

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 248**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C08G 63/685	(2006.01)
C08G 73/02	(2006.01)
C08G 83/00	(2006.01)
C12N 15/87	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2015 PCT/EP2015/068153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015 E 15745509 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3177670**

54 Título: **Poli(beta-aminoéster) hiperramificado para terapia génica**

30 Prioridad:

06.08.2014 GB 201413907

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

06.10.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN, NATIONAL
UNIVERSITY OF IRELAND, DUBLIN (100.0%)
Belfield
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**WANG, WENXIN y
ZHOU, DEZHONG**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 785 248 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-aminoéster) hiperramificado para terapia génica

Campo de la invención

5 La invención se refiere a polímeros ramificados que encuentran uso en aplicaciones de terapia génica como agentes de transfección de ácido nucleico. En particular, la invención proporciona polímeros biodegradables, hiperramificados, que pueden usarse en la administración de genes y que proporcionan eficiencias de transfección mejoradas las cuales al mismo tiempo son seguras y no tóxicas.

Antecedentes de la invención

10 La terapia génica promete ser una de las fronteras más importantes de la medicina. Aunque ha habido algunos reveses importantes en el tratamiento de enfermedades, muchos sistemas nuevos muestran un gran potencial para el tratamiento efectivo y seguro de enfermedades genéticas relacionadas. Los enfoques actuales para el suministro de genes se pueden clasificar en dos grupos, administración de genes virales y no virales. Actualmente, la mayoría de los protocolos de administración de genes utilizan vectores virales como portadores de genes¹, que están asociados con problemas de control y seguridad deficientes. Los vectores no virales ofrecen un número de ventajas sobre los sistemas virales, ya que pueden ajustarse y modificarse finamente para eliminar problemas de seguridad y control², sin embargo, muchos de los sistemas de administración no virales actuales carecen de las capacidades de transfección y liberación de genes que los vectores virales poseen y son mucho menos eficientes en el suministro del gen a la célula.

20 La evidencia del crecimiento de esta tecnología se puede ver en el aumento en el número de compañías de terapia génica basadas en virus (de 44 en 1995 a más de 190 en la actualidad). Se conocen poli(beta-aminoésteres) lineales sintéticos no virales para la administración de genes. Sin embargo, los grupos finales limitados y la estructura lineal de los poli(beta-aminoésteres) lineales obstaculizan severamente su mejora adicional de la eficiencia de la administración de genes. Aunque los agentes de transfección no virales superan muchas preocupaciones asociadas con el uso de vectores virales, típicamente hay problemas asociados con una menor eficiencia de transfección. Las ventajas de los reactivos de transfección de polímeros/liposomas no virales son que consisten en componentes simples, muchos de los cuales están disponibles comercialmente y exhiben menos problemas de bioseguridad. A pesar de que se han producido mejoras significativas durante la última década, en el campo de la terapia génica no viral, aún falta la eficiencia para que muchas tecnologías nuevas no puedan avanzar más allá de la etapa de ensayos clínicos y la aprobación de la FDA. Adicionalmente, la traducción de los desarrollos de la terapia génica a la aplicación clínica hasta la fecha ha sido severamente restringida por las preocupaciones con respecto a la mutagénesis con los sistemas de administración basados en virus y los problemas de eficiencia con los reactivos químicos disponibles actualmente.

35 La presente invención utiliza monómeros de triacrilato que reaccionan directamente mediante la adición de Michael con monómeros de amina para dar poli(beta-aminoéster) hiperramificado (HPAE). Debido a la estructura hiperramificada, los grupos terminales múltiples y tridimensionales (3-D) pueden usarse para mejorar adicionalmente las propiedades del poli(beta-aminoéster) (HPAE) como vector de administración de genes no virales. La secuencia de reacción implica la polimerización aleatoria entre unidades de amino y acrilato formadas a lo largo de la secuencia de reacción. El término "hiperramificado", como se usa en el presente documento, significa una estructura generada por la adición conjugada de aminas primarias o secundarias a triacrilatos, entre los cuales cada amina primaria o secundaria es una adición conjugada a dos grupos vinilo simultáneamente.

40 Los resultados iniciales de la complejación del ADN, la viabilidad celular y la transfección celular son prometedores para estos poli(beta-aminoésteres) hiperramificados recién sintetizados. Los complejos (complejos de polielectrolitos de ácidos nucleicos con policationes) se han investigado como vectores de administración prometedores para una selección de terapias. Aunque la eficiencia de estos polímeros en la transfección celular no está al nivel de los vectores basados en virus, también es importante tener en cuenta que la optimización y el ajuste fino de estos polímeros es muy fácil. Estos polímeros en combinación con los avances en el diseño de plásmidos tendrán un profundo efecto en el campo de la terapia génica no viral.

50 Esta solicitud describe la síntesis y caracterización de poli(beta-aminoéster) hiperramificados para la administración efectiva de genes para el tratamiento de enfermedades genéticas relacionadas. Los vectores no virales son polímeros sintéticos que se sintetizan mediante la adición de Michael con monómeros de triacrilato y monómeros de amina para producir poli(p-aminoéster) hiperramificados (HPAE). Los HPAE están compuestos de triacrilato de trimetilolpropano (TMTPA), diacrilato de etoxilato de bisfenol A (BE), 4-amino-1-butanol (S4) y 3-morfolinopropilamina (MPA). La condensación del ADN se logra mediante la protonación de la amina terciaria bajo un valor de pH ácido. La estructura hiperramificada dota a HPAE de múltiples grupos funcionales sinérgicos. Los vectores de administración de genes tienen criterios de diseño técnico, tal como el empaquetamiento de plásmidos de ADN grandes, protección de ADN, estabilidad del suero, direccionamiento de células específicas, internalización, escape endolisosómico y localización nuclear con una toxicidad mínima, por nombrar algunos. Otros criterios incluyen factores de producción económicos y de escala: facilidad de administración, facilidad de fabricación, síntesis económica, purificación fácil y seguridad. El poli(beta-aminoéster) muy estudiado para la administración de genes es un PAE lineal que contiene grupos de amina

terciaria para complejar el ADN. Sin embargo, la mayoría de los polímeros de base catiónica que se utilizan actualmente en la investigación carecen de la alta eficiencia que muestran los vectores virales in vitro e in vivo. Dado que los polímeros catiónicos parecen funcionar de manera diferente con diferentes tipos de células, este sistema es lo suficientemente flexible como para permitir pequeños cambios en el polímero para acomodar el objetivo clínico requerido. Los resultados recientes mostraron la expresión de proteínas en un número de células usando este poli(β -aminoéster) hiperramificado (HPAE), recién sintetizado. Este polímero formó complejos con ADN en la escala nanométrica (<100 nm) que fueron absorbidos eficientemente por la célula. El exceso de carga positiva de las nanopartículas significaba que eran capaces de escapar del endosoma por el efecto de "esponja de protones"⁷ y la degradación en el citoplasma permitiendo la liberación del ADN y la subsecuente expresión de la proteína. Los polímeros mostraron una mayor capacidad de transfección que los polímeros estándar de oro actuales (PEI, sSuperfect, Lipofectamine 2000 y Xfect) con menos citotoxicidad y mayor capacidad de condensación de ADN. HPAE se demuestra por una baja citotoxicidad y una mayor eficiencia de transfección de hela, RDEBK y hADSC.

El número de patente: US6998115B2 describe poli(β -aminoésteres) biodegradables, que son estructuras lineales basadas en los monómeros 1,6-diaminohexano, N,N-cistaminabisacrilamida y 1,2-diaminoetano. Los polímeros de la presente invención difieren de este polímero de la técnica anterior en que poseen estructuras ramificadas y se sintetizan a partir de diferentes bloques de construcción. La presente invención con su combinación de monómeros permite una síntesis versátil pero controlada con propiedades estructurales únicas que pueden optimizarse para reducir la citotoxicidad y aumentar la eficiencia de la transfección.

El documento US2012149630 informa la reacción de un poli(beta-aminoéster) terminado en amina con un electrófilo y la reacción de un poli(beta-aminoéster) terminado en acrilato con un nucleófilo.

El documento US2012259084 informa un poli(aminoéster) ramificado, dendrítico o hiperramificado que tiene un esqueleto de polímero que comprende una pluralidad de ramas, en la que el esqueleto del polímero tiene al menos un enlace de amina secundario y al menos un enlace de amina terciario, preparando poli(aminoésteres) a través de una reacción de adición de Michael de monómero de tris(éster de acrilato) con un monómero de diamina.

Objeto de la invención

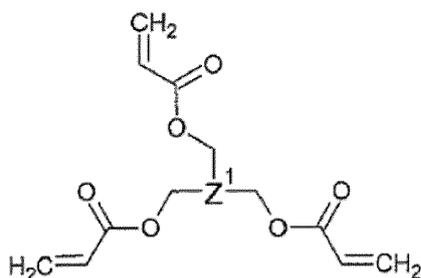
Incluso aunque se han producido mejoras significativas durante la última década en el campo de la terapia génica no viral, todavía falta la eficiencia con muchas tecnologías nuevas que no pueden pasar de la etapa de los ensayos clínicos y la aprobación de la FDA. El objeto de la presente invención es por lo tanto desarrollar un sistema de administración génica seguro y efectivo para el tratamiento de enfermedades, particularmente enfermedades relacionadas genéticamente.

Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un poli-beta aminoéster hecho por:

(a) haciendo reaccionar entre sí, mediante una reacción de adición de Michael, para formar un polímero P1:

(i) Un componente de triacrilato que tiene la fórmula (I)



(I)

en donde Z¹ es un andamio que consiste en:

una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono que contiene heteroátomo lineal o ramificado de 1 a 30 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde Z¹ no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O- alquilo

C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

(ii) Un componente de diacrilato que es diacrilato de etoxilato de bisfenol A; y

(iii) Un componente de amina A1 que comprende de 3 a 20 átomos,

- 5 en el que dicho componente de amina no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y

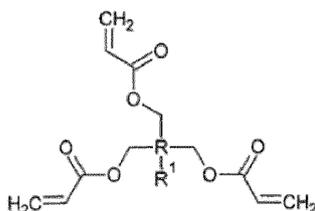
- 10 (b) hacer reaccionar el polímero P1 mediante una reacción de adición de Michael con un componente de amina A2 que comprende de 3 a 20 átomos, en el que dicho componente de amina no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆.

- 15 Preferiblemente, el poli-beta aminoéster tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 3000 Da a aproximadamente 50,000 Da.

- 20 El poli-beta aminoéster tiene adecuadamente un parámetro alfa derivado de la ecuación de Mark-Houwink de menos de 0.5, siendo la determinación del parámetro realizado utilizando una muestra del poli-beta aminoéster disuelto en dimetilformamida (DMF). Preferiblemente, el parámetro alfa derivado de la ecuación de Mark-Houwink es de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.5, más preferiblemente, de aproximadamente 0.25 a aproximadamente 0.5, y de manera adecuada de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.5.

En una realización, el poli-beta aminoéster tiene de manera adecuada un parámetro alfa derivado de la ecuación de Mark-Houwink de 0.3 a 0.5.

El componente de triacrilato puede tener la fórmula:

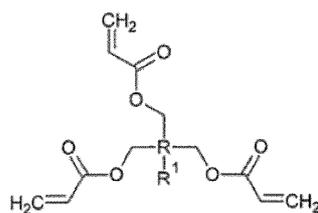


- 30 en donde R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono que contiene heteroátomo lineal o ramificado de 1 a 30 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

- 35 en donde R no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O- alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y

- 40 R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada no sustituida o sustituida de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono que contiene heteroátomo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos

El componente de triacrilato puede tener la fórmula:

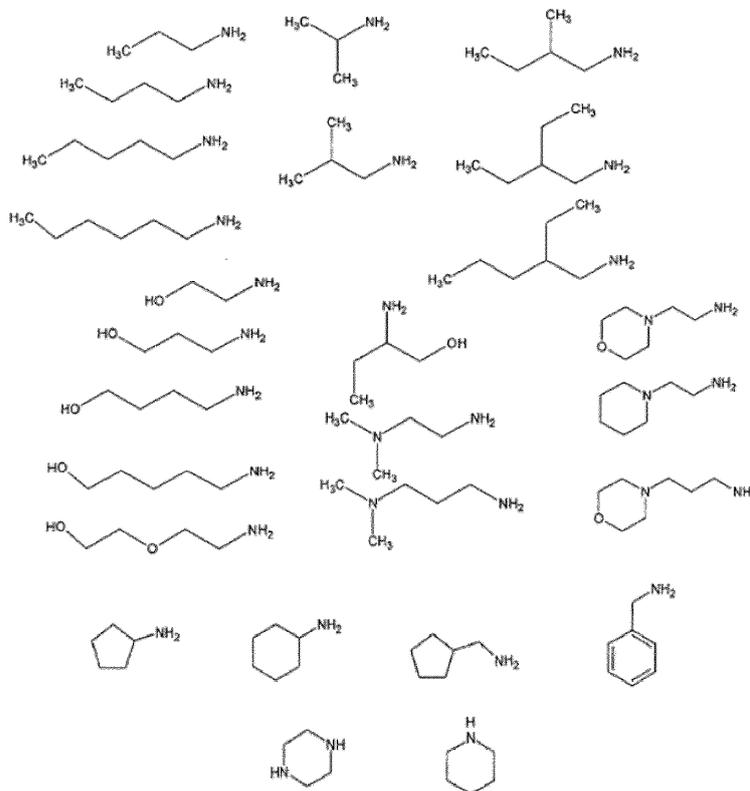


en donde R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono; y R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo.

