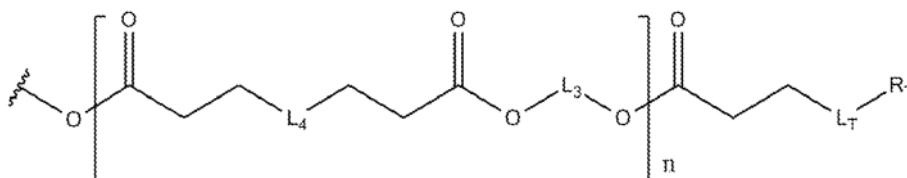


5 O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; al menos una ocurrencia de L₃ es

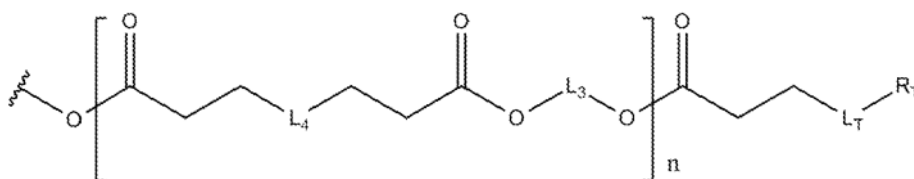


en donde T₁ es

10

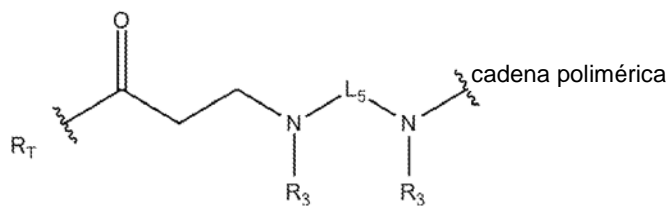


y T₂ se selecciona entre H, alquilo o



15

en donde L_T se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

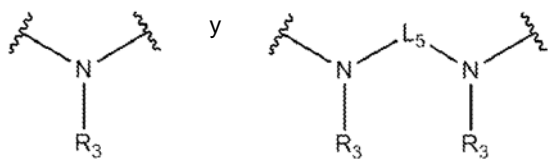


20

O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

25

los grupos L₃ restantes se seleccionan independientemente en cada aparición del grupo que consiste en alquilenilo, alquenilenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilenilo, arileno o heteroarileno, en donde L₄ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



30

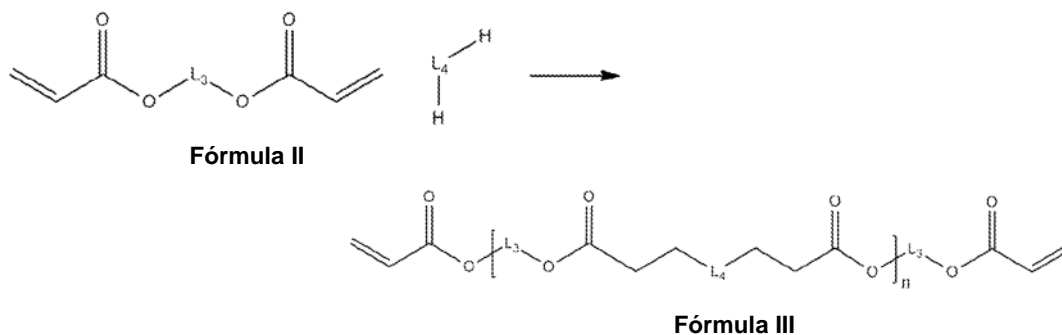
L₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilenilo, alquenilenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilenilo, arileno o heteroarileno;

R₁, R₂ y R_T se seleccionan independientemente entre un oligopéptido y R_y;
 en donde al menos uno de R₁, R₂ y R_T es un oligopéptido;
 y en donde R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;
 cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; y
 n es un número entero de 5 a 10,000;

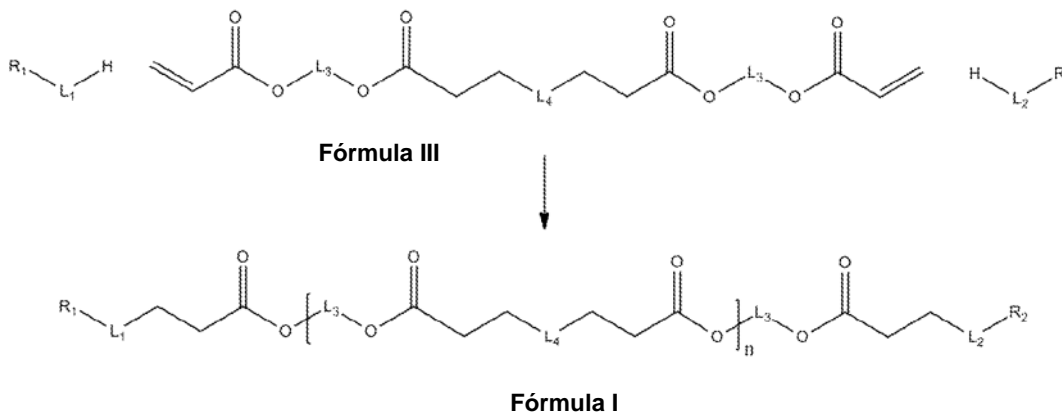
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona PBAE con extremos modificados con al menos un oligopéptido. Estos PBAE actúan como agentes de condensación superiores para polinucleótidos y/o como ligandos dirigidos para mejorar la absorción celular y la eficacia de transfección. Estos polímeros tienen grupos biodegradables capaces de mejorar el suministro de polinucleótidos a las células y han demostrado una alta eficacia de transfección y una citotoxicidad reducida in vitro en comparación con los PBAE conocidos y los agentes de transfección comerciales.

Los polímeros de Fórmula I se pueden preparar por reacción de monómeros de diacrilato de **Fórmula II** con aminas sustituidas de fórmula L₄H₂ para formar un intermedio terminado en acrilato, **Fórmula III**



Los grupos R₁L₁ y R₂L₂ se puede añadir después por reacción con un grupo acrilato terminal para formar un polímero de Fórmula I.



En polímeros de acuerdo con la presente invención, cada L₁ y L₂ (y, en el segundo aspecto, L_T) se selecciona para facilitar el acoplamiento de los grupos modificadores de los extremos R₁ y R₂ al polímero PBAE. Cada L₁ y L₂ (y, en el segundo aspecto, L_T) puede ser un enlace, por ejemplo, donde el grupo modificador de los extremos es un oligopéptido que comprende un residuo de cisteína terminal.

En el segundo aspecto de la descripción, L_T se selecciona para facilitar el acoplamiento del grupo modificador de los extremos R_T al polímero PBAE. L_T puede ser un enlace, por ejemplo, donde el grupo modificador de los extremos es un oligopéptido que comprende un residuo de cisteína terminal.

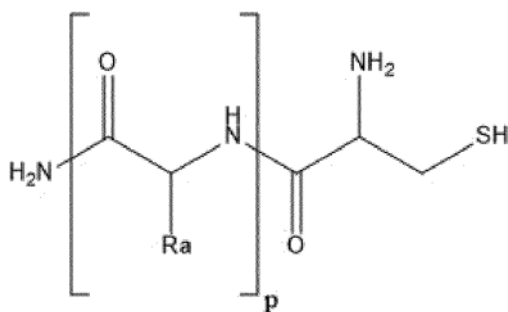
En polímeros de acuerdo con la presente invención, R_x se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heteroalquilo y heterocicloalquilo, por ejemplo, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y cicloalquilo.

Según la presente invención, un "oligopéptido" comprende una cadena de al menos tres aminoácidos conectados

por enlaces peptídicos. Tales péptidos contienen preferiblemente solo aminoácidos naturales, aunque se pueden emplear alternativamente aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se encuentran en la naturaleza pero que se pueden incorporar a una cadena de polipéptidos) y/o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica. Asimismo, uno o más de los aminoácidos de dichos péptidos se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso o un conector para la conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. Los oligopéptidos en los polímeros de la presente invención comprenden típicamente de 3 a 20 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 3 a 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 3 a 6 residuos de aminoácidos. Alternativamente, los oligopéptidos en los polímeros de la presente invención pueden comprender de 4 a 20 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 4 a 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 4 a 6 residuos de aminoácidos.

La presente invención proporciona adicionalmente polímeros de fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7. El oligopéptido o cada oligopéptido pueden comprender aminoácidos de origen natural que están cargados positivamente a pH 7, es decir, lisina, arginina e histidina. Por ejemplo, el oligopéptido o cada oligopéptido se pueden seleccionar del grupo que consiste en polilisina, poliarginina o polihistidina, cada uno de los cuales puede terminar en cisteína.

En una realización, el oligopéptido o cada oligopéptido es preferiblemente un compuesto de Fórmula IV:



Fórmula IV

en donde p es un número entero de 2 a 19, típicamente de 3 a 9 o de 3 a 5, y en donde R_a se selecciona en cada aparición del grupo que consiste en $H_2NC(=NH)-NH(CH_2)_3-$, $H_2N(CH_2)_4-$ o (1*H*-imidazol-4-il)- CH_2- .

Donde el oligopéptido o cada oligopéptido es un compuesto de Fórmula IV, L_1 y/o L_2 (y/o, en el segundo aspecto, L_T) que conectan el oligopéptido o cada oligopéptido al polímero son un enlace y el residuo de cisteína terminal proporciona un medio para acoplar el oligopéptido o cada oligopéptido al intermedio terminado en acrilato, Fórmula III. La funcionalidad tiol proporciona una adición más rápida, más eficaz y más fácil de controlar, al doble enlace. Por el contrario, cuando el oligopéptido o cada oligopéptido termina en una funcionalidad amina para el acoplamiento, se requiere un exceso de este compuesto en la etapa de acoplamiento.

La presente descripción proporciona adicionalmente polímeros de fórmula I, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga negativa neta a pH 7. El oligopéptido o cada oligopéptido pueden comprender aminoácidos naturales que están cargados negativamente a pH 7, es decir, ácido aspártico y ácido glutámico. Por ejemplo, el oligopéptido o cada oligopéptido se puede seleccionar del grupo que consiste en poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico), cada uno de los cuales puede terminar en cisteína. En esta realización, el oligopéptido o cada oligopéptido puede ser un compuesto de Fórmula IV en donde p es un número entero de 2 a 19, típicamente de 3 a 9 o de 3 a 5, y en donde R_a es $HO_2C(CH_2)_2-$ o HO_2C-CH_2- . En este caso, la L_1 y/o L_2 que unen el oligopéptido o cada oligopéptido al polímero son un enlace, ya que el residuo de cisteína terminal proporciona un medio para acoplar el oligopéptido o cada oligopéptido al intermedio terminado en acrilato, fórmula IV.

Alternativamente en la presente invención, el oligopéptido o cada oligopéptido puede comprender una mezcla de aminoácidos naturales que están cargados negativamente a pH 7 y aminoácidos naturales que están cargados positivamente a pH 7.

La presente invención proporciona adicionalmente polímeros de fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido es hidrófobo. El oligopéptido o cada oligopéptido puede comprender aminoácidos naturales que son hidrófobos tales como valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, cisteína, tirosina y alanina; en particular, el oligopéptido o cada oligopéptido puede comprender valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano y fenilalanina.

La presente invención proporciona adicionalmente polímeros de fórmula I, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido es hidrófilo. El oligopéptido o cada oligopéptido puede comprender aminoácidos naturales que son hidrófilos, tales como serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina, y puede comprender adicionalmente aminoácidos naturales que están cargados a pH 7.

5 Según el primer aspecto de la invención, se proporcionan polímeros de fórmula I en donde tanto R_1 como R_2 son oligopéptidos, y polímeros de fórmula I en donde uno de R_1 y R_2 es un oligopéptido y uno de R_1 y R_2 es R_y .

10 Según el primer aspecto de la invención, cuando uno de R_1 y R_2 es R_y , R_y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-(CH_2)_mNH_2$, $-(CH_2)_mNHMe$, $-(CH_2)_mOH$, $-(CH_2)_mCH_3$, $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_mNH_2$, $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_mOH$ and $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_mCH_3$ en donde m es un número entero de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 5. Preferiblemente, R_y se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_mNH_2$, $-(CH_2)_mNHMe$ y $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_mNH_2$. Preferiblemente, cuando L_1 es NH o NR_x y uno de R_1 y R_2 es R_y , en ese caso R_y es diferente de R_3 .

15 Los polímeros de la presente invención pueden ser asimétricos. Por ejemplo, en polímeros de acuerdo con el primer aspecto de la invención uno de R_1 y R_2 puede ser un oligopéptido y el otro puede ser R_y . Alternativamente, R_1 y R_2 pueden ser cada uno un oligopéptido diferente. En polímeros de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción, al menos uno seleccionado entre R_1 , R_2 y las una o dos apariciones de R_5 pueden ser un oligopéptido y los grupos restantes seleccionados entre R_1 , R_2 y las unas o dos apariciones de R_T pueden ser R_y . Alternativamente, R_1 , R_2 y las una o dos apariciones de R_T cada uno pueden ser un oligopéptido diferente.

20 Los autores de la presente invención han encontrado que los polímeros asimétricos tienen una mayor eficacia de suministro de polinucleótidos. Por ejemplo, los polímeros de acuerdo con el primer aspecto de la invención en donde uno de R_1 y R_2 es CysArgArgArg y el otro deriva de $H_2N(CH_2)_3CH(CH_3)CH_2NH_2$ tienen una mayor eficacia de suministro de polinucleótidos que ambos polímeros en los que tanto R_1 como R_2 son CysArgArgArg y polímeros en los que tanto R_1 como R_2 derivan de $H_2N(CH_2)_3CH(CH_3)CH_2NH_2$.

25 En polímeros de acuerdo con la presente invención, L_3 y L_5 se pueden seleccionar independientemente entre alquileno, alquenileno, heteroalquileno o heteroalquenileno y conectores de polietilenglicol. Dichos radicales alquileno, alquenileno, heteroalquileno o heteroalquenileno pueden tener de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. Dichos conectores de polietilenglicol pueden tener de 3 a 25 átomos de longitud, preferiblemente de 3 a 18 átomos de longitud.

35 Opcionalmente, uno o más átomos de carbono en L_3 y/o L_5 puede ser reemplazado por -S-S-. La inclusión de al menos un enlace disulfuro en la cadena polimérica principal permite un desempaquetamiento eficaz de los polinucleótidos terapéuticos dentro de las células diana.

40 En polímeros de acuerdo con la presente invención, cada R_3 se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-(CH_2)_pNH_2$, $-(CH_2)_pNHMe$, $-(CH_2)_pOH$, $-(CH_2)_pCH_3$, $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_qNH_2$, $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_qOH$ y $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_qCH_3$ en donde p es un número entero de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 5, y q es un número entero de 1 a 10, por ejemplo de 1 a 5.