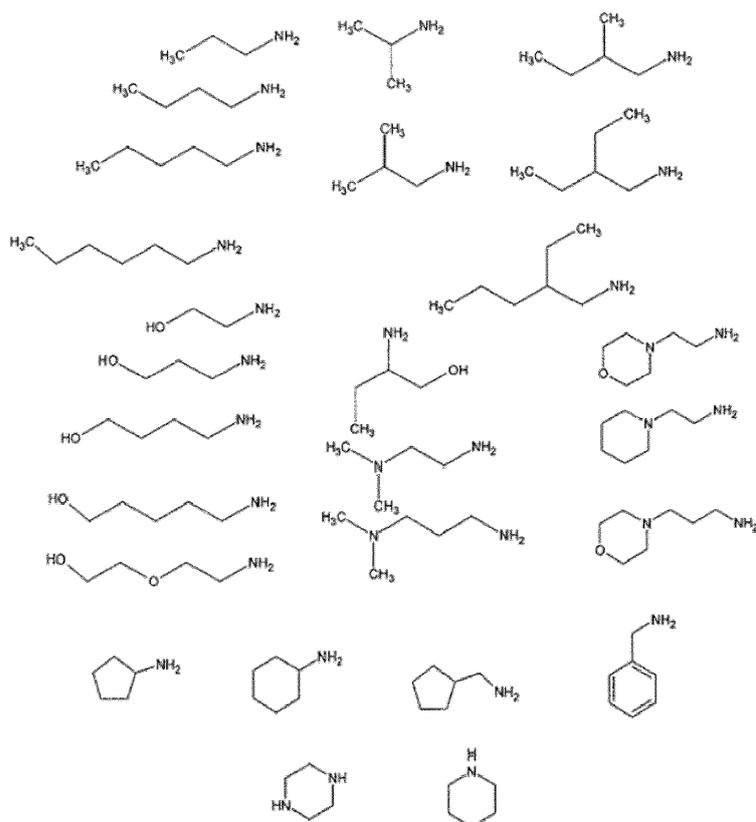
- 5 Preferiblemente, el componente de triacrilato se selecciona del grupo que consiste en triacrilato de trimetilolpropano, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de propoxilato de glicerol (1PO/OH), triacrilato de propoxilato de trimetilolpropano y triacrilato de propoxilato de pentaeritritol.

Preferiblemente, el componente de amina A1 se selecciona del grupo que consiste en metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina, decilamina.

- 10 El componente de amina A1 puede seleccionarse del grupo que consiste en:

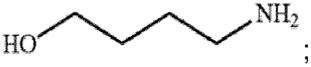


- 15 Preferiblemente, el componente de amina A2 es una alquilamina C₁-C₂₀; una cicloalquilamina C₂-C₂₀; una arilamina C₄-C₂₀ o una cicloalquilamina C₃-C₂₀; que puede estar n sustituida o sustituida con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₂₀, heterocicilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆.
- 20 El componente de amina A2 puede seleccionarse del grupo que consiste en:

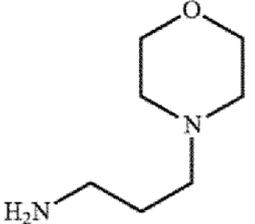


5 La invención también proporciona un poli-beta aminoéster como se describe anteriormente para uso como medicamento. En un aspecto todavía adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un poli-beta aminoéster como se definió anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender un polinucleótido y un poli-beta aminoéster como se define en el presente documento. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen un polinucleótido y un poli-beta aminoéster como se definió anteriormente. La invención también proporciona una composición para uso en la transfección de una célula que comprende un componente de ácido nucleico y un componente de poli-beta aminoéster como se define aquí. En dicha composición, el triacrilato puede ser triacrilato de trimetilolpropano, la amina A1 puede ser

10

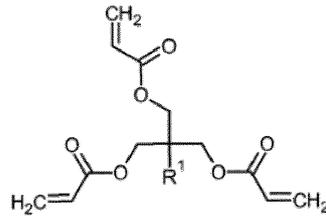


15 y la amina A2 puede ser



La invención también proporciona un método in vitro para transfectar células que comprende poner en contacto células con una composición que comprende un agente de transfección no viral y un ácido nucleico; en donde dicho agente de transfección no viral es un poli-beta aminoéster hecho por:

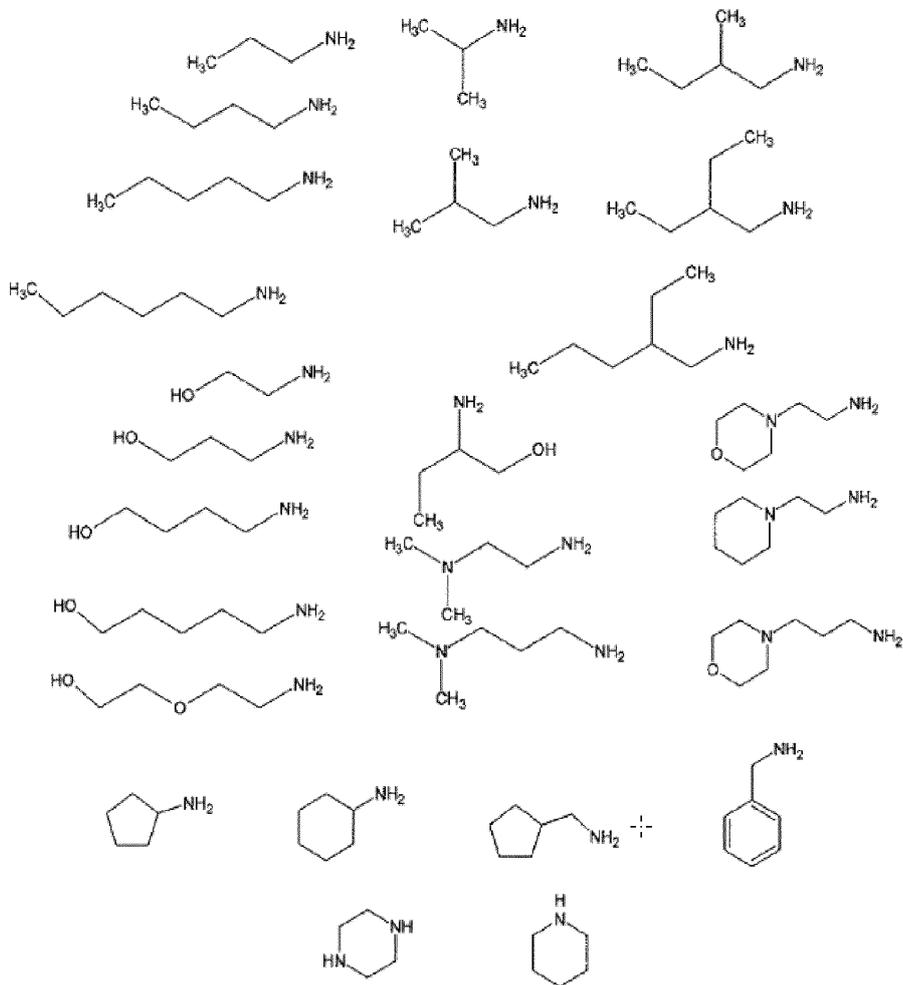
- 20 (a) haciendo reaccionar entre sí, mediante una reacción de adición de Michael, para formar un polímero P1:
- (i) un componente de triacrilato que tiene la fórmula:



en donde R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, seleccionada del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo;

(ii) un componente de diacrilato que es diacrilato de etoxilato de bisfenol A; y

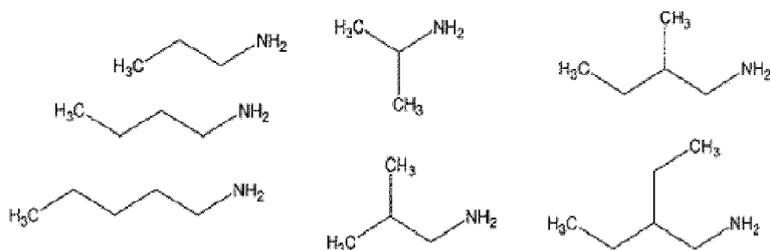
5 (iii) un componente de amina A1 seleccionado del grupo que consiste en metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina, decilamina; o:

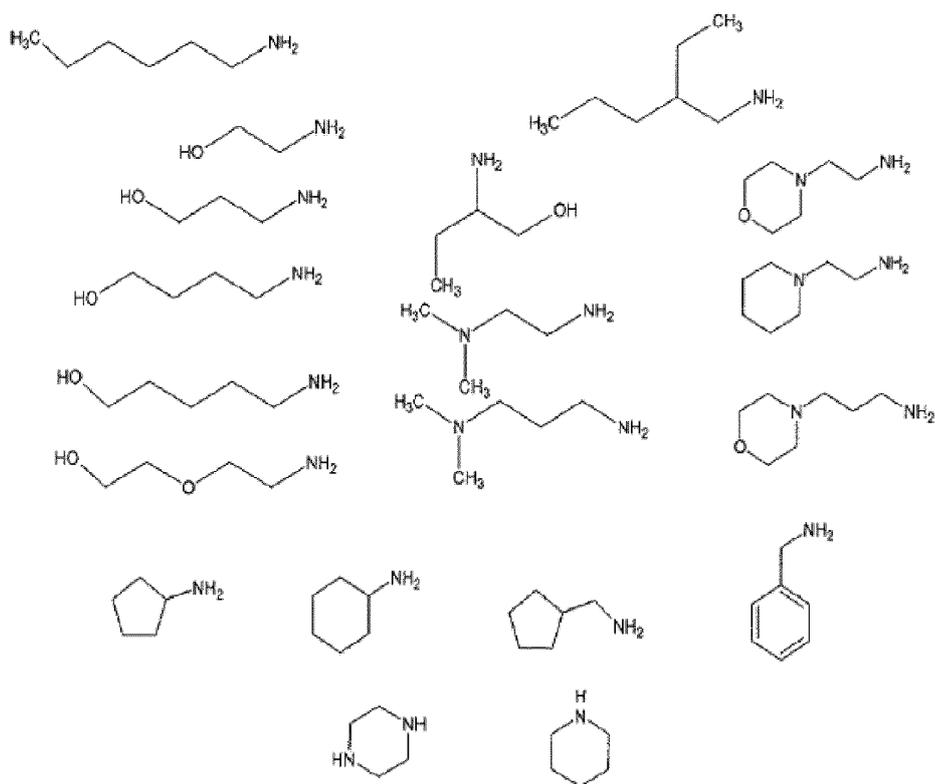


10

y

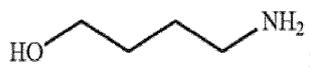
(b) hacer reaccionar el polímero P1 mediante una reacción de adición de Michael con un componente de amina A2; en donde A2 se selecciona del grupo que consiste en:



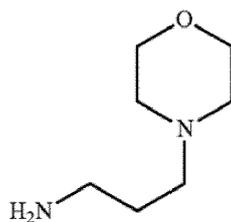


En dicho método, el triacrilato puede ser triacrilato de trimetilolpropano, la amina A1 puede ser

5



y la amina A2 puede ser



Breve descripción de los dibujos

- 10 Figura 1 Curva GPC del HPAE sintetizado.
- Figura 2 Espectro de RMN del HPAE sintetizado
- Figura 3 Mediciones de tamaño (A) y carga (B) de complejos formados a partir de diversos agentes de transfección obtenidos de Zetasizer (n = 4).
- Figura 4 Capacidad de complejación de HPAE a diferentes relaciones de peso polímero/ADN.
- 15 Figura 5 Estudios de viabilidad celular de HPAE, en células Hela, células RDEBK y células hADSC a relaciones óptimas de peso de polímero/ADN. Los controles (SF, LP, PEI, Xfect y NFBfect) también tienen una relación p/p óptima, (n = 4) (± S).
- Figura 6 Expresión de luciferasa cuantificada por luminiscencia después de la transfección con diversos agentes de transfección, (n = 4) (± S).
- 20 Figura 7. Expresión de pGFP en células HeLa transfectadas (A) y células RDEBK (B) visualizadas usando un microscopio de fluorescencia.

Figura 8. La amina, los triacrilatos y el diacrilato se copolimerizan en primer lugar para formar un polímero base terminado en acrilato, seguido por un agente de protección en el extremo de los polímeros base para producir HPAE.

Figura 9 Caracterización de HPAEs de composición y estructura variable. (a) Espectros $^1\text{H RMN}$ de HPAEs y LPAE. (b) los rastros de GPC muestran que los HPAEs y LPAE tienen pesos moleculares de alrededor de 12,000 Da; (c) Gráficos de Mark-Houwink (MH) de HPAEs y LPAE. Con el aumento en la relación de alimentación de TMPTA a BE, el valor a de LPAE y HPAEs disminuye secuencialmente: LPAE tiene un valor de 0.65 confirmando su estructura lineal típica. En contraste, el valor a de HPAE disminuye de 0.48 (HPAE-1) a 0.31 (HPAE-10) demostrando sus estructuras altamente ramificadas.