45 En la fórmula I o II anterior, n es preferiblemente de 5 a 1000, más preferiblemente de 20 a 500. El peso molecular del polímero de fórmula I o fórmula II es preferiblemente de 1.000 a 100.000 g/mol, más preferiblemente 2.000 y 50.000 g/mol más preferiblemente 5.000 y 40.000 g/mol.

50 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas concretas. La presente invención contempla todos estos compuestos, incluyendo los isómeros cis y trans, los enantiómeros R y S, los diastereómeros, los isómeros (D), los isómeros (L), las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, que caen dentro del alcance de la invención. Pueden estar presentes átomos de carbono asimétricos adicionales en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Se pretende que todos estos isómeros, así como sus mezclas, estén incluidos en esta invención.

55 Las mezclas isoméricas que contienen cualquiera de una variedad de razones de isómeros se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, cuando solo se combinan dos isómeros, se contemplan en la presente invención las mezclas que contienen las razones de isómeros 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 o 99:1. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que se contemplan razones análogas para mezclas de isómeros más complejas.

60 **Grupos químicos**

El término "halógeno" (o "halo") incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "alquilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos, saturados, lineales o ramificados, monovalentes. En una realización, el alquilo es alquilo C₁-C₁₀, en otra realización alquilo C₁-C₆, en otra realización alquilo C₁-C₄, tal como grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo o t-butilo. El alquilo puede estar sustituido.

5 El término "cicloalquilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, saturados, monovalentes. En una realización, el cicloalquilo es cicloalquilo C₃-C₁₀, en otra realización cicloalquilo C₃-C₆ tal como ciclopentilo y ciclohexilo. El cicloalquilo puede estar sustituido.

El término "alcoxi" significa alquil-O-.

10

El término "alquilamino" significa alquil-NH-.

El término "alquiltio" significa alquil-S(O)_t-, en donde t se define a continuación.

15 El término "alqueno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos, insaturados, lineales o ramificados, monovalentes que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el alqueno es alqueno C₂-C₁₀, en otra realización alqueno C₂-C₆, en otra realización alqueno C₂-C₄. El alqueno puede estar sustituido.

20 El término "cicloalqueno" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, parcialmente insaturados, monovalentes que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el cicloalqueno es cicloalqueno C₃-C₁₀, en otra realización cicloalqueno C₅-C₁₀ *p. ej.* ciclohexeno o benzociclohexeno. El cicloalqueno puede estar sustituido.

25 El término "alquino" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos, insaturados, lineales o ramificados, monovalentes que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, no tienen enlaces dobles carbono-carbono. En una realización, el alquino es alquino C₂-C₁₀, en otra realización alquino C₂-C₆, en otra realización alquino C₂-C₄. El alquino puede estar sustituido.

30 El término "alqueno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos saturados, lineales o ramificados, divalentes. En una realización, el alqueno es alqueno C₁-C₁₀, en otra realización alqueno C₁-C₆, en otra realización alqueno C₁-C₄, tal como grupos metileno, etileno, n-propileno, i-propileno o t-butileno. El alqueno puede estar sustituido.

35 El término "alqueno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos insaturados, lineales o ramificados, divalentes que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el alqueno es alqueno C₂-C₁₀, en otra realización alqueno C₂-C₆, en otra realización alqueno C₂-C₄. El alqueno puede estar sustituido.

40 El término "heteroalquilo" incluye grupos alquilo, por ejemplo, grupos alquilo C₁-C₆₅, grupos alquilo C₁-C₁₇ o grupos alquilo C₁-C₁₀, en los que hasta veinte átomos de carbono, en una realización hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del alquilo. El grupo heteroalquilo puede estar conectado a C o conectado a un heteroátomo, es decir, puede estar conectado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_t o N, en donde t se define a continuación. El heteroalquilo puede estar sustituido.

45 El término "heterocicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo en los que hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del cicloalquilo. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen oxirano, tiarano, aziridino, oxetano, tianano, azetidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofeno, pirrolidino, tetrahidropirano, tetrahidropiperano, piperidino, 1,4-dioxano, 1,4-oxatiano, morfolino, 1,4-ditiano, piperazino, 1,4-azatiano, oxepano, tiepano, azepano, 1,4-dioxepano, 1,4-oxatiepano, 1,4-oxazepano, 1,4-ditiepano, 1,4-tieazepano y 1,4-diazepano. El grupo heterocicloalquilo puede estar conectado a C o conectado a N, es decir puede estar conectado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno. El heterocicloalquilo puede estar sustituido.

50 El término "heteroalqueno" incluye grupos alqueno, por ejemplo, grupos alqueno C₁-C₆₅, grupos alqueno C₁-C₁₇ o grupos alqueno C₁-C₁₀, en los que hasta veinte átomos de carbono, en una realización hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del alqueno. El grupo heteroalqueno puede estar conectado a C o conectado a un heteroátomo, es decir, puede estar conectado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_t o N. El heteroalqueno puede estar sustituido.

60

5 El término "heterocicloalquenilo" incluye grupos cicloalquenilo en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del cicloalquenilo. Los ejemplos de grupos heterocicloalquenilo incluyen 3,4-dihidro-2H-piraniolo, 5-6-dihidro-2H-piraniolo, 2H-piraniolo, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo y 1,2,5,6-tetrahidropiridinilo. El grupo heterocicloalquenilo puede conectado a C o conectado a N, es decir, puede estar conectado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno. El heterocicloalquenilo puede estar sustituido.

10 El término "heteroalquinilo" incluye grupos alquinilo, por ejemplo, grupos alquinilo C₁-C₆₅, grupos alquinilo C₁-17 o grupos alquinilo C₁-C₁₀, en los que hasta veinte átomos de carbono, en una realización hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del alquinilo. El grupo heteroalquinilo puede estar conectado a C o conectado a un heteroátomo, es decir, puede estar conectado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_t o N. El heteroalquinilo puede estar sustituido.

15 El término "heteroalquilenilo" incluye grupos alquilenilo, por ejemplo, grupos alquilenilo C₁-C₆₅, grupos alquilenilo C₁-C₁₇ o grupos alquilenilo C₁-C₁₀, en los que hasta veinte átomos de carbono, en una realización hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del alquilenilo. El heteroalquilenilo puede estar sustituido.

20 El término "heteroalquenileno" incluye grupos alquenileno, por ejemplo, grupos alquenileno C₁-C₆₅, grupos alquenileno C₁-C₁₇ o grupos alquenileno C₁-C₁₀, en los que hasta veinte átomos de carbono, en una realización hasta diez átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización, un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_t o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono del alquenileno. El heteroalquenileno puede estar sustituido.

25 El término "arilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, aromáticos, monovalentes, tales como fenilo o naftilo (p. ej. 1-naftilo o 2-naftilo). En general, los grupos arilo pueden ser grupos aromáticos de anillos fusionados monocíclicos o policíclicos. Los arilos preferidos son arilo C₆-C₁₄. El arilo puede estar sustituido.

30 Otros ejemplos de grupos arilo son derivados monovalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenileno, fenaleno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno y rubiceno.

35 El término "arilalquilo" significa alquilo sustituido con un grupo arilo, p. ej. bencilo.

40 El término "heteroarilo" incluye grupos arilo en los que uno o más átomos de carbono son reemplazados por heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S, N y NR^N, donde R^N se define a continuación (y en una realización es H o alquilo (p. ej. alquilo C₁-C₆)). El heteroarilo puede estar sustituido.

45 En general, los grupos heteroarilo pueden ser grupos heteroaromáticos de anillo fusionado monocíclicos o policíclicos (p. ej. bicíclicos). Típicamente, los grupos heteroarilo contienen 5-14 miembros en el anillo (preferiblemente 5-10 miembros) en donde 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo se seleccionan independientemente entre O, S, N y NR^N. En una realización, un grupo heteroarilo puede tener 5, 6, 9 o 10 miembros, p. ej. monocíclico de 5 miembros, monocíclico de 6 miembros, bicíclico de anillo fusionado de 9 miembros o bicíclico de anillo fusionado de 10 miembros.

50 Los grupos heteroaromáticos monocíclicos incluyen grupos heteroaromáticos que contienen anillos de 5-6 miembros en donde 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo se seleccionan independientemente entre O, S, N o NR^N.

55 En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros contienen 1 miembro del anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo -O- o un átomo -S- y, opcionalmente, 1-3 miembros del anillo (p. ej., 1 o 2 miembros del anillo) que son átomo =N- (donde el resto de los 5 miembros del anillo son átomos de carbono).

60 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros son pirrolilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, tiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo y tetrazolilo.

Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros son piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros contienen 1 o 2 miembros del anillo que son

átomos =N- (donde el resto de los 6 miembros del anillo son átomos de carbono).

Los grupos heteroaromáticos bicíclicos incluyen grupos heteroaromáticos de anillo fusionado que contienen 9-14 miembros del anillo en los que 1, 2, 3, 4 o más miembros del anillo se seleccionan independientemente entre O, S, N o NR^N.

En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 9 miembros contienen 1 miembro del anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo -O- o un átomo -S- y, opcionalmente, 1-3 miembros del anillo (p. ej. 1 o 2 miembros del anillo) que son átomos =N- (donde el resto de los 9 miembros del anillo son átomos de carbono).

Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillo fusionado, de 9 miembros son benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo, pirrolo[2,3-c]piridinilo, pirrolo-[3,2-c]piridinilo, pirrolo[3,2-b]piridinilo, imidazo[4,5-b]piridinilo, imidazo[4,5-c]piridinilo, pirazolo[4,3-d]piridinilo, pirazolo[4,3-c]piridinilo, pirazolo[3,4-c]piridinilo, pirazolo[3,4-b]piridinilo, isoindolilo, indazolilo, purinilo, indolinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, imidazo[1,5-a]piridinilo, pirazolo[1,2-a]piridinilo, pirrolo[1,2-b]piridazinilo e imidazo[1,2-c]-pirimidinilo.

En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 10 miembros contienen 1-3 miembros en el anillo que son átomos =N- (donde el resto de los 10 miembros del anillo son átomos de carbono).

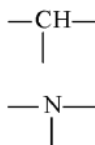
Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillo fusionado de 10 miembros son quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, 1,6-naftiridinilo, 1,7-naftiridinilo, 1,8-naftiridinilo, 1,5-naftiridinilo, 2,6-naftiridinilo, 2,7-naftiridinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[4,3-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirido[2,3-b]pirazinilo, pirido[3,4-b]pirazinilo, pirimido[5,4-d]pirimidinilo, pirazino[2,3-b]pirazinilo y pirimido[4,5-d]pirimidinilo.

El término "heteroarilalquilo" significa alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

Los ejemplos de grupos acilo incluyen alquil-C(=O)-, cicloalquil-C(=O)-, alquenil-C(=O)-, cicloalquenil-C(=O)-, heteroalquil-C(=O)-, heterocicloalquil-C(=O)-, aril-C(=O)- o heteroaril-C(=O)-, en particular, alquil-C(=O)- y aril-C(=O)-.

A menos que se indique explícitamente lo contrario, cuando las combinaciones de grupos se mencionan en la presente memoria como un radical, p. ej. arilalquilo, el último grupo mencionado contiene el átomo por el cual el radical se une al resto de la molécula.

Cuando se hace referencia a un átomo de carbono de un grupo alquilo u otro grupo que se reemplaza por O, S(O)_t o N, lo que se pretende es que:



sea reemplazado por

-CH= sea reemplazado por -N=;

=C-H sea reemplazado por =N; o

-CH₂- sea reemplazado por -O-, -S(O)_t- o -NR^N-.

A modo de aclaración, en relación con los grupos que contienen heteroátomos mencionados anteriormente (tales como heteroalquilo etc.), cuando se proporciona un número de átomos de carbono, por ejemplo heteroalquilo C₃-C₆, lo que se pretende es un grupo basado en alquilo C₃-C₆ en el que uno o más de los átomos de carbono de la cadena 3-6 se reemplaza por O, S(O)_t o N. En consecuencia, un grupo heteroalquilo C₃-C₆, por ejemplo, contendrá menos de 3-6 átomos de carbono en la cadena.

Donde se mencionó anteriormente, R^N es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, -C(O)-alquilo, -C(O)-arilo, -C(O)-heteroarilo, -S(O)_t-alquilo, -S(O)_t-arilo o -S(O)_t-heteroarilo. R^N puede ser, en particular, H, alquilo (p. ej. alquilo C₁-C₆) o cicloalquilo (p. ej. cicloalquilo C₃-C₆).

Donde se mencionó anteriormente, t es independientemente 0, 1 o 2, por ejemplo 2. Típicamente, t es 0.

Cuando un grupo tiene al menos 2 posiciones que pueden estar sustituidas, el grupo puede estar sustituido por ambos extremos de una cadena alquilenos o heteroalquilenos para formar un radical cíclico.

Los grupos opcionalmente sustituidos de los compuestos de la invención (p. ej. alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alqueno, cicloalqueno, alquino, alqueno, alqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, heteroalqueno, heterocicloalqueno, heteroalquino, heteroalqueno, heteroalqueno, arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o heteroarilheteroalquilo etc.) pueden estar sustituidos o no sustituidos, en una realización no sustituidos. Típicamente, la sustitución implica el reemplazo hipotético de un átomo de hidrógeno por un grupo sustituyente, o dos átomos de hidrógeno en el caso de la sustitución por =O.

Cuando esté sustituido, generalmente habrá de 1 a 3 sustituyentes, en una realización 1 o 2 sustituyentes, en una realización 1 sustituyente.

Los sustituyentes opcionales son independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -OH, -NH₂, -NO₂, -CN, -N⁺-(alquil C₁-C₆)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂-alquilo C₁-C₆, -SO₃H, -SO-alquilo C₁-C₆, -SO₂-alquilo C₁-C₆, -SO₃-alquilo C₁-C₆, -OC(=O)O-alquilo C₁-C₆, -C(=O)H, -C(=O)-alquilo C₁-C₆, -OC(=O)-alquilo C₁-C₆, =O, -NH-alquilo C₁-C₆, -N-(alquilo C₁-C₆)₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)-N-(alquilo C₁-C₆)₂, -N-(alquil C₁-C₆)-C(=O)-O-alquilo C₁-C₆, -N-(alquil C₁-C₆)-C(=O)-N-(alquilo C₁-C₆)₂, -OC(=O)-N-(alquilo C₁-C₆)₂, -N-(alquil C₁-C₆)-C(=O)-alquilo C₁-C₆, -C(=S)-N-(alquilo C₁-C₆)₂, -N-(alquil C₁-C₆)-C(=S)alquilo C₁-C₆, -SO₂N-(alquilo C₁-C₆)₂, -N-(alquil C₁-C₆)SO₂-alquilo C₁-C₆, -N-(alquil C₁-C₆)-C(=S)-N-(alquilo C₁-C₆)₂, -N-(alquil C₁-C₆)-SO₂N-(alquilo C₁-C₆)₂, -alquilo C₁-C₆, -heteroalquilo C₁-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, -heterocicloalquilo C₃-C₆, -alqueno C₂-C₆, -heteroalqueno C₂-C₆, -cicloalqueno C₃-C₆, -heterocicloalqueno C₃-C₆, -alquino C₂-C₆, -heteroalquino C₂-C₆, -Z^u-alquilo C₁-C₆, -Z^u-cicloalquilo C₃-C₆, -Z^u-alqueno C₂-C₆, -Z^u-cicloalqueno C₃-C₆ o -Z^u-alquino C₂-C₆, en donde Z^u es independientemente O, S, NH o N-(alquilo C₁-C₆).