Figura 10. Potencia de transfección génica de HPAE-2 y HPAE-4 en comparación con LPAE y reactivos de transfección comerciales SuperFect y PEI en diversos tipos de células. (a) Actividad de Gluciferasa de diversas células 48 horas después de la transfección. HPAE-2 y HPAE-4 muestran una actividad de Gluciferasa hasta 8.521 veces mayor que LPAE, SuperFect y PEI. Los datos se muestran como promedio \pm SD, $n = 4$. La significación estadística en comparación con SuperFect es * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$; (b) Imágenes representativas de fluorescencia de células transfectadas por HPAE en la relación peso/peso de 15:1. Las barras de escala presentan 200 μm ; (c) resultados de transferencia West del sobrenadante de células RDEBK. Se observa una banda claramente visible para la proteína del colágeno VII (C7) después de la transfección con HPAE/ADN.

Figura 11. Espectros $^1\text{H RMN}$ de polímeros base terminados en acrilato de HPAEs y LPAE. Los espectros ilustran que antes de la protección en el extremo con MPA, a aproximadamente 6.0 ppm, son evidentes picos de señal múltiples que representan los grupos vinilo en los polímeros base.

Figura 12. HPAE $^1\text{H RMN}$ y los espectros $^{13}\text{C RMN}$ correspondientes. Se asignaron grupos funcionales a los picos de señal correspondientes en los espectros, respectivamente: $^1\text{H RMN}$: 0.8 (bs, CH_3CH_2 -), 1.3-1.7 (m, CH_3CH_2 -, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ - y $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.3-2.6 (m, $-\text{NCl}-\text{HCH}_2\text{COO}$ -, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ - y $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2.7-2.9 (m, $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$ y $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ -), 3.2-3.9 (m, $-\text{NCH}_2\text{COO}$ -, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - y $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4.0-4.5 (m, $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ -, $-\text{COOCH}_2\text{C}$ - y $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ -), 6.8 (d, $-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}$ -), 7.1 (d, $-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}$ -); $^{13}\text{C RMN}$: 7.4, 22.9, 24.7, 31.0, 31.4, 31.9, 33.6, 40.7, 41.7, 44.4, 48.8, 52.8, 53.7, 54.0, 62.4, 63.7, 65.8, 67.3, 69.2, 69.9, 70.3, 113.9, 127.7, 143.6, 156.5, 172.0. Condiciones de medición: $^1\text{H RMN}$, CDCl_3 , 500 MHz; $^{13}\text{C RMN}$, CDCl_3 , 150 MHz.

Figura 13. LPAE $^1\text{H RMN}$ y los espectros $^{13}\text{C RMN}$ correspondientes. Se asignaron grupos funcionales a los picos de señal correspondientes en los espectros, respectivamente: $^1\text{H RMN}$: 1.5-1.7 (m, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ - y $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.3-2.6 (m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ - y $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2.7-2.9 (m, $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$ y $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ -), 3.4-3.9 (m, $-\text{NCH}_2\text{COO}$ -, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - y $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4.0-4.5 (m, $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ -, 6.8 (d, $-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}$ -), 7.1 (d, $-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}$ -); $^{13}\text{C RMN}$: 24.8, 28.3, 31.0, 31.5, 31.8, 41.0, 41.7, 44.5, 49.3, 53.7, 53.9, 62.6, 65.8, 67.3, 69.2, 69.6, 113.9, 127.7, 143.6, 156.4, 172.3. Condiciones de medición: $^1\text{H RMN}$, CDCl_3 , 500 MHz; $^{13}\text{C RMN}$, CDCl_3 , 150 MHz.

Figura 14. Interacción de HPAE-2 y HPAE-4 con ADN. (a) HPAE-2 y HPAE-4 exhiben una fuerte capacidad de unión al ADN y pueden retardar efectivamente la progresión a través de un gel de agarosa; (b) los poliplexes HPAE-2/ADN y HPAE-4/ADN exhiben tamaños muy pequeños en medios DMEM con 10% de FBS; (c) Los poliplexes HPAE-4/ADN y HPAE-4/ADN exhiben muy buena estabilidad y no agregación significativa después de 4 horas de formación compleja en DMEM con 10% de FBS.

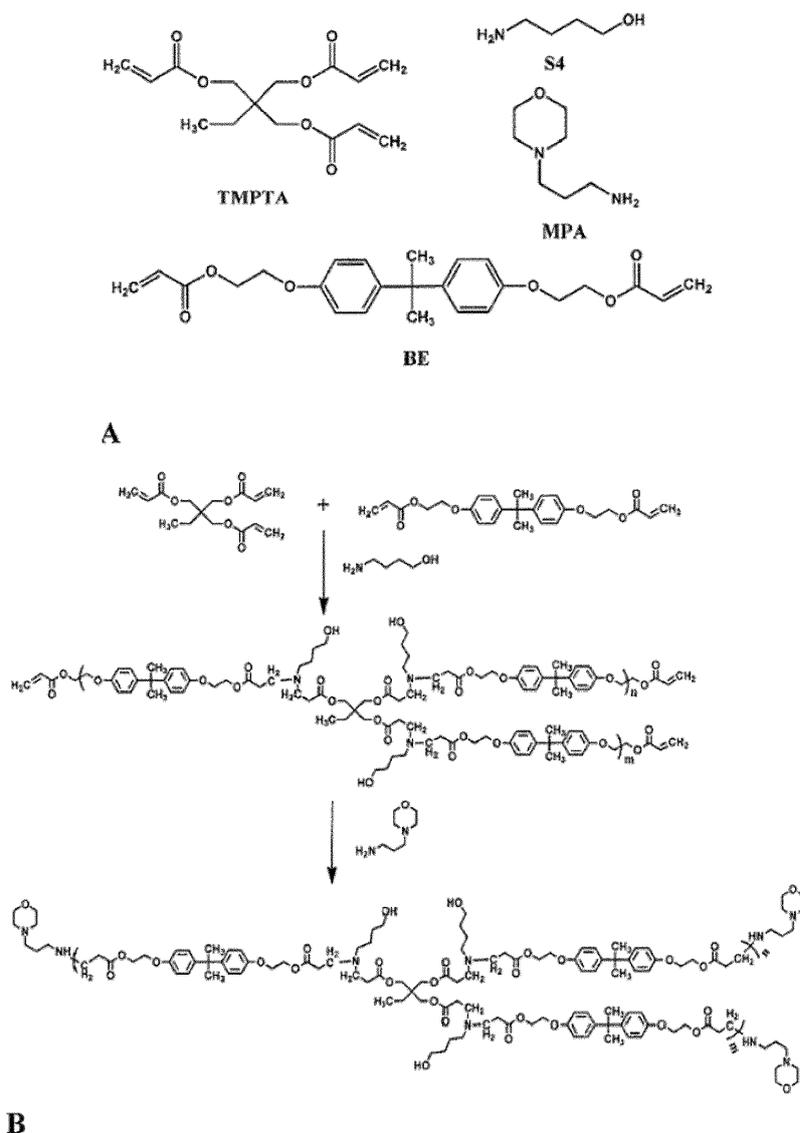
Figura 15. Evaluación preliminar de la eficiencia de transfección y la citotoxicidad de los HPAEs de diferentes composiciones y estructuras en una relación p/p de 10:1 en células HeLa usando ensayos de Gluciferasa. (a) Todos los HPAEs exhiben un aumento significativo de veces (12~2,400) en las eficiencias de transfección en comparación con LPAE. Nótese que HPAE-1, HPAE-2, HPAE-3 y HPAE-4 muestran un aumento de 5 a 20 veces en la eficiencia de transfección en comparación con los reactivos de transfección comerciales Superfect y PEL (b) Todos los HPAEs preservan la viabilidad celular por encima del 90%.

Figura 16. Las células positivas para GFP post transfección se cuantifican por citometría de flujo. HPAE-2 y HPAE-4 muestran una eficiencia de transfección significativamente mejorada en diversos tipos de células en comparación con LPAE, así como SuperFect y PEI; Datos mostrados como promedio \pm SD, $n = 4$. La significación estadística en comparación con SuperFect fue * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Figura 17. Viabilidad celular post transfección con HPAE-2, HPAE-4, LPAE y reactivos comerciales SuperFect y PEI, medidos usando el ensayo Alamarblue. En 12 tipos de células diferentes, HPAE-2 y HPAE-4 conservan altos niveles de viabilidad celular incluso en células madre y astrocitos.

Descripción detallada de los dibujos

El proceso de sintetizar de estos polímeros se basa en la reacción de adición de Michael^{1,2}.



En donde n y m son cualquier número entre 1 y 100, preferiblemente entre 1 y 75, preferiblemente entre 1 y 50 o preferiblemente entre 1 y 25.

- 5 Los monómeros que se utilizan para la síntesis de HP AE se muestran en (A) y el proceso de síntesis de HP AE por adición de Michael se muestra en (B).

Procedimiento experimental

Materiales.

- 10 Para la síntesis y caracterización de polímeros, monómeros de acrilato disponibles en el mercado que incluyen triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA) y bisfenol un diacrilato de etoxilato (BE), monómeros de amina que incluyen 4-amino-1-butanol (S4) y agentes de protección en el extremo que incluyen 3-morfolinopropilamina (MPA) fueron adquiridos de Sigma Aldrich y utilizados como se recibieron. El bromuro de litio (LiBr) para mediciones de GPC se adquirió de Sigma-Aldrich. Los disolventes dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF) y dietil éter se adquirieron de Fisher Scientific. El cloroformo deuterado (CDCb) se adquirió de Sigma Aldrich. El acetato de sodio ($\text{pH } 5.2 \pm 0.1$, 3 M) adquirido de Aldrich se diluyó a 0.025 M antes de su uso. Para la caracterización y el
- 15 rendimiento de políplex, se utilizaron agarosa (para electroforesis en gel, Aldrich) y Tinción en gel de SYBR® Safe (Invitrogen) tal como se recibieron de acuerdo con los protocolos. Para el cultivo celular y la transfección génica, se adquirieron medios de cultivo celular, tripsina-EDTA y suero bovino fetal (PBS) y solución salina equilibrada de Hank (HBSS) de Sigma Aldrich y Life Technologies. Los reactivos de transfección comerciales de polietilénimina ramificada (PEI, Mw = 25 KDa) se adquirieron de Sigma Aldrich. SuperFect® se adquirió de Qiagen, Lipofectamine TM 2000 se adquirió de Invitrogen y el polímero Xfect™ se adquirió de Clontech y se usó de acuerdo con el protocolo del fabricante.
- 20 El plásmido de luciferasa Gaussia princeps secretado por células (pCMV-GLuc) y el plásmido de proteína fluorescente verde (pCMV-GFP) se obtuvieron de New England Biolabs UK, y su expansión, aislamiento y purificación se realizó

usando los kits Giga-Prep (Qiagen) de acuerdo con el protocolo. El kit de ensayo de luciferasa Gaussia BioLux TM (New England Biolabs), AlamarBlue® (Invitrogen) se utilizaron de acuerdo con los protocolos. El agente intercalante, yoduro de propidio, se adquirió de Life Technologies para el análisis de citometría de flujo. Todos los reactivos se usaron de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

5 Síntesis de polímeros.

Para sintetizar los polímeros de PAE hiperramificados (HPAE), se disolvieron 0.28 g de TMPTA, 0.29 g de BE y 0.18 g de S4 en 7.5 ml de DMSO, y la reacción se produjo a 90 °C. Una vez que el peso molecular estuvo en el rango de 5000-7000 Da, se agregaron 0.288 g de MPA disuelto en 2.88 ml de DMSO para proteger en el extremo del polímero base terminado en acrilato a TA durante 24 h. Y luego el producto polimérico se precipitó en éter dietílico tres veces y se secó al vacío durante 24 h y luego se almacenó a -20 °C para estudios posteriores.

Como se describe en la Tabla S 1, para sintetizar HP AEs de diferentes composiciones y estructuras ramificadas, se usaron diversas relaciones de alimentación de monómeros. La amina, el triacrilato y el diacrilato se disolvieron en DMSO y las reacciones se realizaron a 90 °C. La terminación de la reacción de polimerización se logró mediante la protección en el extremo de los acrilatos terminales mediante la adición de amina de protección en el extremo disuelta en DMSO en el recipiente de reacción a temperatura ambiente (TA) durante 24 horas. Los productos poliméricos finales se purificaron precipitando en éter dietílico tres veces, y luego se secaron al vacío durante 24 h antes de almacenarse a -20 °C para estudios posteriores. Para sintetizar el LPAE, la amina y el diacrilato se mezclaron directamente sin disolvente y se hicieron reaccionar a 90 °C. La reacción se terminó y el producto final se purificó y almacenó como se describe anteriormente.