En otra realización, el sustituyente o los sustituyentes opcionales son independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N⁺-(alquil C₁-C₆)₂O⁻, -CO₂H, -SO₃H, -SO-alquilo C₁-C₆, -SO₂-alquilo C₁-C₆, -C(=O)H, -C(=O)-alquilo C₁-C₆, =O, -N-(alquilo C₁-C₆)₂, -C(=O)-NH₂, -alquilo C₁-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, -heterocicloalquilo C₃-C₆, -Z^u-alquilo C₁-C₆ o -Z^u-cicloalquilo C₃-C₆, en donde Z^u se define más arriba.

En otra realización, el sustituyente o los sustituyentes opcionales son independientemente halógeno, trihalometilo, -NO₂, -CN, -CO₂H, -C(=O)-alquilo C₁-C₆, =O, -N-(alquilo C₁-C₆)₂, -C(=O)NH₂, -alquilo C₁-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, -heterocicloalquilo C₃-C₆, -Z^uC₁₋₆alquilo o -Z^u-cicloalquilo C₃-C₆, en donde Z^u se define más arriba.

En otra realización, el sustituyente o los sustituyentes opcionales son independientemente halógeno, -NO₂, -CN, -CO₂H, =O, -N-(alquilo C₁-C₆)₂, -alquilo C₁-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆ o -heterocicloalquilo C₃-C₆.

En otra realización, el sustituyente o los sustituyentes opcionales son independientemente halógeno, -OH, NH₂, NH-(alquilo C₁-C₆), -N-(alquilo C₁-C₆)₂, -alquilo C₁-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆ o -heterocicloalquilo C₃-C₆.

Como se emplean en la presente memoria, los términos "polímeros de la invención" y "polímero de fórmula I" etc. incluyen derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos y formas polimórficas, isómeros y variantes isotópicamente marcadas de los mismos.

El término "derivado farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier sal, solvato, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de **Fórmula I**. En una realización, los derivados farmacéuticamente aceptables son sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables de un compuesto de **Fórmula I**.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal preparada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen ácidos y bases inorgánicos u orgánicos.

Los compuestos de **Fórmula I** que contienen grupos alcalinos, p. ej. amino, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos. En una realización, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de **Fórmula I** incluyen, pero no se limitan a, las de ácidos inorgánicos tales como los ácidos hidrohalegenados (p. ej. ácido clorhídrico, bromhídrico y yodhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácidos fosfóricos. En una realización, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de **Fórmula I** incluyen, pero no se limitan a, las de ácidos orgánicos tales como las clases de ácidos orgánicos alifáticos, aromáticos, carboxílicos y sulfónicos, cuyos ejemplos incluyen: ácidos monocarboxílicos alifáticos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico o ácido butírico; hidroxiacidos alifáticos tales como ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico o ácido málico; ácidos dicarboxílicos tales como ácido maleico o ácido succínico; ácidos carboxílicos aromáticos tales como ácido benzoico, ácido p-clorobenzoico, ácido fenilacético, ácido difenilacético o ácido trifenilacético; ácidos hidroxílicos aromáticos tales como ácido o-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido 1-hidroxinaftaleno-2-carboxílico o ácido 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico; y ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico o ácido bencenosulfónico. Otras sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de **Fórmula I** incluyen, pero no se limitan a, las de ácido glicólico, ácido glucurónico, ácido furoico, ácido glutámico, ácido antranílico, ácido salicílico, ácido mandélico, ácido embónico (pamoico), ácido pantoténico, ácido esteárico, ácido sulfanílico, ácido algénico y ácido galacturónico. En donde el compuesto de **Fórmula I** comprende una pluralidad de grupos alcalinos, se pueden protonar múltiples centros para proporcionar

múltiples sales, p. ej. di- o tri-sales de compuestos de **Fórmula I**. Por ejemplo, una sal de ácido hidrohalegenado de un compuesto de **Fórmula I** como se describe en la presente memoria puede ser un monohidrohaleuro, dihidrohaleuro o trihidrohaleuro, etc. En una realización, las sales incluyen, pero no se limitan a, las que resultan de la adición de cualquiera de los ácidos descritos anteriormente. En una realización del compuesto de **Fórmula I**, dos grupos alcalinos forman sales de adición de ácido. En una realización adicional, los dos contraiones de sal de adición son la misma especie, p. ej. dihidrocloruro, dihidrosulfuro, etc. Típicamente, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal hidrocloreuro, tal como una sal dihidrocloreuro.

Los compuestos de **Fórmula I** que contienen ácidos, p. ej. grupos carboxilo son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con álcalis. En una realización, las sales alcalinas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de **Fórmula I** incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos (p. ej. sales de sodio, potasio, magnesio o calcio) y sales de zinc o aluminio. En una realización, las sales alcalinas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de **Fórmula I** incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con amoníaco o aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables o bases heterocíclicas tales como etanolaminas (p. ej. dietanolamina), bencilaminas, N-metil-glucamina, aminoácidos (p. ej. lisina) o piridina.

También se pueden formar hemisales de ácidos y bases, p. ej. sales hemisulfato.

Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de **Fórmula I** se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica.

Para una revisión de las sales farmacéuticamente aceptables, véase Stahl y Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Los compuestos de la invención pueden existir tanto en formas no solvatadas como solvatadas. El término "solvato" incluye complejos moleculares que comprenden un compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable tal como agua o alcoholes C₁-C₆ p. ej. etanol. El término "hidrato" significa un "solvato" donde el disolvente es agua.

Los compuestos de la invención pueden existir en estados sólidos desde formas amorfas hasta cristalinas. Todas estas formas sólidas están incluidas en la invención.

Los compuestos de la invención pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas y tautoméricas, que incluyen pero no se limitan a formas *cis* y *trans*, formas *E* y *Z*, formas *R*, *S* y *meso*, formas ceto y enol. Todas estas formas isoméricas están incluidas dentro de la invención. Las formas isoméricas pueden estar en forma isoméricamente pura o enriquecida, así como en mezclas de isómeros (p. ej. mezclas racémicas o diastereoméricas).

La invención incluye compuestos farmacéuticamente aceptables marcados isotópicamente de **Fórmula I** en donde uno o más átomos son reemplazados por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o número másico que generalmente se encuentra en la naturaleza.

Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ²H y ³H, carbono, tales como ¹¹C, ¹³C y ¹⁴C, cloro, tal como ³⁶Cl, flúor, tal como ¹⁸F, yodo, tales como ¹²³I e ¹²⁵I, nitrógeno, tales como ¹³N y ¹⁵N, oxígeno, tales como ¹⁵O, ¹⁷O y ¹⁸O, fósforo, tal como ³²P y azufre, tal como ³⁵S. Ciertos compuestos marcados isotópicamente de **Fórmula I** por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o tejidos sustrato. Los isótopos radiactivos ³H y ¹⁴C son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y de los medios de detección listos.

Sustitución por isótopos emisores de positrones, tales como ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O y ¹³N, puede ser útil en estudios de Tomografía por Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor sustrato.

Los Compuestos marcados isotópicamente de **Fórmula I** generalmente se pueden preparar mediante mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica o mediante procedimientos análogos a los descritos en la presente memoria utilizando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

Se apreciará que los polímeros, como se describe en la presente memoria, pueden estar sustituidos con cualquier número de sustituyentes o radicales funcionales. Los términos sustituidos, ya sea precedido por el término "opcionalmente" o no, y sustituyente, como se emplean en la presente memoria, se refieren a la capacidad, como aprecia un experto en esta técnica, de cambiar un grupo funcional por otro grupo funcional siempre que la valencia de todos los átomos se mantenga. Cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede ser sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en

cada posición. Los sustituyentes también pueden estar sustituidos adicionalmente (p. ej., un sustituyente del grupo arilo puede tener otro sustituyente distinto de él, tal como otro grupo arilo, que está sustituido adicionalmente con flúor en una o más posiciones).

5 El término tiohidroxilo o tiol, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grupo de la fórmula -SH.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición que comprende un agente activo y un polímero de fórmula I. La composición puede comprender nanopartículas y/o micropartículas que contienen el agente activo y el polímero. La composición puede comprender dos o más polímeros diferentes como se define en la fórmula I. Por ejemplo, la composición puede comprender polímeros de fórmula I en donde R₁ y R₂ son CysLysLysLys y polímeros de fórmula I en donde R₁ y R₂ son ambos CysHisHisHis.

El agente activo puede ser un polinucleótido, proteína o molécula pequeña. Típicamente, el agente activo es un polinucleótido. El polinucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en ADN, ARN, ARNip y miARN, preferiblemente del grupo que consiste en ARNip y miARN. En una realización, el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y ARNip.

Típicamente, un polinucleótido comprende al menos tres nucleótidos. Preferiblemente, el polinucleótido tiene 20-30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 22 nucleótidos de longitud.

El polinucleótido puede derivar de nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, inosina, xantosina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, desoxiinosina, y desoxicitidina), análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, C5-propinilcitidina, C5-propiniluridina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxosoguanosina, (6)-metilguanina y 2-tiocitidina), o mezclas de los mismos. Los nucleótidos pueden derivar de bases químicamente modificadas, bases biológicamente modificadas (p. ej. bases metiladas), bases intercaladas, azúcares no modificados o modificados (p. ej., 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa), y/o grupos fosfato no modificados o modificados (p. ej., fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamidita).

Como se emplea en la presente memoria, el término "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean naturales o creados artificialmente (p. ej., mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos o polinucleótidos. Típicamente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 g/mol.

La presente invención proporciona nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 14. A continuación se proporciona una discusión adicional de las nanopartículas de la presente invención. Se entenderá que la discusión se aplica igualmente a las micropartículas.

40 Las nanopartículas pueden comprender un polinucleótido y polímeros de fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7. Los oligopéptidos cargados positivamente interactúan con el polinucleótido cargado negativamente durante el procedimiento de formación de nanopartículas y facilitan la encapsulación del polinucleótido en las nanopartículas.

45 Las nanopartículas pueden comprender polímeros de fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga negativa neta a pH 7 y un agente activo que tiene una carga positiva neta a pH 7. Los oligopéptidos cargados negativamente interactúan con el agente activo cargado positivamente durante el procedimiento de formación de nanopartículas y facilitan la encapsulación del agente activo en las nanopartículas.

50 Las nanopartículas comprenden una mezcla de diferentes polímeros de la invención. Las nanopartículas comprenden

- (a) un polímero de acuerdo con la fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7; y
- 55 (b) un polímero de acuerdo con la fórmula I en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga negativa neta a pH 7.

Por lo tanto, la invención proporciona nanopartículas con una carga superficial neta que se puede variar modificando las proporciones de los polímeros (a) y (b) anteriores. La razón de (a) a (b) puede ser 1:99, 5:95, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 95: 5 o 99: 1 en peso.

Tales nanopartículas son adecuadas para la encapsulación tanto de fármacos como de polinucleótidos y muestran propiedades farmacológicas mejoradas.

La inclusión de una población de polímeros modificados con oligopéptidos que tienen una carga negativa neta a pH

7 facilita la encapsulación por nanoprecipitación de secuencias de ADN y ARN más cortas. Las secuencias de ADN y ARN más cortas muestran una eficacia de encapsulación más baja y/o una carga absoluta más baja que las secuencias más largas cuando se utilizan en una etapa de nanoprecipitación con PBAE conocidos en la técnica. Los autores de la presente invención han descubierto que la adición de otras especies polianiónicas, tales como los polímeros cargados negativamente descritos aquí, ayuda al ensamblaje durante el procedimiento de nanoprecipitación de las nanopartículas resultantes que contienen polímero y polinucleótido.

Esto es especialmente útil para la encapsulación de polinucleótidos cortos, tales como las secuencias de ARN y miRNA, que tienen una longitud de aproximadamente 20 a 30 pares de bases y son inestables durante la circulación en el organismo. La incorporación de polinucleótidos cortos tales como ARN y miRNA a nanopartículas ha presentado dificultades debido a su menor carga.

Los autores de la presente invención han encontrado que el uso de polímeros de acuerdo con la fórmula I o la fórmula II en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7 combinados con polímeros de acuerdo con la fórmula I o la fórmula II en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga negativa neta a pH 7, permite la carga de polinucleótidos cortos tales como ARN o miRNA en nanopartículas con alta eficacia de encapsulación y alta carga. Adicionalmente, el uso de los dos tipos de polímeros descritos anteriormente evita la degradación de los polinucleótidos cortos y permite una transfección más eficaz. Se cree que los oligonucleótidos cargados positivamente "envuelven" los polinucleótidos cargados negativamente, y los oligonucleótidos cargados negativamente "envuelven" los oligonucleótidos cargados positivamente para neutralizar el exceso de carga (denominado por los autores de la presente invención "efecto de manto").

Adicionalmente, la inclusión de polímeros modificados con oligopéptidos que tienen una carga negativa neta a pH 7 facilita el suministro de las nanopartículas a través de barreras corporales complejas, tales como la mucosa intestinal y pulmonar, ya que los cambios en la carga superficial neta pueden variar durante la interacción con esas barreras.

Las nanopartículas de la presente invención se pueden formar con alto contenido de agente activo y alta eficacia de encapsulación.

En la presente memoria, la eficacia de encapsulación del agente activo se refiere al agente activo incorporado a las nanopartículas como un porcentaje en peso del agente activo total utilizado en el método de preparación de las nanopartículas que contienen el agente activo. Por lo general, es de hasta 95% inclusive, más típicamente de 70% a 95%.

En la presente memoria, el atrapamiento de agente activo se refiere al porcentaje en peso del agente activo en las nanopartículas cargadas con agente activo. El atrapamiento del agente activo es preferiblemente de al menos 2% en peso, más preferiblemente al menos 5% en peso, más preferiblemente al menos 10% en peso y típicamente en el intervalo de 2% en peso a 20% en peso, más preferiblemente de 5% en peso a 20% en peso %, más preferiblemente de 10% en peso a 20% en peso.

Cuando la composición comprende nanopartículas, preferiblemente, las nanopartículas constituyen de aproximadamente 1% a aproximadamente 90% en peso de la composición. Más preferiblemente, las nanopartículas constituyen de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% en peso de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%. La composición puede comprender adicionalmente un vehículo. El vehículo puede ser cualquier diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, como se conoce en la técnica. El vehículo es típicamente farmacológicamente inactivo. Preferiblemente, el vehículo es un líquido polar. Los vehículos particularmente preferidos incluyen agua y soluciones acuosas fisiológicamente aceptables que contienen sales y/o tampones, por ejemplo, solución salina o solución salina tamponada con fosfato. Opcionalmente, el vehículo es un fluido biológico. Se puede eliminar un vehículo líquido mediante, por ejemplo, liofilización, evaporación o centrifugación para el almacenamiento o para proporcionar un polvo para administración pulmonar o nasal, un polvo para suspensión para perfusión o comprimidos o cápsulas para administración oral.

Los agentes activos pueden estar presentes dentro de las nanopartículas o sobre las superficies de las nanopartículas. Típicamente, las nanopartículas están presentes dentro de las nanopartículas. La interacción entre el agente o los agentes activos y la nanopartícula es típicamente no covalente, por ejemplo, enlace de hidrógeno, interacción electrostática o encapsulación física. Típicamente la interacción es electrostática

Las nanopartículas son biocompatibles y suficientemente resistentes a su entorno de uso para que una cantidad suficiente de las nanopartículas permanezca sustancialmente intacta después de la entrada en el organismo de los mamíferos para poder alcanzar la diana deseada y lograr el efecto fisiológico deseado. Los polímeros descritos en la presente memoria son biocompatibles y preferiblemente biodegradables.

En la presente memoria, el término "biocompatible" se describe como una sustancia que se puede insertar o inyectar en un sujeto vivo sin causar una respuesta adversa. Por ejemplo, no causa inflamación ni rechazo agudo por parte

del sistema inmunológico que no pueda controlarse adecuadamente. Se reconocerá que "biocompatible" es un término relativo, y se espera cierto grado de respuesta inmunitaria incluso para sustancias que son altamente compatibles con el tejido vivo. Un ensayo *in vitro* para evaluar la biocompatibilidad de una sustancia consiste en exponerla a las células; las sustancias biocompatibles no suelen producir una muerte celular significativa (por ejemplo, >20%) a concentraciones moderadas (por ejemplo, 29 $\mu\text{g}/10^4$ células).

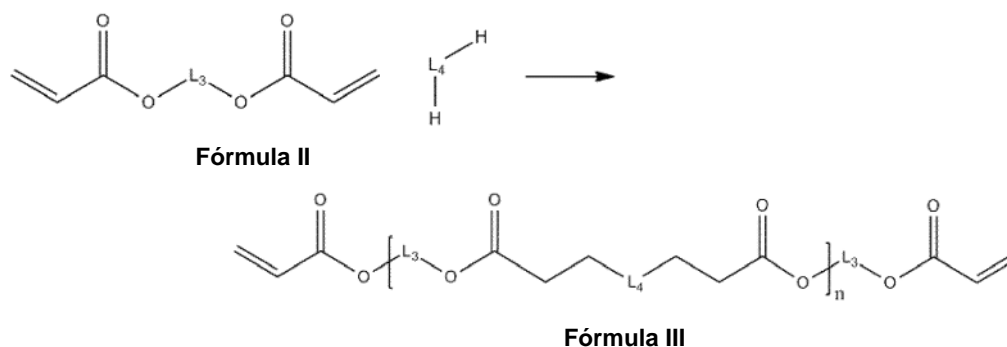
En la presente memoria, el término "biodegradable" describe un polímero que se degrada en un entorno fisiológico para formar monómeros y/u otros radicales no poliméricos que pueden ser reutilizados por las células o desechados sin un efecto tóxico significativo. La degradación puede ser biológica, por ejemplo, por actividad enzimática o maquinaria celular, o puede ser química, típicamente un procedimiento químico que tiene lugar en condiciones fisiológicas. La degradación de un polímero puede ocurrir a velocidades variables, con una semi-vida del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero o copolímero utilizado. Los componentes preferiblemente no inducen inflamación u otros efectos adversos *in vivo*. En ciertas realizaciones preferidas, las reacciones químicas en las que se basa para la descomposición de los compuestos biodegradables no están catalizadas.

En la presente memoria, el término 'nanopartículas' se refiere a una partícula sólida con un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm. En la presente memoria, el término 'micropartículas' se refiere a una partícula sólida con un diámetro de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm . El diámetro medio de las nanopartículas de la presente invención se puede determinar por métodos conocidos en la técnica, preferiblemente por dispersión dinámica de luz. En particular, la invención se refiere a nanopartículas que son partículas sólidas con un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm cuando se analizan mediante dispersión dinámica de luz a un ángulo de dispersión de 90° y a una temperatura de 25°C, utilizando una muestra diluida adecuadamente con agua filtrada y un aparato adecuado tal como los aparatos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido) de acuerdo con el método de ensayo convencional ISO 22412: 2008 (método de acumuladores% A.1.3.2). Donde se dice que una partícula tiene un diámetro de X nm, generalmente habrá una distribución de partículas de aproximadamente esta media, pero al menos 50% en número (p. ej., >60%, >70%, >80%, >90% o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo $X \pm 20\%$.

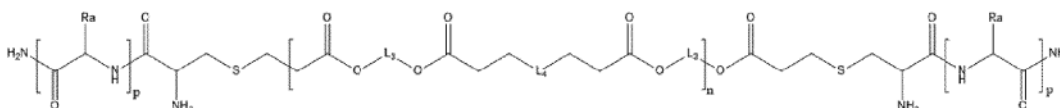
Preferiblemente, el diámetro de la nanopartícula es de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 nm, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 nm, más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nm, más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm. Alternativamente, el diámetro de la nanopartícula es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nm. En una realización, las nanopartículas muestran un grado de aglomeración de menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, preferiblemente menos de 1%, y preferiblemente las nanopartículas están sustancialmente no aglomeradas, según lo determinado por microscopía electrónica de transmisión.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para la encapsulación de un agente en una matriz de polímero de fórmula I o fórmula II para formar nanopartículas, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar un agente; proporcionar el polímero; y poner en contacto el agente y el polímero en condiciones adecuadas para formar nanopartículas. En particular, el agente y el polímero se pueden mezclar en solución a concentraciones apropiadas para obtener la proporción deseada, mezclar vigorosamente y a continuación incubar en un horno a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 30 minutos.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para sintetizar un polímero de fórmula I que comprende las etapas de hacer reaccionar un compuesto de **Fórmula II** en donde L_3 se define como antes, con una amina primaria de fórmula L_4H_2 , en donde L_4 se define como antes, para producir un polímero de Fórmula II como se muestra en el Esquema 2.



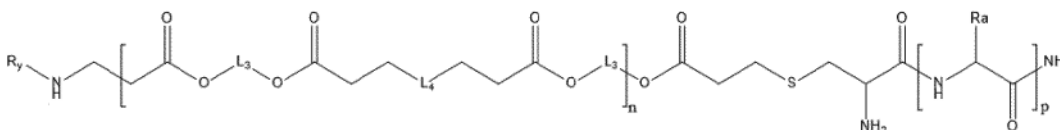
El compuesto de **Fórmula III** reacciona adicionalmente con compuestos de **Fórmula IV** para formar un compuesto de Fórmula V:



Fórmula V,

en donde p y R_a independientemente en cada aparición se seleccionan de las listas definidas anteriormente. En algunos casos, cada aparición de p es la misma y los grupos R_a se seleccionan de tal manera que la secuencia de grupos R_a que comienzan desde el enlace de azufre son los mismos en cada extremo del compuesto, es decir, p y R_a se seleccionan de manera que el polímero tenga una simetría doble respecto a L_4 .

En una alternativa a la etapa anterior, el compuesto de **Fórmula III** se hace reaccionar adicionalmente con compuestos de fórmula H_2NR_y , en donde R_y se define como antes, y los compuestos de Fórmula IV y la mezcla resultante se separan para obtener un compuesto de Fórmula VI:



Fórmula VI,

en donde R_a se selecciona independientemente en cada aparición de las listas definidas anteriormente y p se define como antes.

Se reconocerá que otros métodos para anclar un oligopéptido al compuesto de **Fórmula III** estarían disponible para el experto en la técnica, que estaría al tanto de los nucleófilos apropiados para la reacción en los grupos acrilato terminales de **Fórmula III**

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de los complejos de polímero-ADN preparados utilizando diferentes PBAE con extremos modificados con oligopéptidos y plásmido pGFP a una razón 50:1 (p/p).

La Figura 2 muestra el análisis de electroforesis en gel de agarosa de PBAE con extremos modificados con oligopéptidos y polímeros de referencia complejados con ADN.

La Figura 3 muestra la capacidad tamponadora de los PBAE con extremos modificados con oligopéptidos y los polímeros de referencia.

La Figura 4 muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en (a) cos-7, (b) hnDf y (c) células HaCaT transfectadas con diferentes PBAE con extremos modificados con oligopéptidos y un polímero de referencia.

La Figura 5 muestra la viabilidad de las células cos-7 transfectadas con diferentes PBAE con extremos modificados con oligopéptidos.

La Figura 6 muestra el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de los complejos de polímero-ARNip preparados utilizando diferentes PBAE con extremos modificados con oligopéptidos y ARNip específico de GFP a una razón 200:1 (p/p).

La Figura 7 muestra el análisis de citometría de flujo del silenciamiento de la expresión de GFP en células MDA-MB-231/GFP transfectadas con ARNip específico de GFP utilizando diferentes PBAE con extremos modificados con oligopéptidos.

La Figura 8 muestra el grado de encapsulación de insulina bovina utilizando ácido glutámico y PBAE con extremos modificados con ácido glutámico y lisina a una razón final de polímero:proteína de 200:1 (p/p).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Se apreciará que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no se pretende que limiten la invención como se describe anteriormente. Se puede hacer una modificación de los detalles sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales

Los reactivos y disolventes se obtuvieron de Sigma-Aldrich y Panreac y se utilizaron como se recibieron a menos que se indique lo contrario. El plásmido pmaxGFP (3486 pb) se obtuvo de Amaxa. Se obtuvieron líneas celulares de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en DMEM completo, que contenía

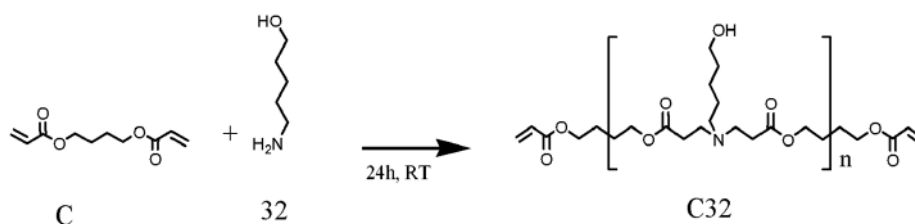
suero bovino fetal al 10%, penicilina de 100 unidades/mL, estreptomycin de 100 ug/mL, MEM con Aminoácidos No Esenciales (NEAA) 0,1 mM, L-glutamina 2 mM obtenida de Gibco.

Ejemplo 1: Síntesis de polímeros PBAE

Se sintetizaron poli(β -aminoésteres) siguiendo un procedimiento de dos etapas, descrito en la bibliografía (p. ej., en Montserrat, N. et al. J. Biol. Chem 286, 12417-12428 (2011)). Primero, se sintetizó un polímero terminado en acrilato por reacción de adición de aminas primarias con diacrilatos (a una razón molar 1:1,2 de amina:diacrilato). Finalmente, se obtuvieron PBAE mediante modificación de protección terminal del polímero terminado en acrilato resultante con diferentes tipos de radicales que contenían amina y tiol. Las estructuras sintetizadas fueron confirmadas por Análisis de RMN- H^1 y FT-IR. Los espectros de RMN se registraron en un Varian de 400 MHz (Varian NMR Instruments, Claredon Hills, IL) y se utilizó metanol- d_4 como disolvente. Los espectros IR se obtuvieron utilizando un Nicolet Magna 560 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con un divisor de haz KBr, empleando metanol como disolvente en una película evaporada. La determinación del peso molecular se realizó en un sistema de HPLC Hewlett-Packard serie 1050 equipado con dos columnas GPC Ultrastaygel, 10^3 y 10^4 Å (5 μ m mixtos, 300 mm x 19 mm, Waters Millipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.) y THF como fase móvil. El peso molecular se calculó en comparación con los tiempos de retención de los patrones de poliestireno.

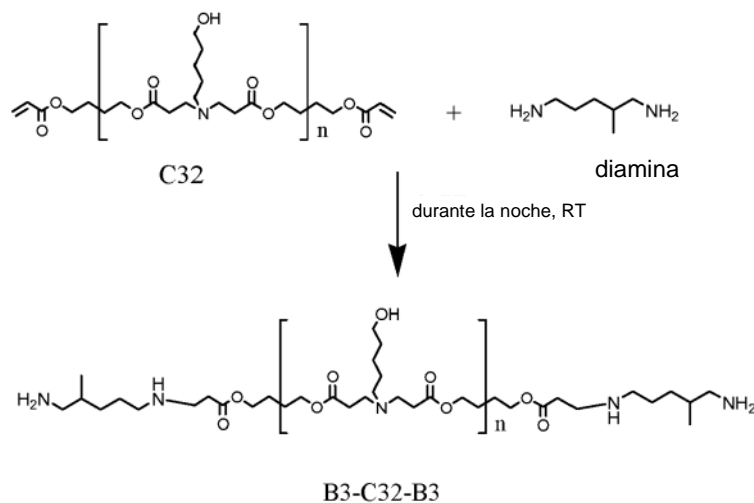
Ejemplo 2 Síntesis de intermediario terminado en acrilato

Se mezclaron 1,4-diacrilato de butanodiol (8,96 g, $4,07 \times 10^{-2}$ moles) y 5-amino-1-pentanol (3,5 g, $3,39 \times 10^{-2}$ moles) en un vial. La mezcla se agitó a 90°C durante 24 h, y a continuación se enfrió a temperatura ambiente para formar un sólido viscoso de color ligeramente amarillo, el intermedio terminado en acrilato (designado C32). El C32 intermedio se almacenó a 4°C antes de utilizarlo en las etapas posteriores.



Ejemplo 3 (comparativo): Síntesis de PBAE con extremos modificados con aminas primarias

Los PBAE con extremos modificados con aminas primarias se prepararon como definen Zugates, G.T. et al. Bioconjugate Chem. 18, 1887-1896 (2007). Una solución de intermedio C32 (1 g, 0,5 mmoles) en THF (2 ml) se mezcló con una solución de 1,5-diamino-2-metil-pentano (0,24 g, 0,271 ml, 2 mmoles) en THF (8 ml). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, después se precipitó en éter dietílico (100 ml) y finalmente se secó a vacío.



Ejemplo 4 (comparativo): Síntesis adicional de PBAE modificados por el extremo con aminas primarias

El poli(β -aminoéster) con el extremo modificado con diamina, B3, se sintetizó siguiendo un procedimiento descrito en otra parte (Zugates, G.T. et al. Bioconj. Chem 18 1887-1896 (2007), Yang, F. et al., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 107

3317-3322 (2010), Sunshine, J.C. Biomacromolecules 12 3592-3600 (2011)). En resumen, se polimerizaron 5-amino-1-pentanol (3,44 g, 33 mmoles) y diacrilato de 1,4-butanodiol (7,93 g, 40 mmoles) bajo agitación magnética a 90°C durante 24 horas. El polímero C32 terminado en acrilato resultante (1 g, 0,4 mmoles) y 2-metil-1,5-pentanodiamina (0,23 g, 0,27 ml, 2 mmoles) se disolvieron en tetrahidrofurano y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. El polímero B3 con los extremos modificados con diamina resultante se aisló por precipitación en éter dietílico y se secó a vacío.