El peso molecular (Mw y Mn) y el índice de polidispersidad (PDI) de HPAEs y LPAE se midieron por cromatografía de permeación en gel (GPC). El análisis se realizó usando un sistema 1260 Infinite GPC con un detector de índice de refracción (RI), un detector de viscosímetro (VS DP) y un detector de dispersión de luz de ángulo doble (LS 15° y LS 90°). Para preparar los polímeros para el análisis, se disolvieron muestras de 10.0 mg en 2 ml de DMF y luego se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm. Las columnas GPC (30 cm PLgel Mixed-C, dos en serie) se eluyeron con DMF y LiBr al 0.1% a una tasa de flujo de 1 ml/min a 50 °C. Las columnas se calibraron con estándares lineales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). La RMN confirmó las composiciones de HPAEs. Las muestras de polímero se disolvieron en CDCl₃, los espectros de ¹H-RMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian Inova de 500 MHz y se informaron en partes por millón (ppm) con respecto a la respuesta del solvente (7.24 ppm) o tetrametilsilano (0.00 ppm). Los espectros de ¹³C RMN se llevaron a cabo a 150 MHz y se informaron en ppm en relación con la respuesta del disolvente (77.2 ppm).

Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC).

El peso molecular y la polidispersidad del HP AE se midieron por GPC. Se extrajo una muestra de 50 µl de HPAE de la reacción a intervalos de tiempo específicos, se diluyó con 1 ml de DMF, se filtró a través de un filtro de 0.2 µm y luego se analizó usando un instrumento Varian 920-LC GPC equipado con un detector de índice de refracción (IR) a 60 °C con DMF como solución de elución, la tasa de flujo fue de 1 ml por minuto. La máquina se calibró con estándares lineales de poli(metacrilato de metilo).

Medición de resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN).

La estructura química de HPAE se confirmó por ¹H-RMN. HPAE se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) y las mediciones se llevaron a cabo en un equipo Bruker RMN de 300 MHz. Todos los cambios químicos se informaron en ppm con respecto al tetrametilsilano (TMS).

Tamaño de Poliplex y determinación potencial de Zeta por dispersión dinámica de luz (DLS).

Para la determinación del tamaño y potencial zeta, se utilizó el plásmido pCMV-GLuc. Los poliplexes se formaron a través de la interacción electrostática entre el ADN y el HPAE. En resumen, HPAE se disolvió primero en DMSO a 100 mg/ml. Se diluyeron 2 µg de ADN en 100 µl de regulador de acetato de sodio (pH 5.2 ± 0.1, 0.025 M). De acuerdo con la relación en peso de HPAE/ADN (p/p), la solución de DMSO de HPAE requerida se diluyó a 100 µl con regulador de acetato de sodio y luego se añadió a la solución de ADN, se agitó en vórtex y se mantuvo quieta durante 10 minutos. Luego, la determinación del tamaño del poliplex se realizó en un Zetasizer de Malvern Instruments (Nano-2590) con un ángulo de dispersión de 90 °C. Para la determinación del potencial zeta, los poliplexes se prepararon como anteriormente y se diluyeron a 800 µl con regulador de acetato de sodio y luego se determinó el potencial zeta en el mismo equipo. Todas las determinaciones se repitieron al menos cuatro veces.

Determinación del parámetro alfa de Mark-Houwink

El diagrama de Mark-Houwink es una herramienta poderosa para investigar la estructura del polímero en solución, ya que revela claramente la relación estructura-peso molecular con alta sensibilidad. Se genera trazando el peso molecular (MW) contra la viscosidad intrínseca (IV) en un gráfico log-log. El peso molecular, por supuesto, indica la longitud de las cadenas de polímeros (o el grado de polimerización) pero por sí solo no puede dar ninguna indicación de la estructura. La viscosidad intrínseca (expresada en dL/g) es una medida de la densidad molecular de las cadenas

de polímeros en solución. Cuanto más apretadas estén las cadenas o se enrollen en la solución, mayor será la densidad y menor será la viscosidad intrínseca. Esta medición es independiente del peso molecular, por lo que dos estructuras diferentes que tienen el mismo peso molecular pueden tener diferentes viscosidades intrínsecas; por ejemplo, un polímero lineal (no ramificado) y un polímero ramificado del mismo peso molecular tendrán diferentes viscosidades intrínsecas. Adicionalmente, si el polímero cambia la estructura a través de su distribución de peso molecular (por ejemplo, se vuelve más sustituido), los cambios de viscosidad intrínseca se detectarán fácilmente. Esto es lo que hace que el diagrama de Mark-Houwink sea tan útil y poderoso. Los datos sin procesar para el diagrama de Mark-Houwink se obtienen de manera conveniente y simple a partir de datos GPC/SEC de detección múltiple de alta calidad combinando el peso molecular de un detector de dispersión de luz con la viscosidad intrínseca de un detector de viscosímetro. Ambos conjuntos de datos se miden en cada punto del perfil de elución de la muestra. El diagrama resultante se puede usar de muchas maneras, desde simplemente evaluar qué tan cerca están dos estructuras hasta hacer mediciones cuantitativas complejas de ramificación de polímeros.

En general:

$\alpha < 0.5$: cadenas compactas/esféricas

15 $0.5 < \alpha < 0.8$: Bobina aleatoria/cadenas flexibles

$0.5 < \alpha < 0.8$: varilla rígida/cadenas rígidas

La determinación de los parámetros alfa de Mark-Houwink de los HPAEs se realizó en un sistema 1260 Infinite GPC con un detector de índice de refracción (RI), un detector de viscosímetro (VS DP) y un detector de dispersión de luz de ángulo doble (LS 15° y LS 90°). Para preparar los polímeros para el análisis, se disolvieron muestras de 10.0 mg en 2 ml de DMF y luego se filtraron a través de un filtro de 0.45 μm . Las columnas GPC (30 cm PLgel Mixed-C, dos en serie) se eluyeron con DMF y LiBr al 0.1% a una tasa de flujo de 1 ml/min a 60 °C. Las columnas se calibraron con estándares lineales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Los datos de GPC se analizaron usando calibración universal.

Ensayos de electroforesis en gel de agarosa.

25 Para los ensayos de electroforesis en gel de agarosa, se usó 1 μg de plásmido Gluc para cada preparación de muestra. El ADN se diluyó a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con regulador de acetato de sodio, de acuerdo con la relación peso/peso, el HP AB requerido se diluyó a 5 μl con acetato de sodio y luego se añadió a la solución de 5 μl de ADN, se agitó en vórtex y se mantuvo quieto durante 10 minutos. Después de eso, las soluciones de políplex se agregaron junto con 2 μl de colorante de carga a los pocillos en el gel de agarosa (agarosa al 1% en regulador de ácido tris-bórico-EDTA (TBE) con tinción de ADN SYBR® Safe, pH 8.0) y se sometieron simultáneamente a 60 mV por hasta 40 minutos. Luego, el gel de agarosa se visualizó y generó una imagen con un Transiluminador Vis-Blue™.

Cultivo de células.

35 La línea celular tubular proximal renal derivada de humanos HKC8, la línea celular COS7 de riñón de mono verde americano, la línea celular de tejido embrionario de ratón albino suizo 3T3, las células estromales derivadas de adiposo de rata rADSC y los astrocitos Neu7, la línea celular de cáncer cervical humano HeLa (Invitrogen) se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina (PIS). El colágeno tipo VII nulo-RD EB queratinocitos-RDEB-T línea celular A4 RDEBK amablemente proporcionada por el Dr. F. Larcher (Madrid, España) se cultivó en medio de crecimiento de queratinocitos 2 (pROMOCELL c-20011) con 5% de FBS y 1% de P/S. La línea de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano hADSC (Invitrogen) se mantuvo en medio MesenPRO RSTM con medio basal, suplemento de crecimiento y 1% de P/S. El neuroblastoma SH SY5Y y los astrocitos primarios se cultivaron en 50% DMEM 150% F12 Ham que contenía 10% de FBS y 1% de P/S, los queratinocitos humanos normales NHK y los queratinocitos de epidermolisis ampollosa distrófica recesiva RDEBK se cultivaron en medio de crecimiento de Queratinocitos 2 (c-20011 pROMOCELL) con PIS al 1%, la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2 se cultivó en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS y 1% de P/S. Todas las células se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂, en una incubadora húmeda utilizando técnicas estándar de cultivo celular.

Transfección in vitro y citotoxicidad.

45 Para las transfecciones in vitro utilizando ADN de Gluciferasa, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en medio de 100 μL y se cultivaron hasta una confluencia del 70-80%. Las células madre rADSC, hADSC utilizadas para la transfección estaban por debajo del pasaje cuatro, mientras que los astrocitos primarios y SH-SY5Y utilizados para la transfección estaban por debajo del pasaje cinco. Antes de la transfección, los políplexes se prepararon en consecuencia, se usaron 0.25 μg de ADN por pocillo para las células primarias y las células madre y 0.5 μg de ADN por pocillo para todas las demás células. Se usaron relaciones en peso de polímero/ADN (p/p) de 5:1, 10:1 y 15:1. Para los reactivos de transfección comerciales, se usó PEI en una proporción p/p de 4:1 y se usó SuperFect de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, LPAE y HPAEs se disolvieron inicialmente en DMSO a soluciones madre de 100 mg/ml, luego de acuerdo con la relación p/p y finalmente, las soluciones madre se diluyeron adicionalmente con regulador de acetato de sodio. El ADN se diluyó a 0.1 mg/ml con

regulador de acetato de sodio. Las soluciones de LPAE o HPAE se agregaron a la solución de ADN, se agitaron en vórtex durante 10-15 segundos y se dejaron reposar durante 10-15 minutos. Luego se añadieron los medios de cultivo celular para aumentar el volumen de la solución de poliplex a 100 μ L. Los medios en los pocillos de las placas de cultivo celular se eliminaron rápidamente y se añadió la solución de polipéptidos. Después de 4 horas, el medio se reemplazó con 100 μ L de medio nuevo y las células se cultivaron durante otras 44 horas. Las células de control se sometieron al mismo tratamiento menos la adición de poliplexes y también se realizaron controles comparativos para los reactivos de transfección comerciales Superfect y PEI. El análisis de la actividad de Gluciferasa secretada se realizó de acuerdo con el protocolo proporcionado, con la actividad de Gluciferasa detectada directamente en el sobrenadante celular y representada en términos de unidades de luz relativas (RLU). El análisis de citotoxicidad se realizó en todas las células utilizando el método de reducción de Alamarblue. Para realizar este ensayo, los sobrenadantes celulares se eliminaron inicialmente y luego las células se lavaron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) seguido de la adición de Alamarblue al 10% en HBSS. Las células vivas y en proliferación mantienen un ambiente reductor dentro del citosol de la célula que actúa para reducir el ingrediente activo no fluorescente (resazurina) en Alamarblue, al compuesto altamente fluorescente, la resorufina. Esta reducción provoca un cambio de color de azul a rojo claro y permite la medición cuantitativa de la viabilidad celular basada en el aumento de la fluorescencia general y el color de los medios. La solución de Alamarblue de cada pocillo se transfirió a una placa fresca de fondo plano de 96 pocillos para mediciones de fluorescencia a 590 nm. Las células de control no tratadas con poliplexes se usaron para normalizar los valores de fluorescencia, y se representaron como 100% viables. Todos los experimentos de reducción de Gluciferasa y Alamarblue se realizaron por cuadruplicado con un margen de error que se muestra como \pm la desviación estándar (SD). Para las transfecciones in vitro utilizando ADN de GFP, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en medio de 500 μ L. Las transfecciones se realizaron como se mencionó anteriormente, pero se usó 1 μ g de ADN por pocillo para las células primarias y las células madre, mientras que se usaron 2 μ g de ADN por pocillo para las otras células. Para las mediciones de citometría de flujo, después de la transfección, las células se recolectaron de acuerdo con los protocolos estándar de cultivo celular y se usó yoduro de propidio para excluir las células muertas con al menos 8,000 células representadas. Para visualizar las células transfectadas con un microscopio de fluorescencia, 48 horas después de la transfección, se retiraron los medios y las células se lavaron en HBSS tres veces y luego se visualizaron bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus IX81).

Evaluación de poliplexes de HP AE/ADN.

Para los ensayos de electroforesis en gel de agarosa, se usó 1 μ g de ADN para cada preparación de muestra. El ADN se diluyó a 0.2 μ g/ μ L en regulador de acetato de sodio (pH 5.2 ± 0.1 , 0.025 M). Los HPAE se disolvieron inicialmente en DMSO para producir soluciones madre de 100 mg/ml. Con base en la relación p/p, los HPAE se diluyeron adicionalmente a 5 μ L en regulador de acetato de sodio y luego se añadieron a la solución de ADN de 5 μ L, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar durante 10 minutos. Se agregaron 2 μ L de colorante de carga a cada solución de poliplex antes de cargarse en los pocillos de gel (agarosa al 1% en Tris-Acetate-EDTA con tinción de ADN SYBR® Safe, pH 8.3). Los geles se procesaron durante 40 minutos a 60 mV. Se obtuvieron imágenes de geles de agarosa con un Transiluminador Vis-Blue™. Para evaluar el tamaño de poliplex, los HPAEs se disolvieron en DMSO para dar como resultado soluciones madre de 100 mg/ml. Se diluyeron 2 μ g de ADN en 10 μ L de regulador de acetato de sodio. De acuerdo con la relación en peso de HPAE/ADN (p/p), la solución madre de HPAE se diluyó a 10 μ L con regulador de acetato de sodio, se añadió a la solución de ADN, se agitó en vórtex durante 10 segundos y luego se dejó reposar durante 10 minutos. Los poliplexes se diluyeron con DMEM que contenía FBS al 10% y se utilizó un Zetasizer de Malvern Instruments (Nano-2590) con un ángulo de dispersión de 90 grados para la determinación del tamaño de poliplex. El tamaño se determinó de nuevo nuevamente después de 4 horas de incubación. Todos los experimentos se repitieron un mínimo de cuatro veces.