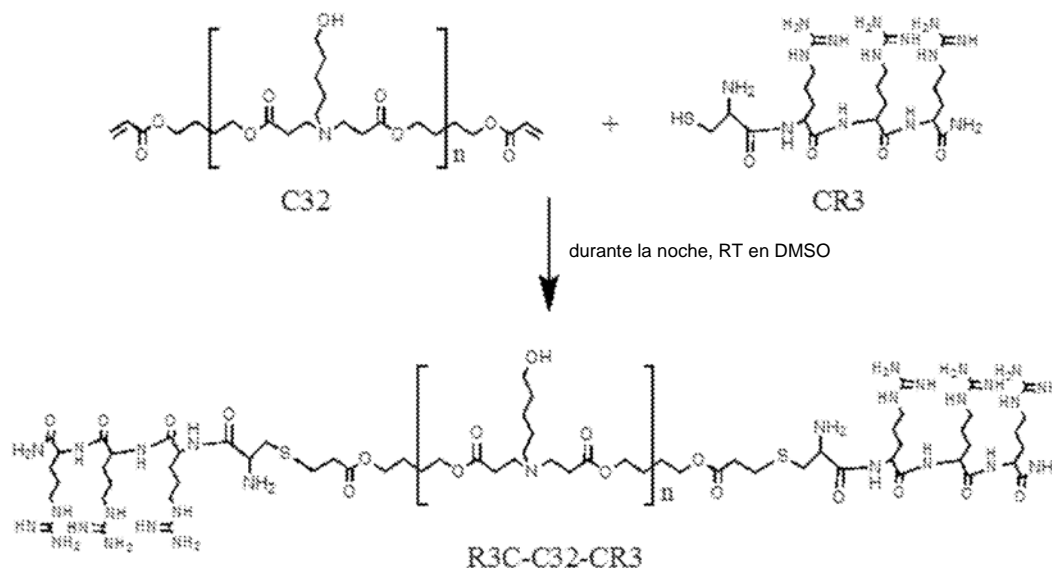
IR (película evaporada): $\nu = 1055, 1089, 1125, 1196$ (C-O), $1257, 1463, 1733$ (C = O), $2079, 2191, 2253, 2861, 2936, 3398$ (N-H, O-H) cm^{-1}

RMN- ^1H (400 MHz, CD_3OD , TMS) (ppm): $\delta = 4,11$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), $3,72$ (t), $3,55$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), $2,87$ (t, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$), $2,77$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$), $2,60\text{-}2,51$ (ancho, $\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-NH-}$), $2,46$ (ancho, $\text{>N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-OH}$, $\text{>N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O}$), $1,87$ (ancho), $1,73$ (ancho), $1,60\text{-}1,41$ (ancho, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), $1,35$ (ancho, $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$), $0,94$ (d, $\text{CH}_3\text{-CH}$ de diamina).

Ejemplo 5: Síntesis de PBAE con extremos modificados con oligopéptidos

En general, los PBAE modificados con oligopéptidos se obtuvieron de la siguiente manera: polímero C32 o C32SS terminado en acrilato y oligopéptido terminado en amina o tiol (por ejemplo, HS-Cys-Arg-Arg-Arg (CR3), H₂N-Arg-Arg-Arg (R3) o HS-Cys-Glu-Glu-Glu (CE3) - otros oligopéptidos se indican mediante abreviaturas similares utilizando el código convencional de una letra) se mezclaron a una razón molar 1:2 en DMSO. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y el polímero resultante se obtuvo por precipitación en éter dietílico:acetona (3:1).

(a) El siguiente procedimiento sintético para obtener PBAE con extremos modificados con tri-arginina se muestra como un ejemplo: se preparó el intermedio C32 como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Se mezcló una solución de intermedio C32 (0,15 g, 0,075 mmoles) en DMSO (2 ml) con la solución correspondiente de oligopéptido (Cys-Arg-Arg-Arg (CR3); 0,11 g, 0,15 mmoles) en DMSO (1 mL) a una razón molar apropiada, 1:2 respectivamente. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, después se precipitó en éter dietílico/acetona (3:1).



IR (película evaporada): $\nu = 721, 801, 834, 951, 1029, 1133$ (CO), $1201, 1421, 1466, 1542, 1672$ (C = O, de péptido amida), 1731 (C = O, de éster), $2858, 2941, 3182, 3343$ (NH, OH) cm^{-1} **RMN- ^1H** (400 MHz, CD_3OD , TMS) (ppm): $\delta = 4,41\text{-}4,33$ (ancho, $\text{NH}_2\text{-C(=O)-CH-NH-C(=O)-CH-NH-C(=O)-CH-NH-C(=O)-CH-NH-C(=O)-CH-NH}_2$), $4,11$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), $3,55$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), $3,22$ (ancho, $\text{NH}_2\text{-C(=NH)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{OH-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{-N-}$), $3,04$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$), $2,82$ (dd, $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2$), $2,48$ (ancho, $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O}$), $1,90$ (m, $\text{NH}_2\text{-C(=NH)-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-CH-}$), $1,73$ (ancho, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), $1,69$ (m, $\text{NH}_2\text{-C(=NH)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), $1,56$ (ancho, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), $1,39$ (ancho, $\text{-N-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$).

(b) Los oligopéptidos modificados con tri-lisina (K3C-C32-CK3) se prepararon de acuerdo con el mismo protocolo y se caracterizaron de la siguiente manera:

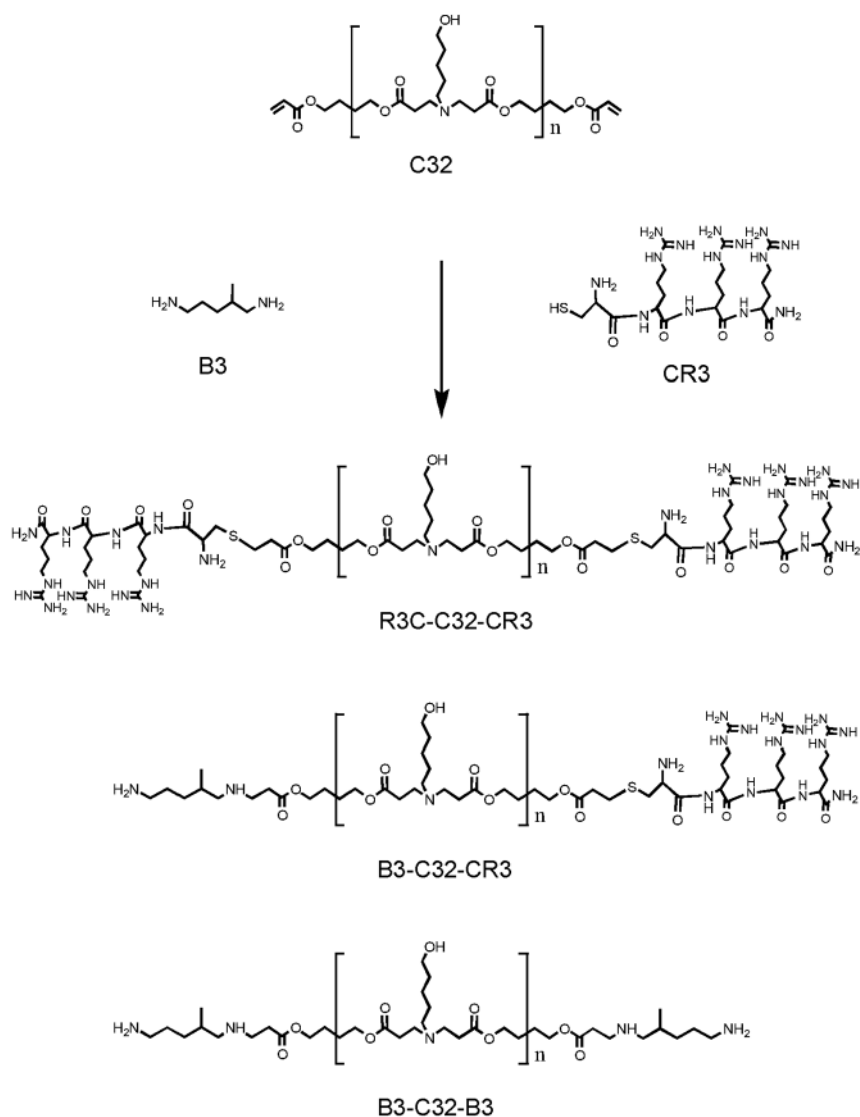
IR (película evaporada): $\nu = 721, 799, 834, 1040, 1132, 1179$ (CO), $1201, 1397, 1459, 1541, 1675$ (C = O, de péptido amida), 1732 (C = O, de éster), $2861, 2940, 3348$ (NH, OH) cm^{-1} **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CD_3OD , TMS) (ppm): $\delta = 4,38\text{-}4,29$ (ancho, $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH-}$), $4,13$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), $3,73$ (ancho, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-S-}$), $3,55$ (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), $2,94$ (ancho, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH-}$), $2,81$ (dd, $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2$), $2,57$ (ancho, $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O}$), $1,85$ (m, $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{-CH-}$), $1,74$ (ancho, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), $1,68$ (m, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH-}$), $1,54$ (ancho, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), $1,37$ (ancho, $\text{-N-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$).

(c) Los oligopéptidos modificados con trihistidina (H3C-C32-CH3) se prepararon de acuerdo con el mismo protocolo y se caracterizaron de la siguiente manera: **IR** (película evaporada): $\nu = 720, 799, 832, 1040, 1132, 1201, 1335, 1403, 1467, 1539, 1674$ (C = O, de péptido amida), 1731 (C = O, de éster), $2865, 2941, 3336$ (NH, OH) cm^{-1}

RMN- ^1H (400 MHz, CD_3OD , TMS) (ppm): $\delta = 8,0-7,0$ (ancho -N(=CH)-NH-C(=CH)-) $4,61-4,36$ (ancho, -CH₂-CH-), $4,16$ (t, CH₂-CH₂-O-), $3,55$ (t, CH₂-CH₂-OH), $3,18$ (t, CH₂-CH₂-N-), $3,06$ (dd, -CH₂-CH-), $2,88$ (ancho, OH-(CH₂)₄-CH₂-N-), $2,82$ (dd, -CH₂-S-CH₂-), $2,72$ (ancho, -N-CH₂-CH₂-C(=O)-O), $1,75$ (ancho, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O), $1,65$ (m, NH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₂-CH-), $1,58$ (ancho, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH), $1,40$ (ancho, -N-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-OH).

Ejemplo 6 Síntesis de PBAE con modificaciones en los extremos asimétricas

En general, se obtuvieron PBAE modificados con oligopéptidos asimétricos de la siguiente manera: el polímero terminado en acrilato C32 (o C32SS) y el oligopéptido terminado en amina o tiol (por ejemplo, CR3, R3 o CE3) se mezclaron a una razón molar de 1: 1 en DMSO. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió una cantidad equimolar de un segundo oligopéptido terminado en amina o tiol, o de una amina primaria, y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los polímeros PBAE asimétricos resultantes se obtuvieron por precipitación en éter dietílico/acetona (3:1). El siguiente procedimiento sintético para obtener PBAE B3-C32-CR3 con modificación en los extremos asimétrica se muestra a modo de ejemplo: se mezcló una solución de intermedio C32 (0,15 g, 0,075 mmoles) en DMSO (2 mL) con la solución correspondiente de oligopéptido Cys- Arg-Arg-Arg (CR3; 0,055 g, 0,075 mmoles) en DMSO (1 ml) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 2-metil-1,5-pentanodiamina (0,017 g, 0,02 ml, 0,15 mmoles) a la mezcla durante 4 h a temperatura ambiente en DMSO. Se obtuvo una mezcla de polímeros con extremos modificados asimétricos B3-C32-CR3, B3-C32-B3 y R3C-C32-CR3 por precipitación durante la noche en éter dietílico/acetona (3:1). La mezcla se puede utilizar sin purificación adicional o el polímero con extremos modificado asimétrico B3-C32-CR3 se puede separar de la mezcla por métodos convencionales.



Ejemplo 1: Biblioteca de compuestos

- 5 Se sintetizó una biblioteca de diferentes PBAE extremos modificados con oligopéptidos mediante la adición de aminas primarias a los diacrilatos seguido de la modificación de los extremos. De acuerdo con la Fórmula I, se sintetizaron los PBAE modificados en el extremo con oligopéptidos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Biblioteca de oligopéptidos modificados con PBAE

Polímero	L ₃	L ₄	HL ₁ -R ₁	HL ₂ -R ₂
B3 (referencia)	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	NH ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂
R3-C32-R3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-Arg-Arg-Arg	H ₂ N-Arg-Arg-Arg
K3-C32-K3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	NH ₂ -Lys-Lys-Lys	H ₂ N-Lys-Lys-Lys
H3-C32-H3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	NH ₂ -His-His-His	NH ₂ -His-His-His
R3C-C32-CR3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-Arg-Arg-Arg
K3C-C32-CK3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Lys-Lys-Lys	HS-Cys-Lys-Lys-Lys
H3C-C32-CH3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-His-His-His	HS-Cys-His-His-His
B3-C32-R3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	H ₂ N-Arg-Arg-Arg
B3-C32-CR3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-Arg-Arg-Arg
B3-C32-CK3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-Lys-Lys-Lys

Polímero	L ₃	L ₄	HL ₁ -R ₁	HL ₂ -R ₂
B3-C32-CH3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-His-His-His
R3C-C32-CK3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-Lys-Lys-Lys
R3C-C32-CH3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-His-His-His
K3C-C32-CH3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Lys-Lys-Lys	HS-Cys-His-His-His
R3C-C32SS-CR3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-Arg-Arg-Arg
K3C-C32SS-CK3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Lys-Lys-Lys	HS-Cys-Lys-Lys-Lys
H3C-C32SS-CH3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-His-His-His	HS-Cys-His-His-His
B3-C32SS-CR3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-Arg-Arg-Arg
B3-C32SS-CK3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-Lys-Lys-Lys
B3-C32SS-CH3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	H ₂ N-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -NH ₂	HS-Cys-His-His-His
R3C-C32SS-CK3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-Lys-Lys-Lys
R3C-C32SS-CH3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Arg-Arg-Arg	HS-Cys-His-His-His
K3C-C32SS-CH3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Lys-Lys-Lys	HS-Cys-His-His-His
D3C-C32-CD3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Asp-Asp-Asp	HS-Cys-Asp-Asp-Asp
E3C-C32-CE3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Glu-Glu-Glu	HS-Cys-Glu-Glu-Glu
D3C-C32-CE3	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Asp-Asp-Asp	HS-Cys-Glu-Glu-Glu
E3C-C32SS-CD3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Asp-Asp-Asp	HS-Cys-Asp-Asp-Asp
E3C-C32SS-CE3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Glu-Glu-Glu	HS-Cys-Glu-Glu-Glu
D3C-C32SS-CE3	-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -	>N-(CH ₂) ₅ -OH	HS-Cys-Asp-Asp-Asp	HS-Cys-Glu-Glu-Glu

Ejemplo 8: Formación y caracterización de complejos de polímero-ADN

5 Se prepararon soluciones de partida de todos los polímeros en DMSO (100 mg/ml). Estas soluciones de polímero se diluyeron (tampón acetato 25 mM, pH 5,0) a la concentración apropiada para obtener la proporción deseada de polímero-ADN (p/p). A continuación, se añadieron 100 µl de polímero diluido a 100 µl de ADN plasmídico (60 µg/mL en tampón acetato 25 mM, pH 5,0), se mezclaron con agitación vorticial vigorosamente durante unos segundos y después se incubaron en el horno a 37°C durante 30 minutos. Las nanopartículas resultantes se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato para la caracterización de nanopartículas. Los complejos de ADN-polímero se caracterizaron en términos de tamaño y potencial zeta utilizando dispersión de luz dinámica (Zetasizer nano zs90, Malvern Instruments). Los resultados se muestran en la figura 1.

15 Las nanopartículas también se caracterizaron por electroforesis en gel de agarosa. Para evaluar el retraso del plásmido, se añadieron complejos de ADN-PBAE que contenían 0,48 µg de pGFP a diferentes razones p/p a pocillos de gel de agarosa (0,8%, que contenía 1 µg/mL de bromuro de etidio). Las muestras se procesaron a 60 V durante 45 minutos (Apelex PS 305, Francia) para resolver el retraso del plásmido y se visualizaron mediante iluminación UV. Los resultados se muestran en la figura 2.

20 Ejemplo 9: Efecto de esponja de protones

El efecto de esponja de protones es un fenómeno que se ha demostrado que facilita el escape endosómico y está mediado por polímeros con alta capacidad tamponadora, lo que da como resultado una mayor eficacia de transfección (Varkouhi, A.K. et al., J. Control. Rel. 151 220-228 (2011)). En general, los polímeros que tienen aminas terciarias en su estructura muestran un efecto tamponador en el intervalo de pH endosómico entre 5,0 y 7,5,

lo que provoca un aumento en la presión osmótica que da como resultado la desorganización del endosoma. Behr, J. *Chimia* 2 34-36 (1997)). De acuerdo con el efecto de la esponja de protones, la capacidad tamponadora de los poli(β -amino ésteres) recién sintetizados se determinó mediante la titulación con ácido de las soluciones de polímero (figura 2).

La capacidad tamponadora de los polímeros se determinó mediante titulación ácido-base. Brevemente, los polímeros se disolvieron a una concentración final de 1 mg/mL en una solución acuosa de cloruro de sodio (150 mM). La solución de polímero resultante se ajustó a pH 10 con hidróxido de sodio. La curva de titulación se determinó mediante la adición gradual de alícuotas de 10 μ L de ácido clorhídrico (0,1 M). El pH se midió después de cada adición con un medidor de pH (Crison Basic 20+, Crison Instruments) hasta que se alcanzó el pH 2. Una solución que no contenía polímero se tituló como control. Los resultados se muestran en la figura 3.

Primero, se determinó el efecto tamponador del poli(β -aminoéster) B3, que mostraba una capacidad tamponadora adecuada hasta pH 5,8. La mayor capacidad tamponadora se observó con el poli(β -aminoéster) terminado con histidina, que demostró una capacidad tamponadora en el intervalo de pH entre 7,5 y 5,3. Los poli(β -amino ésteres) modificados con lisina presentaron una capacidad tamponadora adecuada hasta pH 5,9. Por el contrario, los poli(β -amino ésteres) protegidos terminalmente con oligopéptidos de arginina solo mostraron una capacidad tamponadora limitada en el intervalo entre 7,4 y 6,4. Como todos los polímeros provienen del mismo prepolímero C32 terminado en acrilato, la capacidad tamponadora adicional observada es el resultado de las terminaciones ricas en amina.

Ejemplo 10: Eficacia de transfección

La eficacia de transfección de los polímeros de la presente invención y los polímeros conocidos se comparó evaluando la eficacia de suministro de un plásmido que codifica la proteína fluorescente verde (pGFP) a las células.

Transfección celular con plásmido pGFP: La transfección celular se realizó utilizando el plásmido pGFP en células HaCaT, hnDf, cos-7, A549 y HeLa. Estas líneas celulares se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvieron en DMEM completo, que contenía suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycinina 100 μ g/ml, MEM con aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo y se incubaron durante la noche a aproximadamente 80-90% de confluencia antes de realizar los experimentos de transfección. Los complejos de polímero-ADN se prepararon como se ha descrito anteriormente utilizando el plásmido pGFP a una razón de polímero:plásmido de 50:1. Los poliplejos se diluyeron en medio sin suero y se añadieron a las células a una concentración final de plásmido de 0,6 μ g de pGFP/pocillo. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y se añadió DMEM completo. Después de 48 h, las células fueron cosechadas y analizadas para determinar la expresión de GFP por citometría de flujo. La expresión de GFP se comparó con un control negativo (células no tratadas) y GeneJuice® (Merck KGaA, Alemania) y B3-C32-B3 como control positivo. Los resultados se muestran en la Figura 4a-c, en donde R/H, K/H y R/K representan mezclas 1:1 (p/p) de PBAE R3C-C32-CR3, K3C-C32-CK3 o H3C-C32-CH3.

Ejemplo 11: Citotoxicidad

Se utilizó la prueba MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, EE.UU.) para evaluar la viabilidad de las células cos-7 transfectadas con los polímeros descritos en la presente solicitud. La viabilidad celular se evaluó 48 h después de la transfección utilizando el ensayo MTS según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se transfectaron con pGFP por un método similar al del ejemplo 5. A las 48 h de la transfección, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y se añadió medio completo con un suplemento de MTS (20% v/v). Las células se incubaron a 37°C y se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplacas. La viabilidad celular se expresó como porcentaje relativo en comparación con las células no tratadas. Los resultados se muestran en la Figura 5, en la que R/H, K/H y R/K representan mezclas 1:1 (p/p) de PBAE R3C-C32-CR3, K3C-C32-CK3 o H3C-C32-CH3.

Ejemplo 12: Ensayo de silenciamiento génico

La eficacia de suministro de ARNip de los polímeros de la presente invención se evaluó utilizando ARNip específicos de GFP en la línea celular estable informadora GFP.

Preparación de complejos de polímero-ARNip: Se prepararon soluciones de partida de polímeros en DMSO (100 mg/ml). Estas soluciones de polímeros se diluyeron (tampón acetato 25 mM, pH 5,0) a la concentración apropiada para obtener la razón deseada de polímero-ARNip (p/p). A continuación, se añadieron 100 μ l de polímero adecuadamente diluido a 100 μ l de ARNip específico de GFP (10 μ g/mL en tampón acetato 25 mM pH 5,0; ThermoScientific Dharmacon GFP Duplex I), se mezclaron mediante agitación vorticial vigorosamente durante unos

segundos y después se incubaron a 37°C durante 30 min. Los complejos resultantes se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato para la caracterización de las nanopartículas. Los complejos de ARNip-polímero se caracterizaron en términos de tamaño y potencial zeta utilizando dispersión de luz dinámica (Zetasizer nano zs90, Malvern Instruments). Los resultados se muestran en la Figura 6, en la que K/H y K/R representan mezclas 60:40 (p/p) de PBAE R3C-C32-CR3, K3C-C32-CK3 o H3C-C32-CH3. K/E y K/D representan mezclas 70:30 (p/p) de PBAE K3C-C32-CK3 y D3C-C32-CD3 o E3C-C32-CE3.

Transfección celular con ARNip específico de GFP: La transfección celular se llevó a cabo utilizando ARNip específico de GFP en células MDA-MB-231/GFP (Cell Biolabs Inc.). Las células se mantuvieron en DMEM completo, que contenía suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

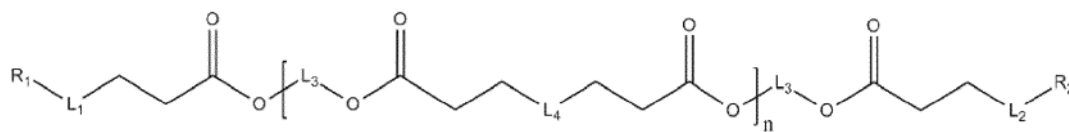
Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo y se incubaron durante la noche a aproximadamente 80-90% de confluencia antes de realizar los experimentos de transfección. Los complejos de polímero-ARNip se prepararon como se ha descrito anteriormente utilizando ARNip específico de GFP a una razón de polímero:ARNip de 200:1. Los complejos se diluyeron en medio sin suero y se añadieron a las células a una concentración final de plásmido de ARNip50 nM/pocillo. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y se añadió DMEM completo. Después de 48 h, las células se cosecharon y se analizaron para determinar el silenciamiento de GFP por citometría de flujo. El silenciamiento en la expresión de GFP se comparó con un control negativo (células no tratadas) e INTERFERinTM (PolyPlus TransfectionTM) y B3 como controles positivos. Los resultados se muestran en la Figura 7, en la que R/H, K/H y R/K representan mezclas 1:1 (p/p) de PBAE R3C-C32-CR3, K3C-C32-CK3 o H3C-C32-CH3, y SS(R/H), SS(K/H) y SS(R/K) representan mezclas 1:1 (p/p) de PBAE R3C-C32SS-CR3, K3C-C32SS-CK3 o H3C-C32SS-CH3.

Ejemplo 13: Encapsulación de insulina bovina utilizando PBAE con extremos modificados con ácido glutámico y lisina

La eficacia de encapsulación de los polímeros de la presente invención se evaluó utilizando insulina bovina (Sigma Aldrich). Brevemente, se añadieron PBAE E3C-C32-CE3 con extremos modificados con ácido glutámico (16,7 µL a 60 mg/mL) a una solución de insulina bovina (1 mL a 0,01 mg/mL en tampón HEPES, 100 mM y pH 7,2) seguido de PBAE K3C-C32-CK3 con extremos modificados con lisina (10 µL a 100 mg/mL) para lograr una razón final de polímero:proteína de 200:1. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las nanopartículas resultantes se centrifugaron utilizando un dispositivo Centricon (corte a 10 KDa, Merck Millipore) para separar las nanopartículas que contienen insulina de la insulina no encapsulada. El grado de encapsulación se calculó determinando la insulina no encapsulada utilizando el ensayo bicinonínico (reactivo de ensayo de proteína BCA, ThermoScientific) y comparándolo con la solución original de insulina. Los resultados se muestran en la Figura 8, en la que NP1 y NP2 son duplicados independientes.

REIVINDICACIONES

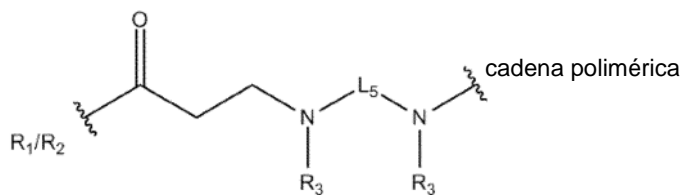
1. Un polímero de fórmula I:



Fórmula I

en donde

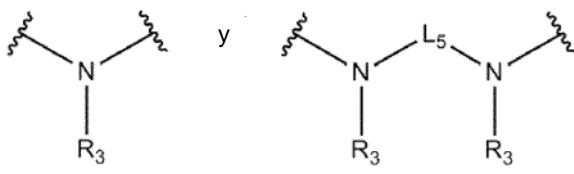
cada uno de L₁ y L₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en:



O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

L₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquileno, alquenileno, heteroalquileno, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

L₄ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



L₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquileno, alquenileno, heteroalquileno, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre un oligopéptido y R_y;

en donde al menos uno de R₁ y R₂ es un oligopéptido;

en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7; o en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende una mezcla de aminoácidos naturales que están cargados negativamente a pH 7 y aminoácidos naturales que están cargados positivamente a pH 7;

y en donde R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; y n es un número entero de 5 a 10.000;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

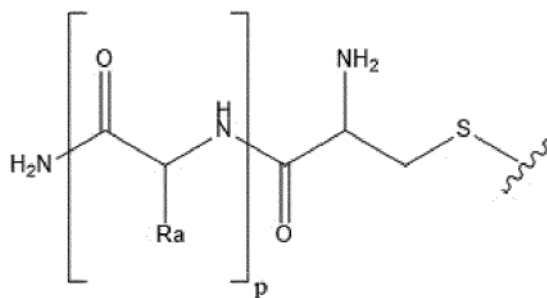
2. El polímero de la reivindicación 1, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lisina y arginina; o en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende una mezcla de aminoácidos naturales que están cargados negativamente a pH 7 y aminoácidos naturales que están cargados positivamente a pH 7.

3. El polímero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende de 3 a 20 residuos de aminoácidos.

4. El polímero de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7.

5. El polímero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido comprende residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina.

6. El polímero de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligopéptido o cada oligopéptido es un compuesto de Fórmula VII:



Fórmula VII

en donde p es un número entero de 2 a 19 y en donde Ra se selecciona en cada aparición del grupo que consiste en H₂NC(=NH)-NH(CH₂)₃-, H₂N(CH₂)₄- o (1*H*-imidazol-4-il)-CH₂-.

7. El polímero de cualquier reivindicación anterior, en donde R₁ y R₂ son ambos oligopéptidos.

8. El polímero de la reivindicación 7, en donde R₁ y R₂ son diferentes oligopéptidos.

9. El polímero de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde uno de R₁ y R₂ es un oligopéptido y uno de R₁ y R₂ es R_y.

10. El polímero de cualquier reivindicación anterior, en donde n es de 1 a 20.

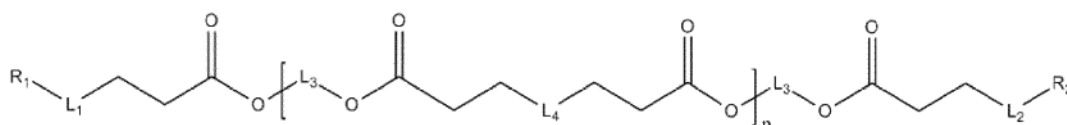
11. El polímero de cualquier reivindicación anterior, en donde R_y se selecciona de un grupo que consiste en hidrógeno, -(CH₂)_mNH₂, -(CH₂)_mNHMe, -(CH₂)_mOH, -(CH₂)_mCH₃, -(CH₂)₂(OCH₂CH₂)_mNH₂, -(CH₂)₂(OCH₂CH₂)_mOH o -(CH₂)₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ en donde m es un número entero de 1 a 20.