Ensayo de transferencia Western

Se sembraron células RDEBK en un matraz T1 75 24 horas antes de la transfección. Los poliplexes de HPAE/DNA (60 μ g de DNA) se prepararon como se mencionó anteriormente y se agregaron a las células. Después de 48 horas, el sobrenadante se recogió, se concentró y se desnaturizó siguiendo protocolos estándar. La solución de proteína se cargó en el gel SDS-PAGE (6%) y se ejecutó a 130 V durante 70 minutos seguido de 100 V durante 15 minutos. A continuación, la muestra de proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 1 hora. El bloqueo de membrana se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente usando regulador TBSA BSA al 5%. La incubación de la muestra de proteína se realizó durante la noche a 4 °C en anticuerpo primario (anticuerpo de colágeno VII) diluido en regulador de bloqueo al 5%. La membrana se lavó tres veces en TBST (5 minutos cada una). Después de los lavados, la muestra de proteína se incubó con anticuerpo secundario (HRP anti-conejo) en regulador de bloqueo al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó tres veces en TBST. Las imágenes se recopilaron utilizando técnicas estándar de desarrollo de cuarto oscuro para quimioluminiscencia.

Análisis estadístico

Todos los datos expresados como promedio \pm SD, con SD representado por barras de error. Las comparaciones estadísticas entre el control y los grupos tratados se realizaron mediante pruebas T de Student. Se calcularon valores promedio y desviaciones estándar para cada muestra examinada de al menos cuatro experimentos independientes. Los niveles de significación estadística se establecieron en $P < 0.05$ (*), 0.01 (**) y 0.001 (***).

Resultados

Síntesis de copolímero:

El poli(β -aminoéster) hiperramificado (HPAE) se sintetizó con éxito usando la reacción de adición de Michael.

Caracterización compleja:

- 5 Dos de los factores más importantes que afectan la absorción compleja por las células son su carga catiónica y tamaño hidrodinámico. El potencial ζ y el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas se determinaron utilizando un equipo de medición multimodo que utiliza las propiedades de carga y DLS de las partículas coloidales para determinar el tamaño y el potencial de las partículas, respectivamente. (figura 3).

Complejación de polímero/ADN:

- 10 La capacidad del polímero para complejar el ADN del plásmido Gaussia Luciferase (GLuc) se evaluó mediante electroforesis en gel. Se prepararon soluciones de polímero/plásmido en regulador de acetato de sodio (pH = 5.2, 0.025 M) a diversas relaciones en peso añadiendo 1 μ g de GLuc a concentraciones variables de polímero. Estos se dejaron durante 10 minutos para formar complejos antes del análisis. Se preparó un gel de agarosa (agarosa al 1% en regulador Tris-borato-EDT A (TBE); con tinción de ADN SYBR@Safe) para todos los polímeros analizados.
- 15 Se añadieron 10 μ l de cada solución de polímero/plásmido (concentración de ADN de 100 μ g ml⁻¹) junto con 2 μ l de colorante de carga a cada pocillo y se sometieron simultáneamente a 120 m V durante hasta 40 minutos (Figura 4).

Viabilidad celular:

Los estudios de viabilidad celular para HPAE muestran una citotoxicidad más baja en la mayoría de los tipos de células en comparación con los vectores de polímeros comerciales actuales.

- 20 Transfección Celular:

El análisis de la actividad de expresión de luciferasa de HPAE demostró la capacidad del polímero para administrar y liberar ADN de manera eficiente en la célula. Los resultados de la expresión de luciferasa de Gaussia indican que HPAE es capaz de transfectar eficientemente Bela, queratinocitos nulos de colágeno tipo VII (RDEBK) y células madre derivadas de tejido adiposo humano (ADSC).

- 25 Expresión de pGFP después de la transfección

La expresión de pGFP en células Hela transfectadas (A) y células RDEBK (B) se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia.

- 30 En conclusión, se desarrolló HPAE multifuncional bien definido y utilizado como vectores de administración de genes no virales a través de la reacción de adición de Michael. La investigación sistemática de la HPAE sintetizada en tres tipos diferentes de células indica que la estructura hiperramificada desempeña un papel fundamental para lograr una alta capacidad de transfección y una citotoxicidad reducida. Al adaptar la composición y la estructura, HPAE puede lograr una eficiencia de transfección ultra alta y al mismo tiempo mostrar una citotoxicidad muy baja, particularmente en las líneas celulares de queratinocitos. HPAE es vectores de administración de genes mucho más eficientes y seguros en comparación con los reactivos de transfección comerciales Superfect, PEI, Xfect y Lipofectamine 2000. La prueba de concepto HPAE establece un nuevo punto de referencia en la capacidad de administración de genes y puede proporcionar las primeras pautas para el desarrollo de altos vectores de rendimiento de administración de genes no virales.

Análisis de estructura química por ¹H RMN

- 40 Como se muestra en la figura 1, espectro de ¹H RMN de HPAE (en CDCl₃, 300 MHz), los picos de señal de "X" se asignan a solventes residuales de DMSO (aproximadamente 2.5 ppm) y éter dietílico (aproximadamente 1.2 ppm y 3.4 ppm).

Mediciones de peso molecular por GPC

- 45 La Figura 2 muestra trazas de GPC de HP AE antes y después de la protección en el extremo con MPA, DMF como eluyente, 50 grados, 1 ml/min. Al realizar las pruebas de GPC para medir el peso molecular de HPAE, DMF era como eluyente, las mediciones se llevaron a cabo a 50 grados, la tasa de flujo del eluyente fue de 1 ml/min. Se midió el peso molecular de HPAE antes del cierre final con MPA y después del cierre final con MPA, respectivamente.

Análisis de tamaño y potencial zeta por dispersión dinámica de luz (DLS)

Los poliplexes HPAE/ADN tienen un diámetro de hidratación de aproximadamente 75 nm y un potencial zeta de aproximadamente +24 mV, como se muestra en la figura 3.

- 50 Capacidad de condensación de ADN evaluada por electroforesis en gel de agarosa

HPAE puede condensar el ADN de manera efectiva bajo una relación p/p que varía de 10: 1 a 30: 1 (véase figura 4).

Citotoxicidad de HP AE sobre diferentes tipos de células evaluadas mediante ensayos de AlamarBlue

Para los tres tipos de células analizadas, HPAE/DNA puede preservar al menos el 80% de la viabilidad celular después de la transfección durante 48 h con una relación p/p de 30:1, placas de 96 pocillos, 0.5 µg de ADN por pocillo (véase figura 5).

Evaluación de la eficacia de la transfección in vitro con expresión de Gluciferasa y GFP

Como se muestra en la figura 6, los tres tipos de células exhibieron una actividad de Gluciferasa muy alta después de la transfección con polipéptidos HPAE/ADN durante 48 h bajo condiciones de suero. Además, como se muestra en la figura 7, los tres tipos de células exhibieron una expresión muy alta de proteína verde fluorescente (GFP) después de transfectarse con poliplexes de HPAE/ADN durante 48 h bajo condiciones de suero.

Diseño y síntesis de HPAEs

El 4-amino-1-butanol (monómero tipo S4, A2), el triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA, monómero tipo B3) y el diacrilato de etoxilato de bisfenol A (monómero tipo BE, C2) se copolimerizaron mediante una adición de Michael tipo "A2 + B3 + C2" de un recipiente (Figura 8). Para evaluar sistemáticamente los efectos de diferentes componentes de monómeros en las 30 arquitecturas y funcionalidades de los HP AEs, las proporciones de alimentación de TMPTA a BE variaron secuencialmente. Luego, se introdujo la 3-morfolinopropilamina funcional (MPA) mediante la protección en el extremo para mejorar adicionalmente la propiedad y funcionalidades de HPAEs como vectores génicos. Para comparar los efectos de diferentes estructuras en el rendimiento de poli(β-aminoéster)s, también se sintetizó la contraparte lineal, LPAE. Se usó cromatografía de permeación en gel (GPC) para controlar el crecimiento de los polímeros base durante la polimerización. En resumen, el aumento de la relación de alimentación de TMPTA a BE dio como resultado un aumento aún más rápido del peso molecular del polímero base, lo que significa que se combinaron más oligómeros a través de las unidades de ramificación. Las composiciones de la unidad de monómero en los polímeros base se verificaron adicionalmente mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (1HRMN y 13CRMN, Figura 11, 12 y 13). Las relaciones de alimentación indicaron que había un exceso de grupos vinilo en comparación con los grupos amino (Tabla S1), por lo tanto, había múltiples grupos vinilo sin reaccionar en los polímeros base (alrededor de 6.0 ppm). A medida que aumentaba la relación de alimentación de TMPTA a BE, correspondientemente aumentaba la cantidad de grupos vinilo residuales en el polímero base (Figura 11). Los grupos de vinilo múltiples existentes se modificaron adicionalmente con MPA funcional mediante una protección en el extremo. Consistentemente, después de la purificación, se gastaron todos los grupos vinilo en los polímeros base y se introdujeron múltiples grupos morfolino (Figura 9a). Los datos de GPC confirmaron que todos los HPAE tenían un peso molecular similar (Mw fue de aproximadamente 12,000, Figura 9b) y PDI (aproximadamente 2.2), lo que demuestra que incluso a altas concentraciones de monómero (500 mg/mL) y temperatura de reacción (90 °C) con una relación de alimentación de monómero de alta ramificación (TMPTA), la polimerización aún puede controlarse bien sin gelificación mediante la metodología de adición Michael "A2+B3+C2" de un recipiente. El valor alfa (α) de la gráfica de Mark-Houwink (MH) de todos los HPAE fue inferior a 0.5, lo que indica que eran estructuras típicas altamente ramificadas (Figura 9c). Además, a medida que aumentó la relación de alimentación de TMPTA a BE, el valor disminuyó de 0.48 para HPAE-1 a 0.31 para HPAE-10, lo que también demuestra que a través de la metodología "A2+B3+C2", la estructura ramificada de los polímeros puede ser fácilmente ajustada simplemente variando la relación de alimentación de B3 a C2. La relación de alimentación de monómero detallada, la composición del polímero y la información estructural se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de alimentación de monómero, composición de polímero e información estructural de HPAEs.

	Relación de alimentación		Composición			
	[TMPTA]:[BE] ^a	[TMPTA]:[BE] ^b	M _w (Da) ^c	M _n (Da) ^c	PDI ^c	Alfa ^d
LPAE	0:1	0:1	9,771	5,820	1.6	0.65
HPAE-1	0.3:1	0.4:1	10,569	4,967	2.1	0.48
HPAE-2	0.6:1	0.9:1	11,636	5,186	2.2	0.44
HPAE-3	0.9:1	1.2:1	12,264	5,449	2.2	0.41
HPAE-4	1.2:1	1.5:1	11,155	4,882	2.2	0.40
HPAE-5	1.5:1	1.9:1	10,044	4,870	2.0	0.39
HPAE-6	1.8:1	2.4:1	12,497	5,044	2.4	0.36
HPAE-7	2.1:1	3.1:1	9,664	4,665	2.0	0.36
HPAE-8	2.4:1	3.4:1	11,221	5,129	2.1	0.34
HPAE-9	2.7:1	3.6:1	14,278	5,519	2.5	0.33
HPAE-10	3:1	4.1:1	12,426	5,341	2.3	0.31

a. Condición de reacción: DMSO como solvente, 90 °C, concentración de monómero: para LPAE, polimerización voluminoso, para HPAEs, 500 mg/mL; Protección en el extremo. 0.2 mM, TA

b. Calculado a partir de espectros de ¹H RMN

c. Determinado mediante detector R¹

d. Determinado mediante detector VS DP

5 Ventajosamente, los poli-beta aminoésteres de la presente invención tienen un parámetro alfa derivado de la ecuación de Mark-Houwink de menos de 0.5, por ejemplo de 0.3 a 0.5. Esto indica que los triacrilatos se copolimerizaron con las aminas y los diacrilatos simultáneamente, los ésteres de poli-beta amino tienen una densidad de grupo funcional más alta y una arquitectura tridimensional, y que los ésteres de poli-beta amino de la presente invención están altamente ramificados.