12. El polímero de cualquier reivindicación anterior, en donde cada L₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -alquileo C₁-C₁₀- (S-S)_q-alquileo C₁-C₁₀, en donde q es 0 o 1.

13. El polímero de cualquier reivindicación anterior, en donde que cada R₃ se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, hidroxialquilo C₁-C₆, hidroxilo, alcoxi C₁-C₆, halógeno, arilo, heterocíclico, heteroarilo, ciano, -O₂C-alquilo C₁-C₆, carbamoilo, -CO₂H, -CO₂-alquilo C₁-C₆, alquil(C₁-C₆)tioéter, tiol o ureido.

14. Una nanopartícula que comprende

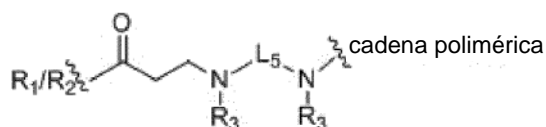
(a) un polímero de acuerdo con la fórmula I



Fórmula I

en donde

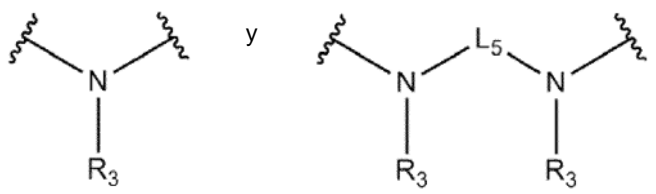
cada L₁ y L₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

L₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquileo, alquenileno, heteroalquileo, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

L₄ se selecciona del grupo que consiste en



L₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilenilo, alquenileno, heteroalquilenilo, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre un oligopéptido y R_y;

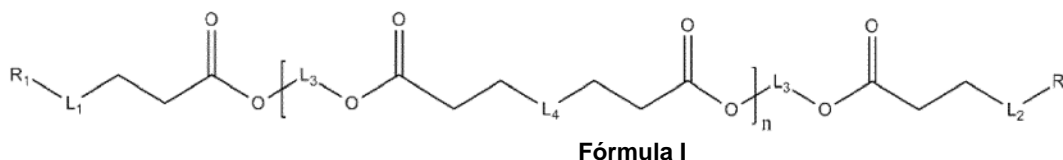
en donde al menos uno de R₁ y R₂ es un oligopéptido;

en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga positiva neta a pH 7;

y en donde R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; y n es un número entero de 5 a 10.000;

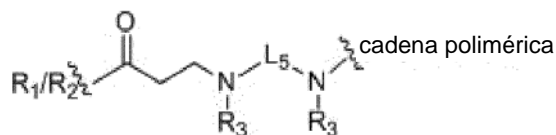
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(b) un polímero según la fórmula I



en donde

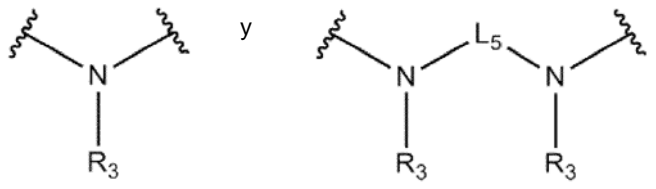
cada L₁ y L₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



O, S, NR_x y un enlace; en donde R_x se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo;

L₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilenilo, alquenileno, heteroalquilenilo, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

L₄ se selecciona del grupo que consiste en



L₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilenilo, alquenileno, heteroalquilenilo, heteroalquenileno, arileno o heteroarileno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre un oligopéptido y R_y;

en donde al menos uno de R₁ y R₂ es un oligopéptido;

en donde el oligopéptido o cada oligopéptido tiene una carga negativa neta a pH 7;

y en donde R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, acilo, arilo o heteroarilo; y

n es un número entero de 5 a 10.000;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Una nanopartícula según la reivindicación 14, que comprende además un agente activo.
16. Una composición que comprende un agente activo y un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición que comprende una nanopartícula según la reivindicación 15.
- 5 17. La composición de la reivindicación 16, en donde el agente activo es un polinucleótido.
18. La composición de la reivindicación 17, en donde el polinucleótido es ARN, ADN o un ARNip.
- 10 19. La composición de la reivindicación 17 o 18, en donde la composición comprende nanopartículas que contienen el polinucleótido y el polímero.
20. Un método para encapsular un agente en una matriz de polímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para formar nanopartículas, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar un agente; proporcionar el polímero; y poner en contacto el agente y el polímero en condiciones adecuadas para formar nanopartículas.
- 15 21. El método de la reivindicación 20, en donde el agente es un polinucleótido seleccionado entre ADN, ARN y ARNip, una molécula pequeña o una proteína.
- 20 22. El método de la reivindicación 20 o 21, en donde la etapa de contacto comprende (a) secar por pulverización una mezcla del agente y el polímero, (b) técnicas de evaporación del disolvente de doble emulsión o (c) una técnica de inversión de fase.
- 25 23. Un polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, una nanopartícula según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 para su uso en medicina.

FIG. 1
Polímero/ADN (50/1)

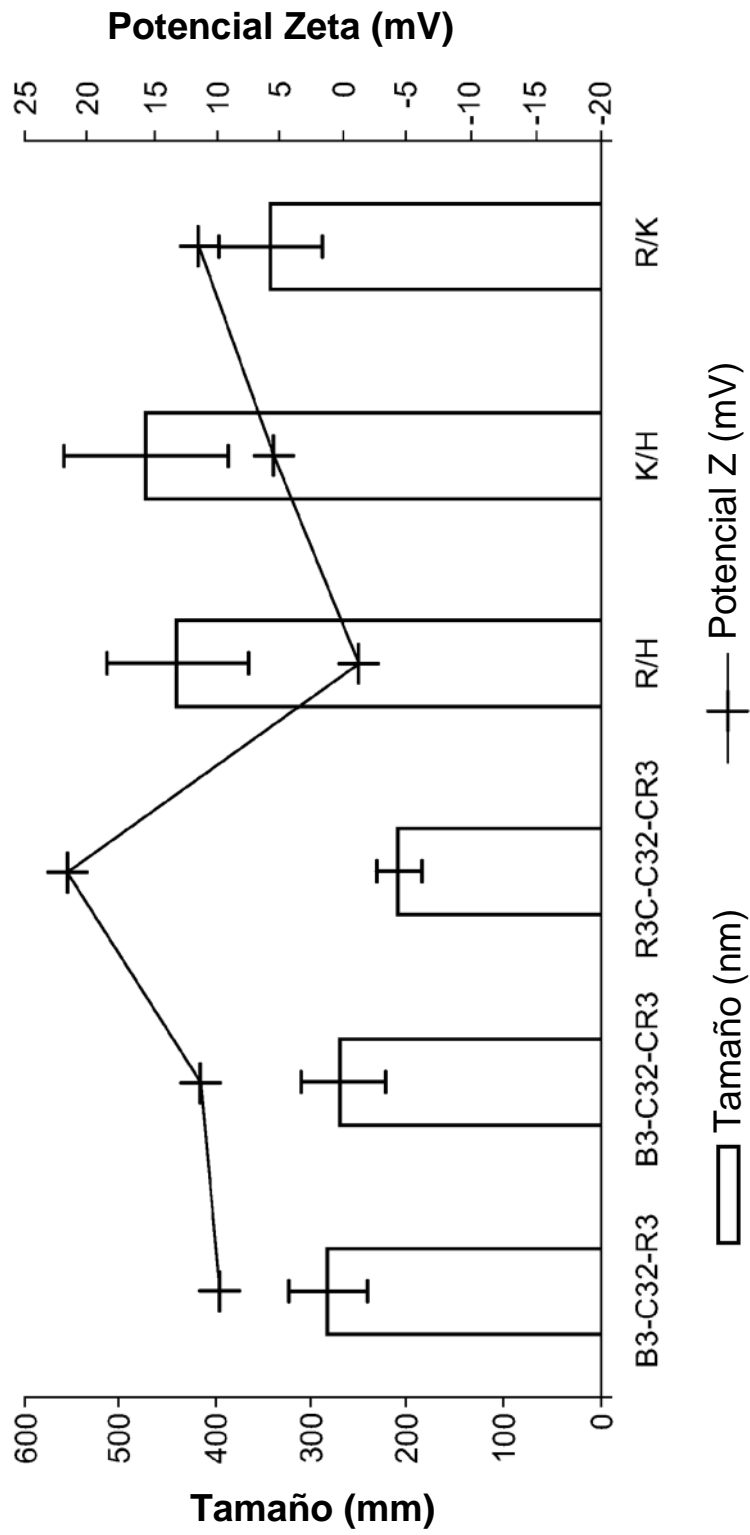


FIG. 2

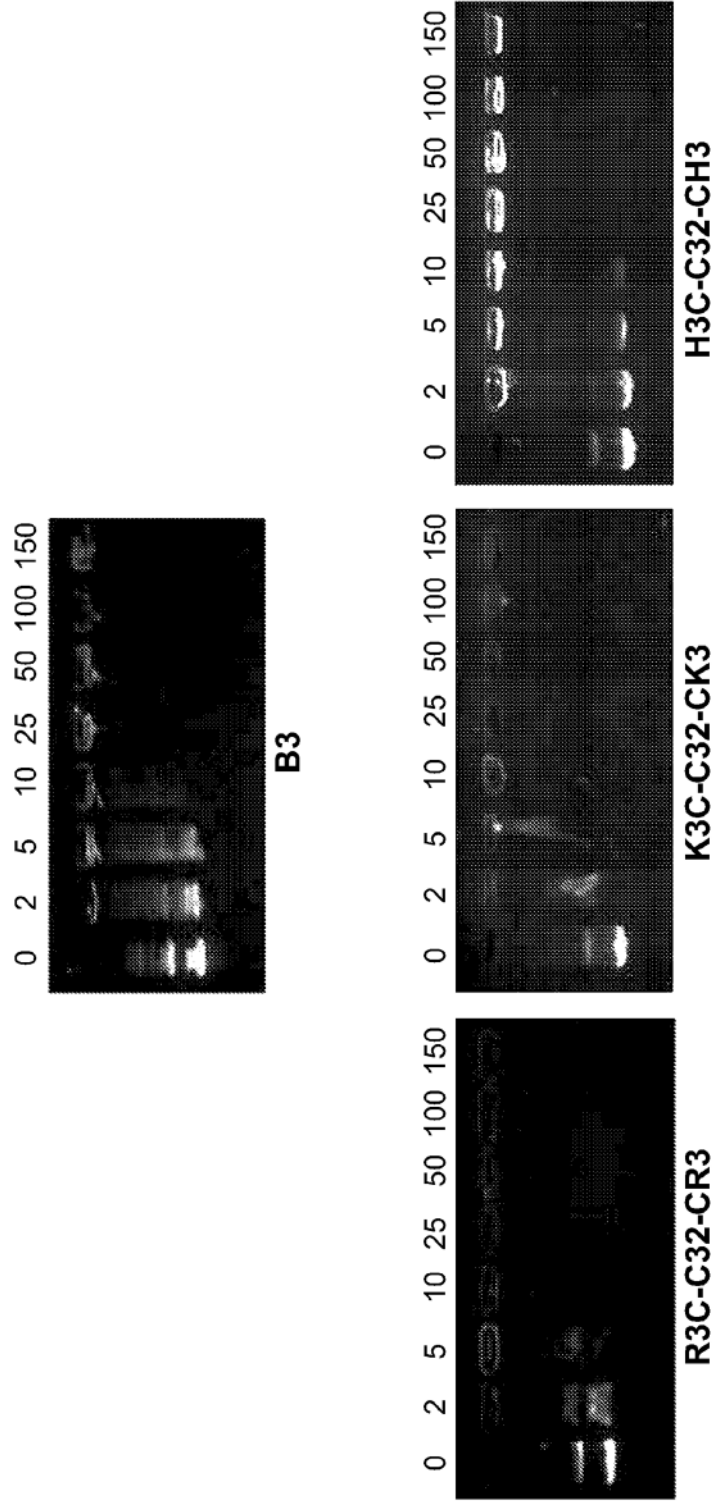
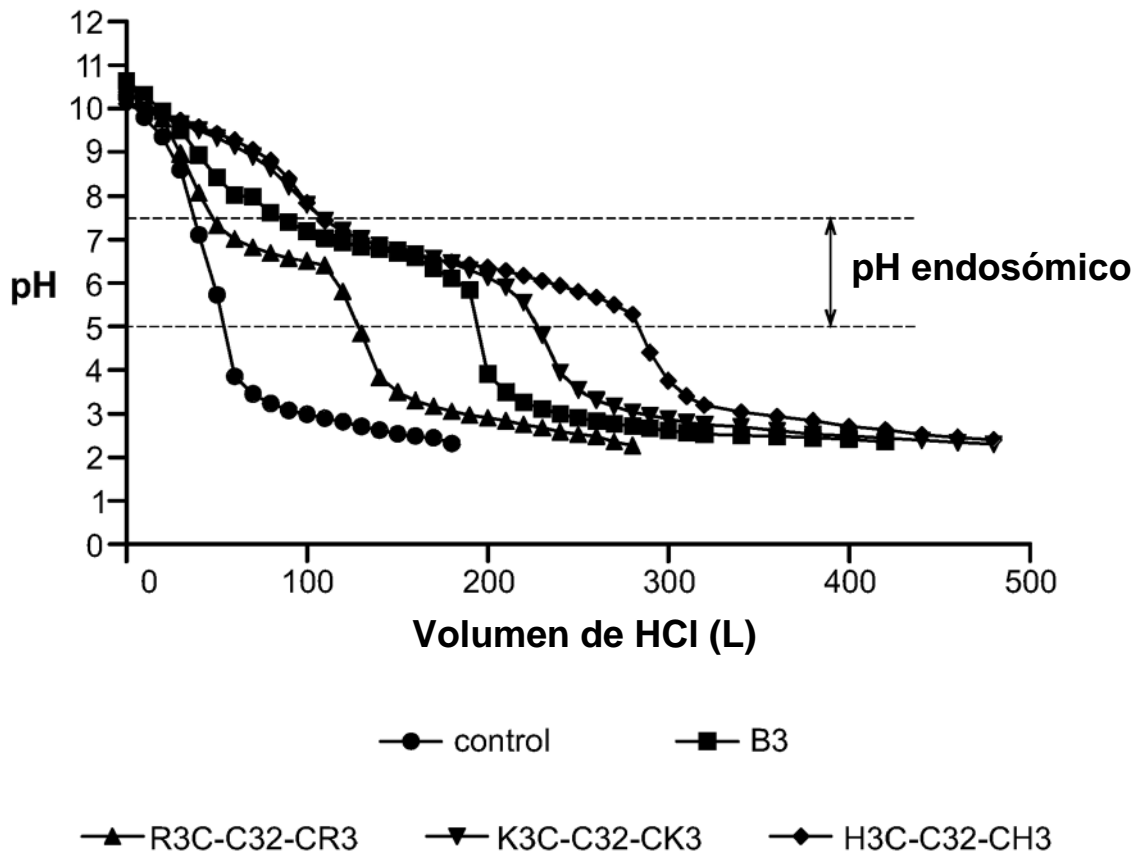


FIG. 3



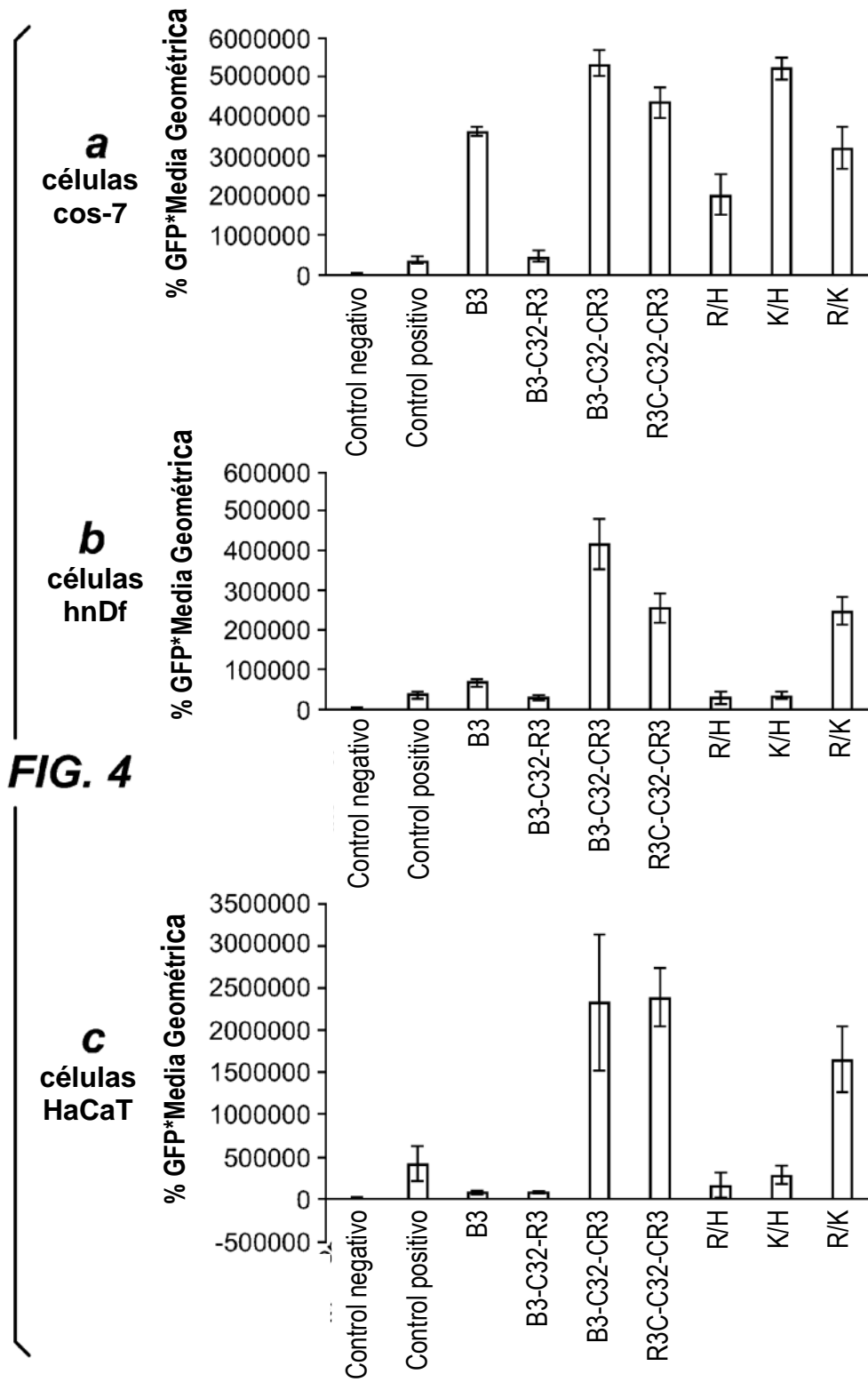


FIG. 5

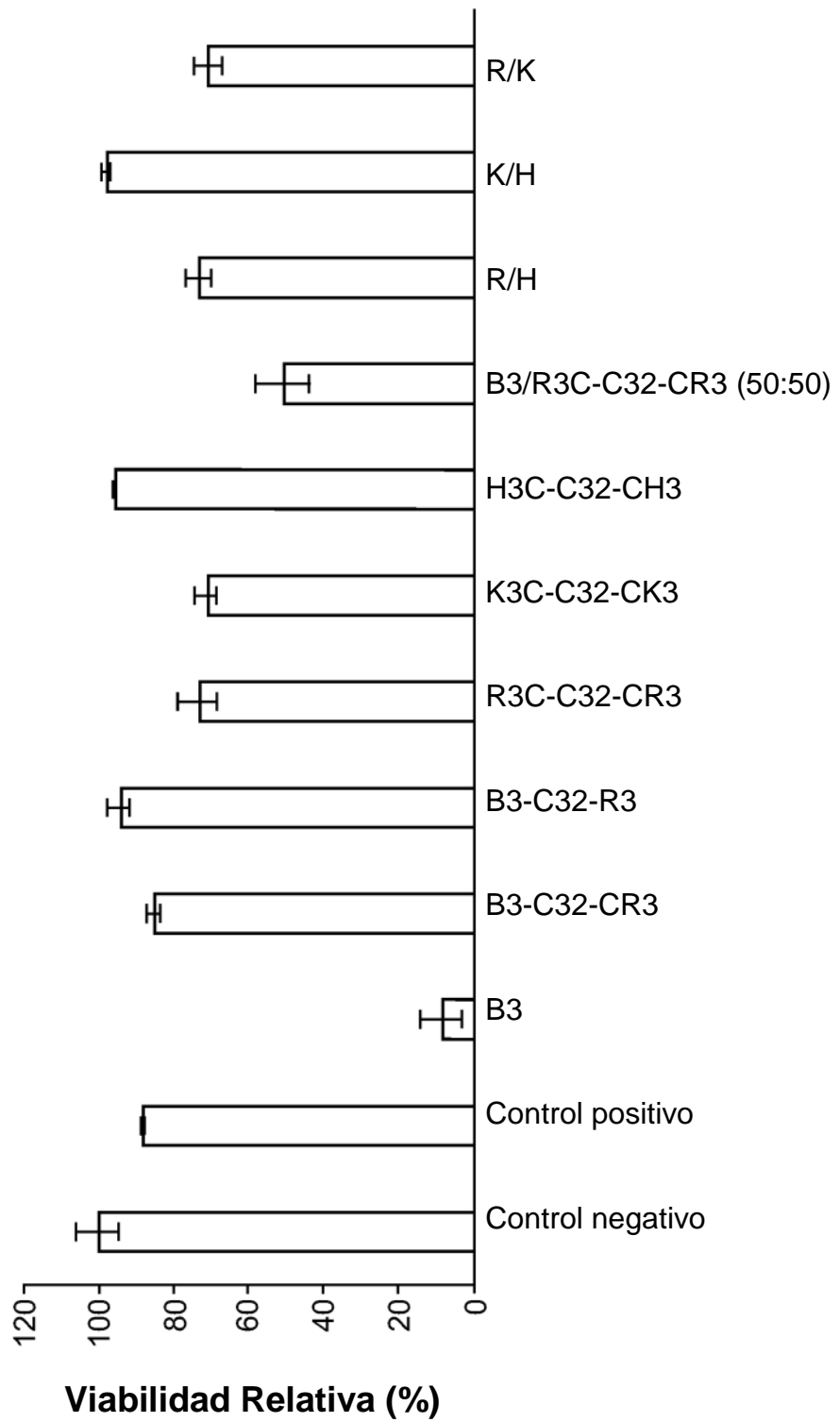


FIG. 6
Polímero/ARNip (200/1)

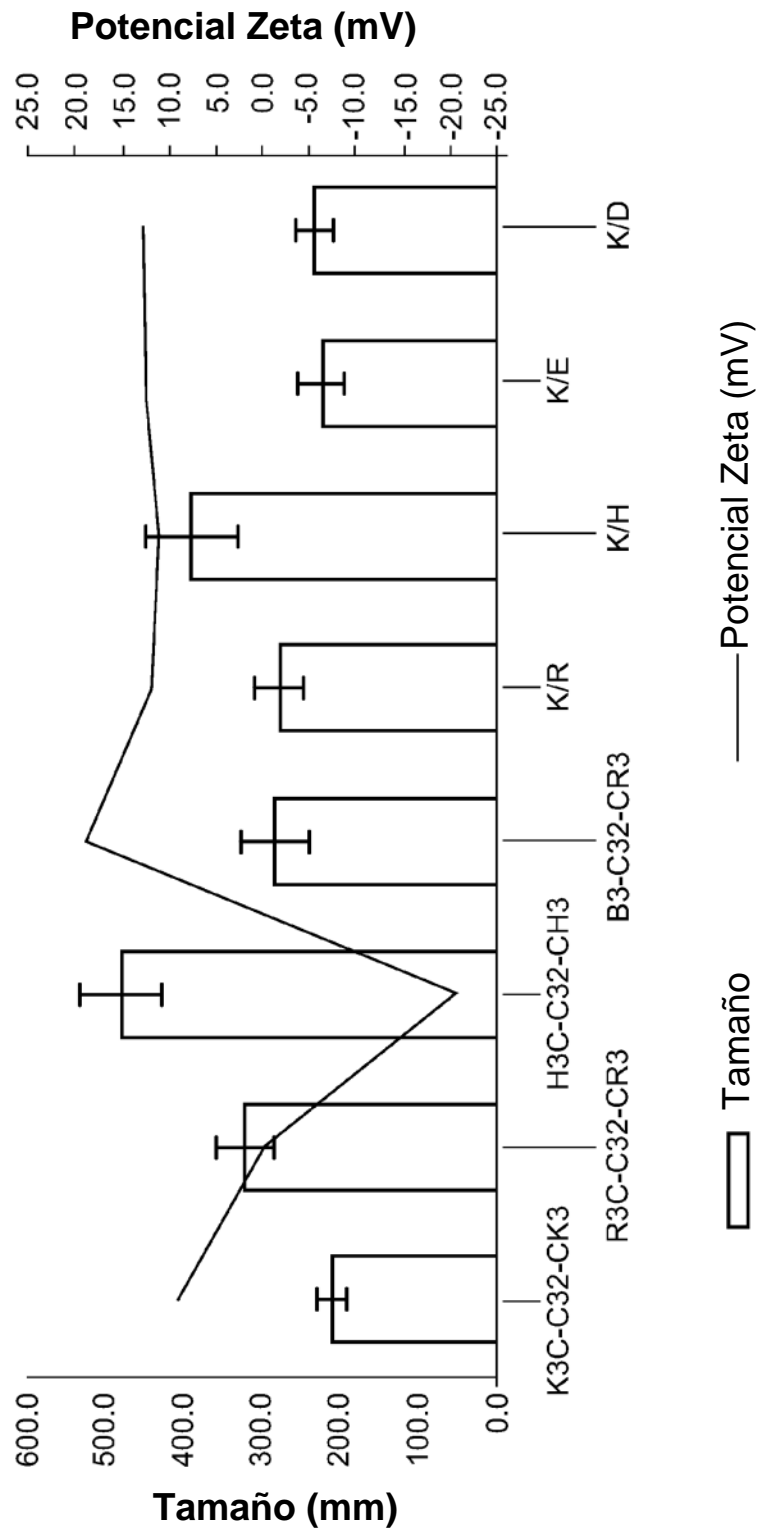


FIG. 7

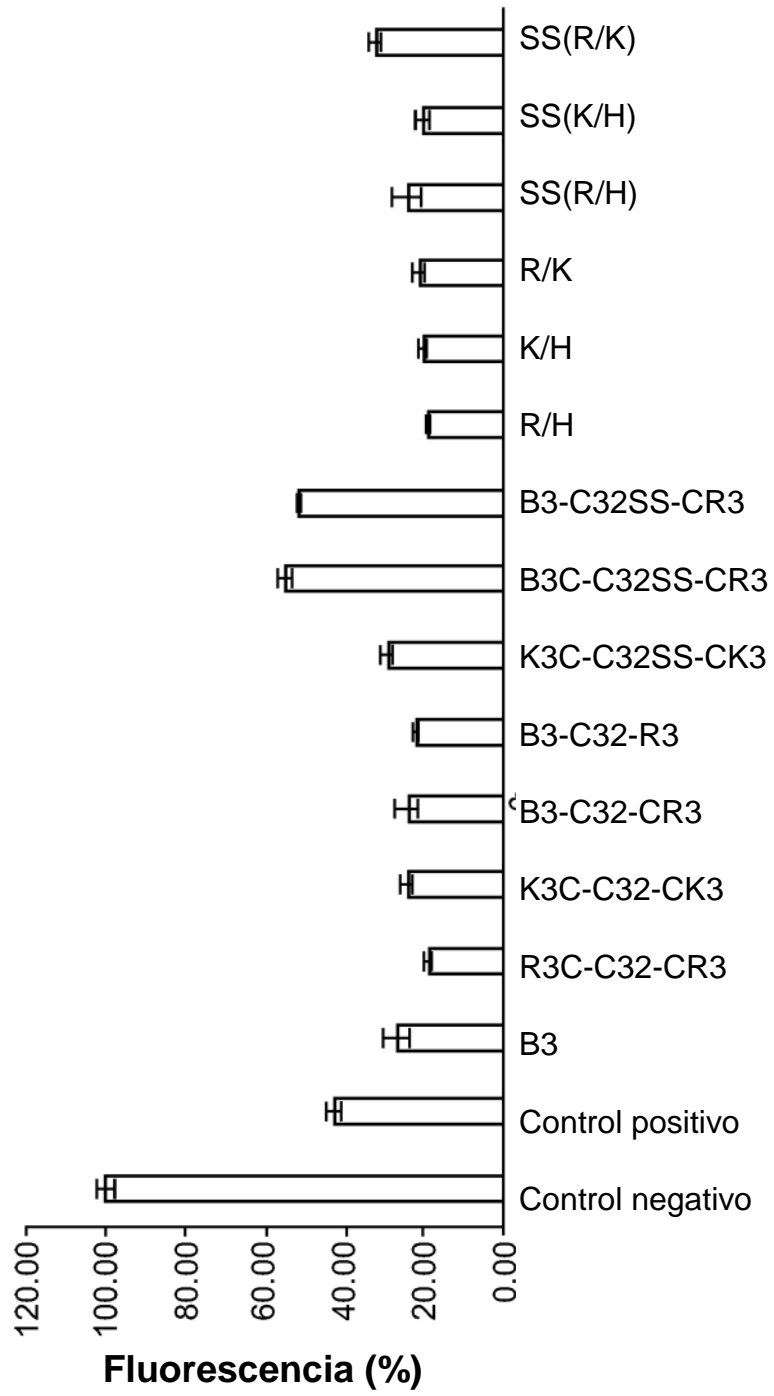


FIG. 8