Tabla S1. Relaciones de alimentación de monómeros para la síntesis de LPAE y HPAEs

	TMPTA:BE	TMPTA ¹ (μ L)	BE ¹ (μ L)	S4 ¹ (μ L)	MPA (μ L)	DMSO ² (mL)
LPAE	0:1	0	562	89	146	8.0
HPAE-1	0.3:1	148	776	178	146	6.3
HPAE-2	0.6:1	224	590	178	146	5.9
HPAE-3	0.9:1	272	478	178	146	5.6
HPAE-4	1.2:1	302	394	178	146	5.4
HPAE-5	1.5:1	326	346	178	146	5.2
HPAE-6	1.8:1	346	300	178	146	5.1
HPAE-7	2.1:1	362	272	178	146	5.1
HPAE-8	2.4:1	372	244	178	146	5.0
HPAE-9	2.7:1	380	224	178	146	5.0
HPAE-10	3:1	384	206	178	146	4.9

1. Para la síntesis de HPAE, los monómeros: TMPTA, BE y S4 se predisolvieron en DMSO a 500 mg/mL.

2. Volumen de DMSO usado para diluir los polímeros base antes de la protección en el extremo con MPA

Interacción de HPAEs con ADN

5 La condensación de ADN por vectores de administración de genes en poliplexes de tamaño nano es uno de los requisitos fundamentales para la administración eficiente de genes. Para evaluar la condensación de ADN y la formación de nanopoliplex, se utilizaron ensayos de electroforesis en gel de agarosa y dispersión dinámica de luz (DLS). Los resultados de la electroforesis en gel demostraron que no hubo desplazamiento de ADN de los pocillos en toda la relación de peso HPAE/ADN (p/p) que oscilaba entre 3:1 y 30:1; lo que significa la formación de poliplexes de HPAE/DNA y una fuerte unión de HPAE-DNA (Figura 14a), lo cual se debe a la excelente capacidad de protonación de las múltiples aminas terciarias en las cadenas principales de HPAE. Los resultados de DLS demostraron además la capacidad de condensación de ADN de los HPAE para formar poliplexes de tamaño nano (30-120 nm, Figura 14b). El tamaño diminuto de estos poliplexes es altamente aplicable; ya que los poliplexes más pequeños podrían penetrar las barreras biológicas con mayor facilidad. Tejido de la piel; La barrera hematoencefálica (BBB) y los nodos linfáticos son bien conocidos por ser difíciles de atravesar, destacando el amplio espectro de objetivos y aplicaciones que los HPAEs podrían explotarse en una variedad de tejidos. Además, los poliplexes de HPAE/DNA eran bastante estables porque no había agregación visible en presencia de suero (Figura 14c), lo que podría aumentar potencialmente la captación de poliplex en las células y una mayor eficiencia de transfección con gran importancia clínica para aplicaciones in vivo.

Evaluación de la potencia de transfección de HPAE in vitro

20 El objetivo de la investigación de vectores de suministro de genes no virales es predominantemente maximizar la eficiencia de la transfección mientras se minimiza el nivel de citotoxicidad al mismo tiempo. Sin embargo, en la práctica, las mejoras en la eficiencia de la transfección generalmente se hacen a expensas de la seguridad y viceversa. Como tal, el rendimiento de transfección de los vectores genéticos debe evaluarse meticulosamente antes de la aplicación final en un entorno clínico. La capacidad de transfección génica y la seguridad de los diez HPAEs con diferentes composiciones y estructuras se evaluaron en primer lugar y se compararon con las de LPAE in vitro en células HeLa, y se evaluaron mediante el ensayo de proteína secretada de *Gaussia luciferasa* (Gluciferasa) y el ensayo de Alamarblue. Los reactivos de transfección disponibles comercialmente SuperFect y PEI se usaron como controles positivos para proporcionar un punto de referencia para la comparación. La Figura 15 describe la actividad de Gluciferasa y la viabilidad de las células HeLa después de la transfección con diversos vectores. Los datos mostraron claramente que, en comparación con el LPAE, los diez HPAEs exhibieron una eficiencia de transfección notablemente más alta con un aumento de 12 a 2,400 veces en la actividad de Gluciferasa, al tiempo que mantuvieron la viabilidad celular por encima del 90%. En comparación con SuperFect y PEI, que están bien establecidos como vectores de alta eficiencia de transfección, la actividad de Gluciferasa de las células HeLa después de la transfección con HPAE-1,

HPAE-2, HPAE-3 y HPAE-4 todavía era sustancialmente 5 a 20 veces mayor. Estos resultados demuestran que la ramificación desempeña un papel crítico en la potencia de transfección de los poli(β -aminoésteres) y que al adaptar la estructura 3D junto con los múltiples grupos terminales funcionales, la eficiencia de transfección de los poli(β -aminoésteres) puede ser mejorada por varios órdenes de magnitud. Para verificar adicionalmente la alta potencia de HPAEs en la administración de genes, se probó sistemáticamente un amplio espectro de 12 tipos de células con diferentes fenotipos usando HPAE-2 y HPAE-4 sistemáticamente (Figura 10). En células epiteliales (HKC₈), fibroblastos (COS7 y 3T3), queratinocitos (NHK y RDEBK) y células cancerosas (HeLa, HepG2 y SHSY-5Y), tanto HPAE-2 como HPAE-4 mostraron una eficiencia de transfección superior, especialmente en la relación peso/peso 15:1. La actividad de Gluciferasa fue incluso mayor a 8,521 veces mayor en comparación con el LPAE bajo las mismas condiciones de transfección (Figura 10a). Es bien sabido que las células madre y los astrocitos se encuentran entre los tipos de células más desafiantes de transfectar utilizando vectores no virales. De hecho, en el ADSC de rata (rADSC), ADSC humano (hADSC), astrocitos Neu7 y astrocitos primarios, LPAE exhibió una eficiencia de transfección muy baja, y en general la actividad de Gluciferasa fue de 2 a 3 órdenes de magnitud menor que en las células inmortalizadas mencionadas anteriormente. En contraste, después de la transfección con HPAE-2 y HPAE-4, la actividad de Gluciferasa de las mismas células madre y astrocitos fue mucho mayor y comparable a las células inmortalizadas, lo que respalda la idea de que los HPAEs producen una alta potencia de transfección independientemente de los tipos de células. La capacidad de transfección superior de los HPAEs se cuantificó adicionalmente usando citometría de flujo a través de la expresión de GFP después de la transfección (Figura 16). En HKC₈, COS7, NHK, RDEBK, HeLa y rADSC, más del 75% de las células fueron positivas para GFP 48 horas después de la transfección - incluso hasta el 98% en HKC₈. Comparativamente, menos del 10% de las células fueron positivas para GFP después de la transfección por LPAE, excepto en RDEBK (35%) en la relación p/p de 15:1. De acuerdo con la expresión de Gluciferasa, incluso en los astrocitos primarios y hADSC más desafiantes, HPAE-2 y HPAE-4 mostraron todavía una alta eficiencia de transfección, con más del 35% de células efectivamente transfectadas. En un marcado contraste, el LP AE mostró una eficiencia de transfección insignificante (<6%) en estas células. Las imágenes de fluorescencia representativas de las células después de la transfección se muestran en la Figura 10b, con la eficiencia de transfección superior de HPAEs demostrada cualitativamente por la fuerte expresión de GFP. La alta eficiencia de transfección de HP AEs se confirmó adicionalmente mediante un ensayo de transferencia Western usando el plásmido pcDNA3.1COL7A1 que codifica la proteína de colágeno tipo VII (C7). Estos resultados indicaron que HPAE-4 puede administrar eficazmente pcDNA3.1COL7A1 en las celdas C7 nulas RDEBK y que se produjo proteína C7 significativa 48 horas después de la transfección (Figura10c). Tomados en conjunto, esto resalta la capacidad de los HPAEs para administrar un gen terapéutico para restaurar la expresión de proteínas funcionales. Todos los resultados de los ensayos de Gluciferasa, las mediciones de citometría de flujo y el ensayo de transferencia Western corroboran la idea de que la introducción de la ramificación puede mejorar significativamente la capacidad de transfección génica de los poli(β -aminoésteres), y que la ramificación es muy importante en la administración del gen de poli(β -aminoésteres). Es de destacar que los doce tipos de células transfectadas aquí provenían de diversos tejidos con diferentes fenotipos, por lo que el hecho de que los HPAEs mostraron una potencia de transfección superior en todos ellos sugiere un gran potencial para los HPAEs con implicaciones para uso en muchos objetivos clínicos.

Con respecto a la seguridad de la transfección, la Figura 17 muestra que ambos HPAE no exhibieron un nivel significativo de citotoxicidades y que pueden mantener una alta viabilidad celular incluso a una alta relación p/p en células madre y astrocitos. Por el contrario, el PEI era muy tóxico y la viabilidad de 3T3, hADSC, SH-SY5Y y la transfección primaria de astrocitos después de la transfección estaban por debajo del 50%. Estos resultados ilustran que la introducción de una estructura ramificada puede mejorar la capacidad de transfección de los poli(β -aminoésteres) pero no compromete la viabilidad celular.

Referencias

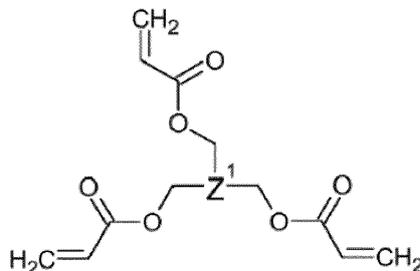
1. Green, J. J.; Langer, R.; Anderson, D. G., A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery. *Acc Chem Res* 2008, 41(6), 749-59.
 2. Eltoukhy, A.A.; Chen, D.; Alabi, C. A.; Langer, R.; Anderson, D. G., Deradable terpolymers with alkyl side chains demonstrate enhanced gene delivery potency and nanoparticle stability. *Adv. Mater* 2013, 25, 1487-93.
- Las palabras "comprende/que comprende" y las palabras "que tiene/que incluye" cuando se usan en este documento con referencia a la presente invención se usan para especificar la presencia de características, números enteros, etapas o componentes establecidos, pero no excluyen la presencia o adición de uno o más otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

REIVINDICACIONES

1. Un poli-beta aminoéster hecho por:

(a) haciendo reaccionar entre sí, mediante una reacción de adición de Michael, para formar un polímero P1:

(i) Un componente de triacrilato que tiene la fórmula (I)



(I)

5

en la que Z¹ es un andamio que consiste en:

una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, un heteroátomo lineal o ramificado que contiene cadenas de carbono de 1 a 30 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

10 en la que Z¹ no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O- alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en la que cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

15

(ii) Un componente de diacrilato que es diacrilato de etoxilato de bisfenol A; y

(iii) un componente de amina A1 que comprende de 3 a 20 átomos, en el que dicho componente de amina no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O- alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en el que cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

20

y

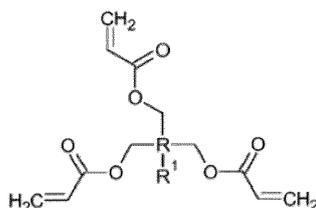
(b) hacer reaccionar el polímero P1 mediante una reacción de adición de Michael con un componente de amina A2 que comprende de 3 a 20 átomos, en el que dicho componente de amina no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O- alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆.

30

2. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un peso molecular en el rango de 3000 Da a 50,000 Da.

3. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de triacrilato tiene la fórmula:

35

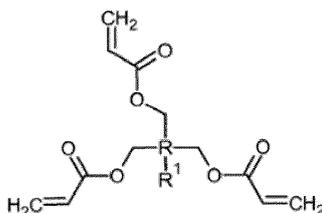


en la que R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono que contiene heteroátomo lineal o ramificado de 1 a 30 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

- 5 en la que R no está sustituido o está sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en la que cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y

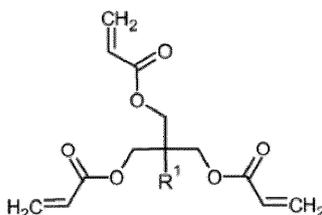
R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada no sustituida o sustituida de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono que contiene heteroátomo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos

4. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de triacrilato tiene la fórmula:



en la que R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono; y R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono.

5. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de triacrilato tiene la fórmula:

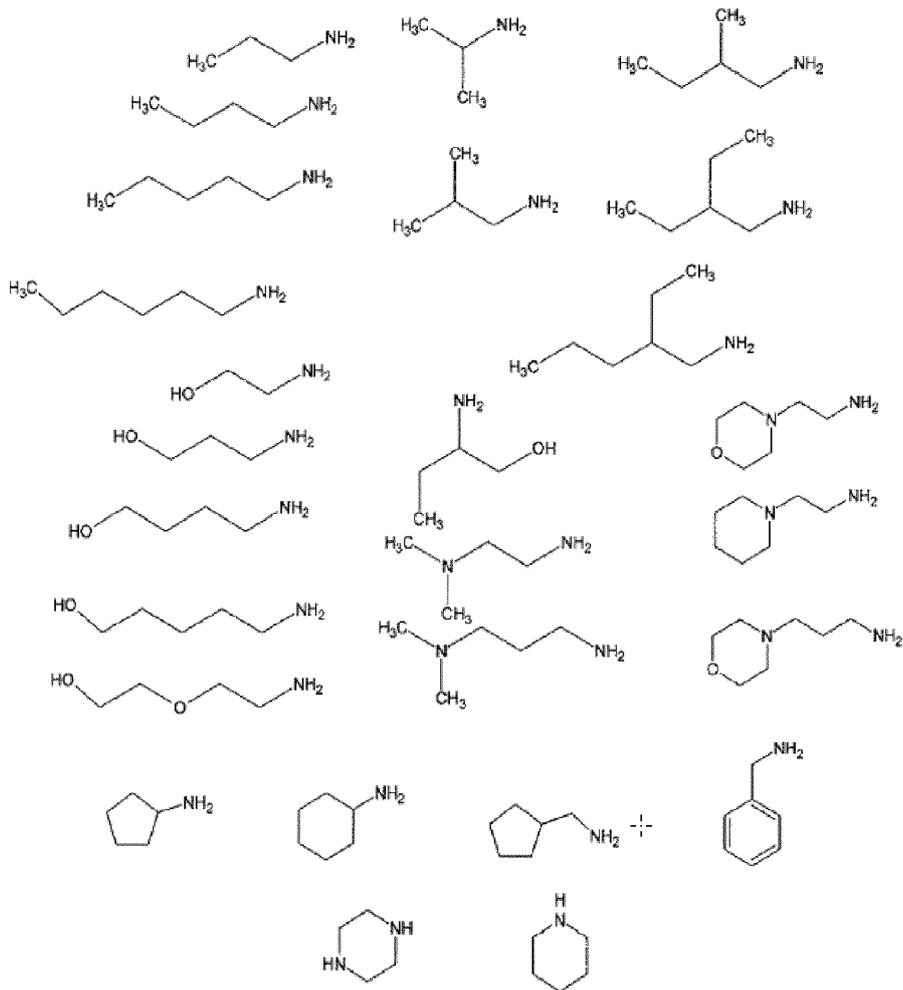


en la que R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, seleccionada del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo.

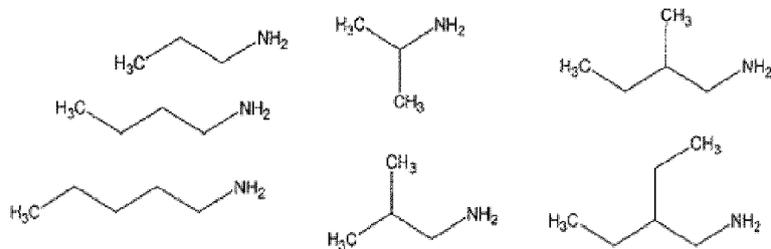
6. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de triacrilato se selecciona del grupo que consiste en triacrilato de trimetilolpropano, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de propoxilato de glicerol (1PO/OH), triacrilato de propoxilato de trimetilolpropano y triacrilato de propoxilato de pentaeritritol.

7. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el componente de amina A1 se selecciona del grupo que consiste en metilamina, etil amina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina y decilamina.

8. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el componente de amina A1 se selecciona del grupo que consiste en:



- 5 9. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de amina A2 es una alquilamina C₁-C₂₀; una cicloalquilamina C₂-C₂₀; una arilamina C₄-C₂₀ o una cicloalquilamina C₃-C₂₀; en donde la amina no está sustituida o está sustituida con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un halo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-C₁-alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆.
- 10 10. Un poli-beta aminoéster de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de amina A2 se selecciona del grupo que consiste en:



15

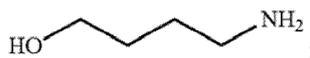
17. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen un polinucleótido y un poli-beta aminoéster de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

18. Una composición para uso en la transfección de una célula que comprende un componente de ácido nucleico y un componente del poli-beta aminoéster de acuerdo con la reivindicación 1.

5 19. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que:

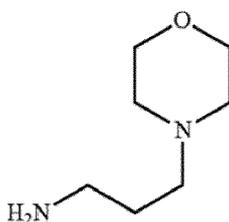
el triacrilato es triacrilato de trimetilolpropano;

la amina A1 es



y

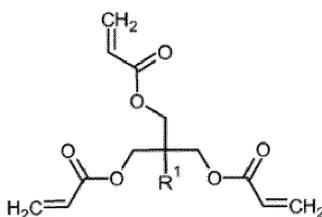
10 la amina A2 es



20. Un método in vitro para transfectar células que comprende poner en contacto células con una composición que comprende un agente de transfección no viral y un ácido nucleico; en el que dicho agente de transfección no viral es un poli-beta aminoéster hecho por:

15 (a) haciendo reaccionar entre sí, mediante una reacción de adición de Michael, para formar un polímero P1:

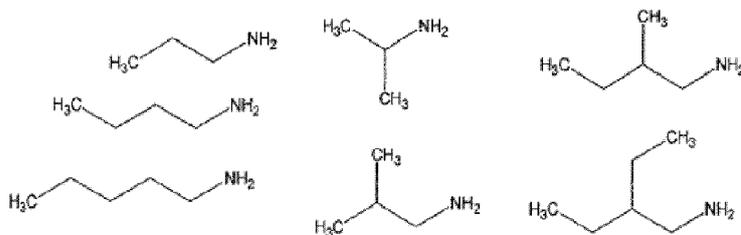
(i) un componente de triacrilato que tiene la fórmula:

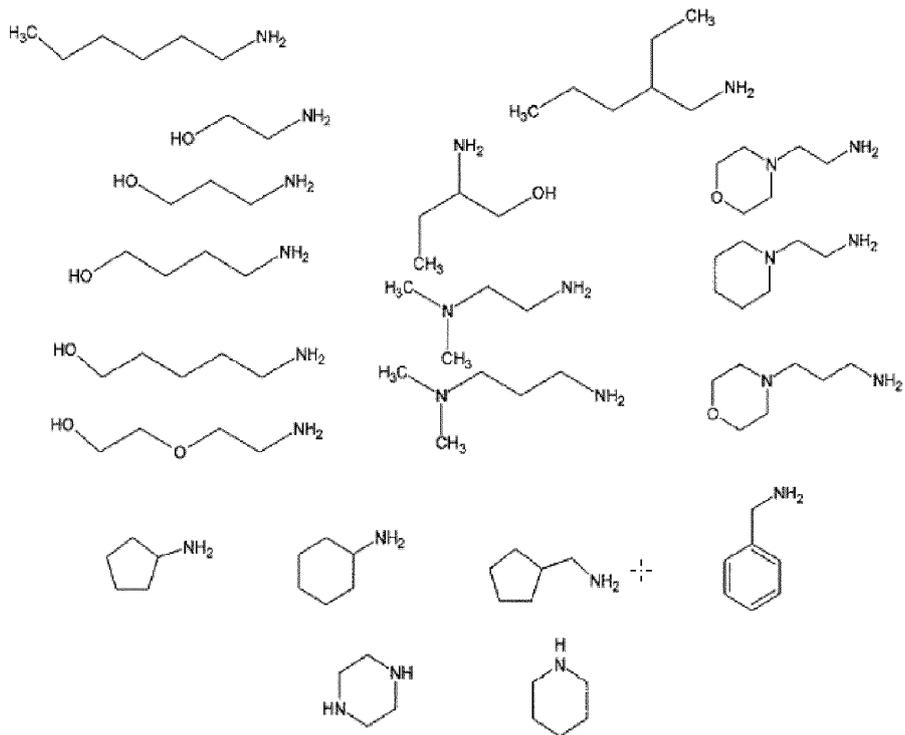


en la que R¹ es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, seleccionada del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo;

20 (ii) un componente de diacrilato que es diacrilato de etoxilato de bisfenol A; y

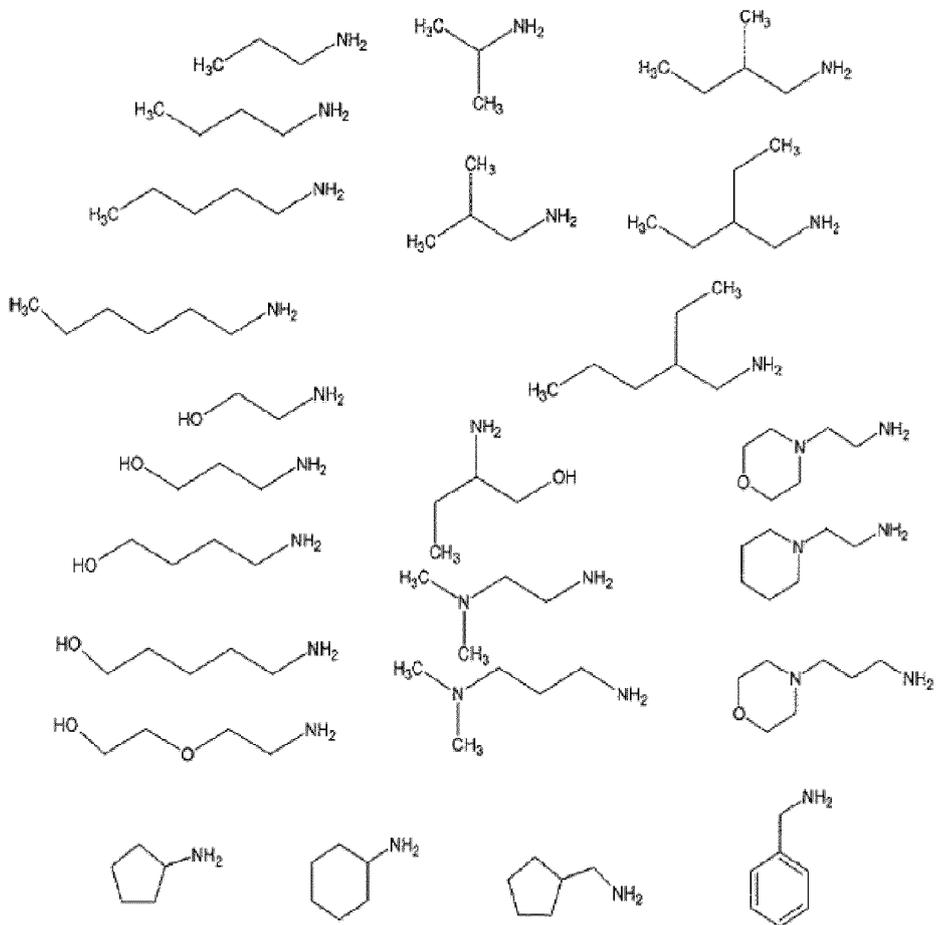
(iii) un componente de amina A1 seleccionado del grupo que consiste en metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina, decilamina; o:

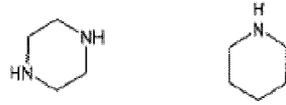




y

- 5 (b) hacer reaccionar el polímero P1 mediante una reacción de adición de Michael con un componente de amina A2; en donde A2 se selecciona del grupo que consiste en:



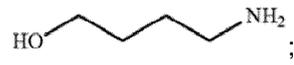


21. El método de la reivindicación 20, en el que:

el triacrilato es triacrilato de trimetilolpropano;

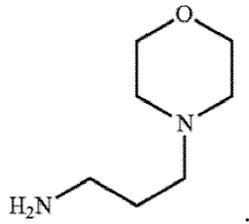
la amina A1 es

5



y

la amina A2 es



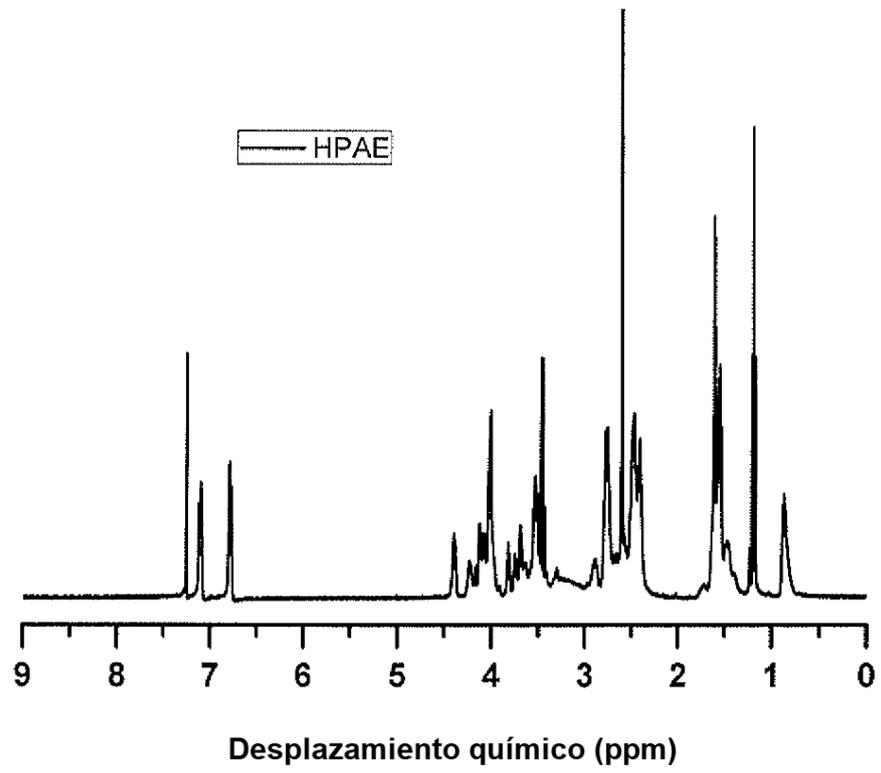


Figura 1

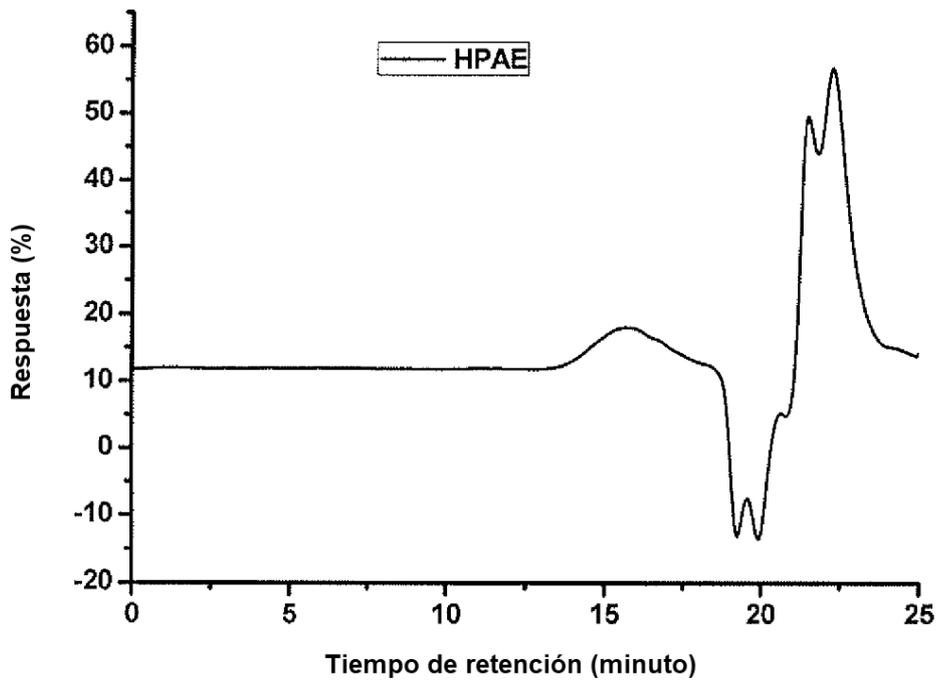


Figura 2

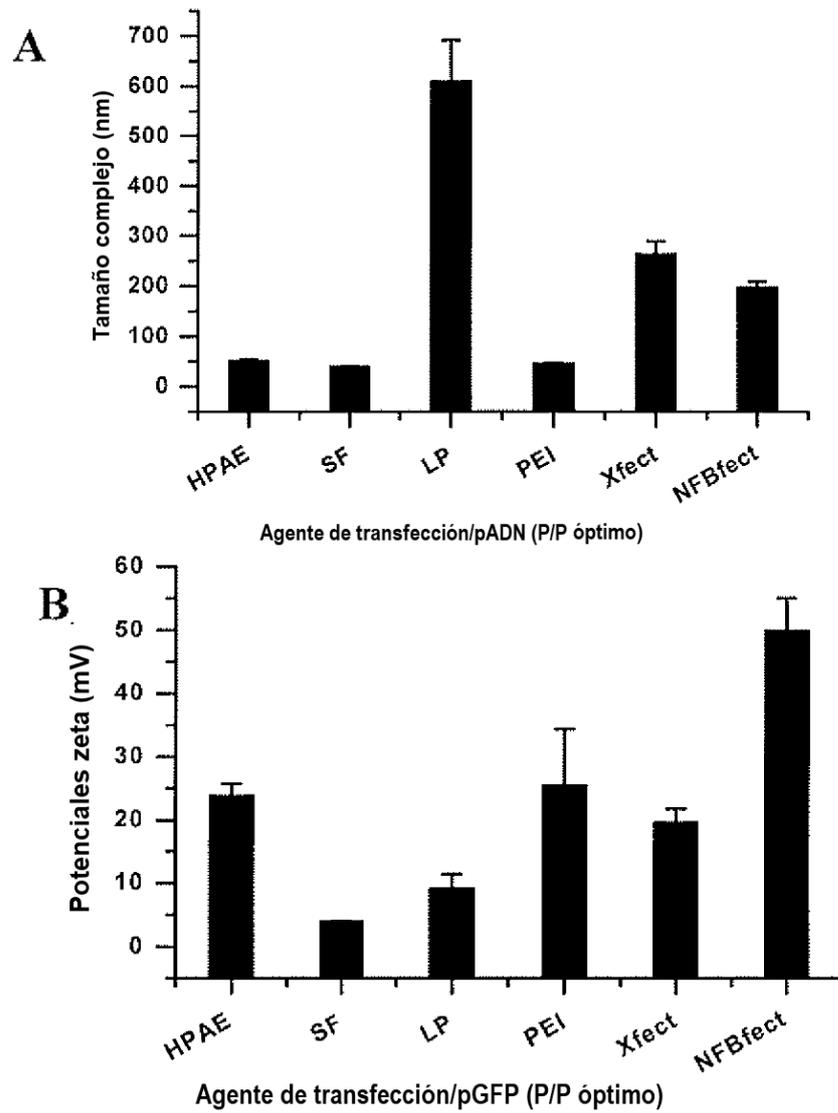


Figura 3

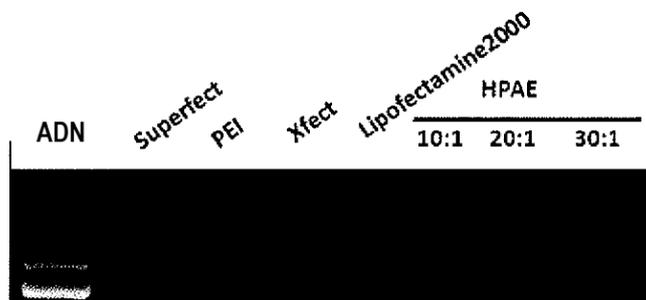


Figura 4

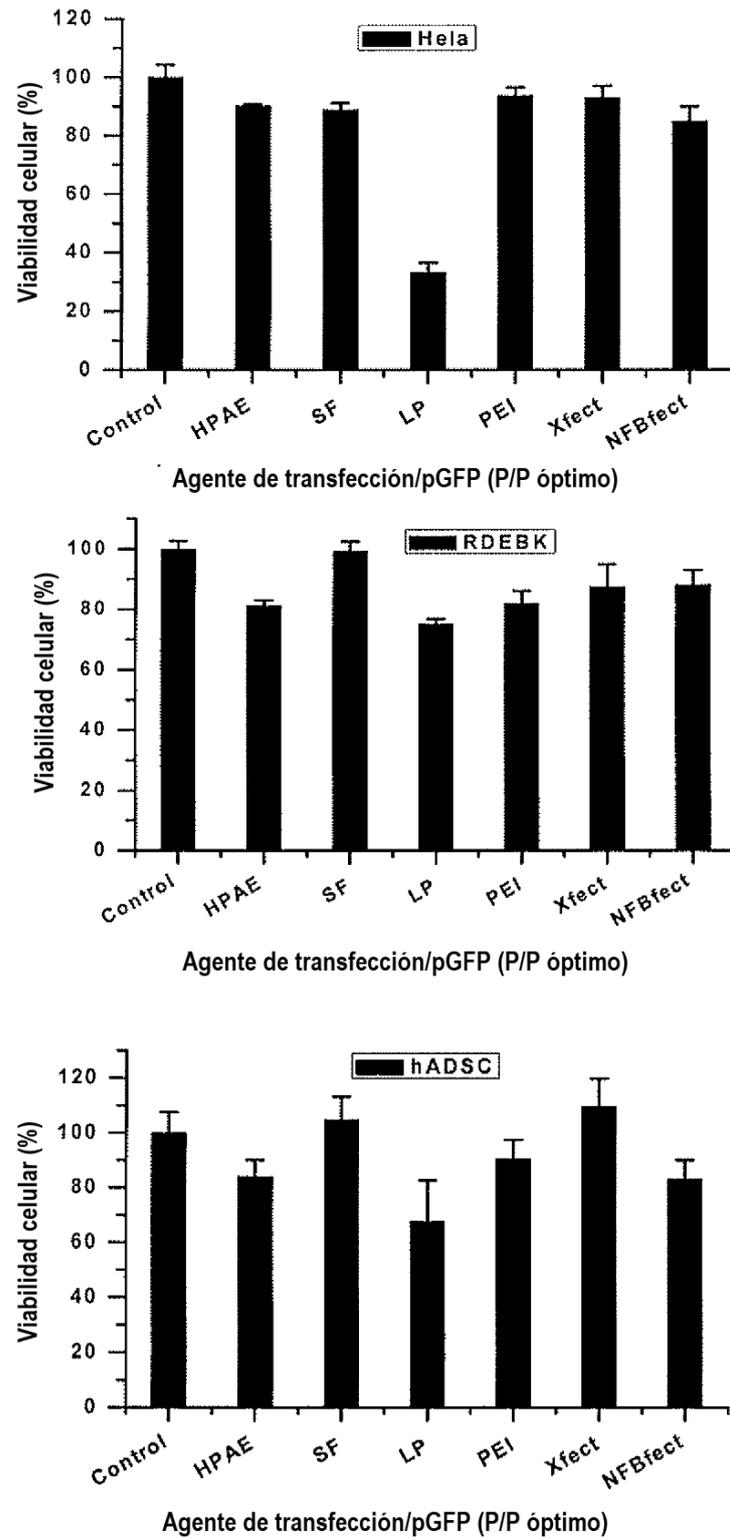
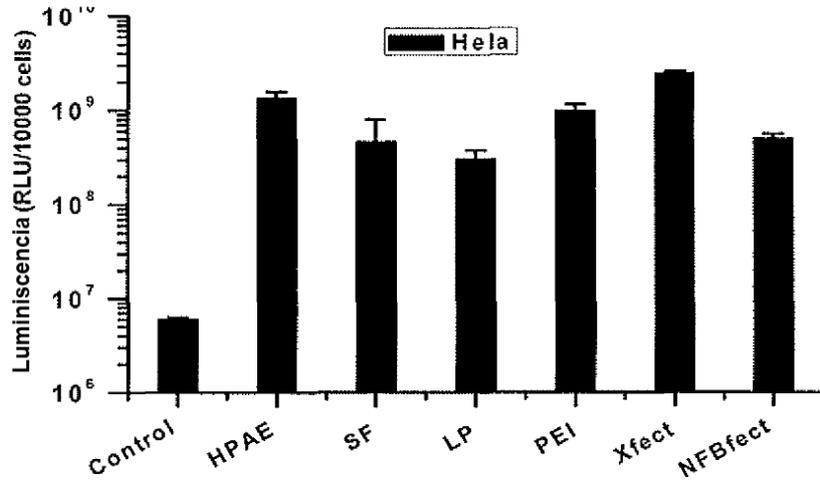
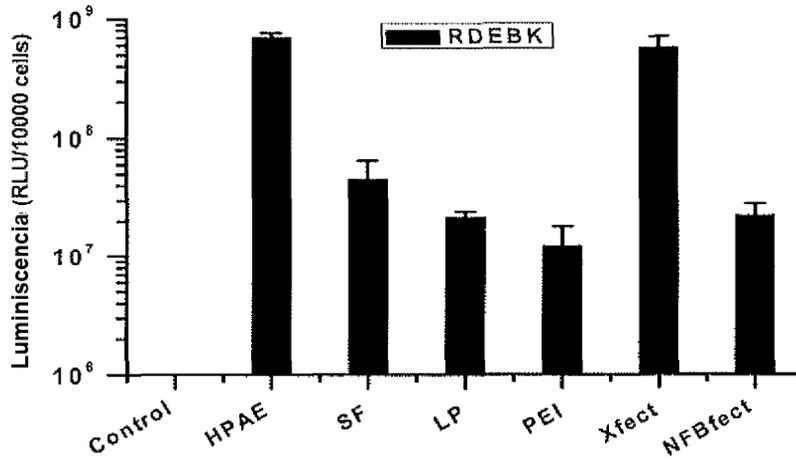


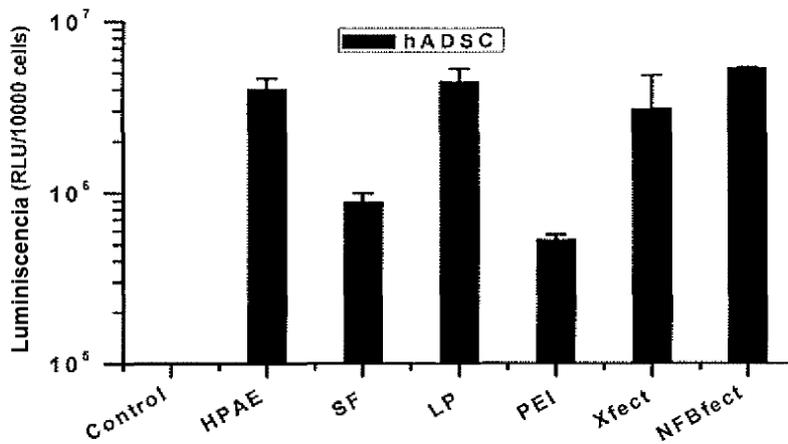
Figura 5



Agente de transfección/pGFP (P/P óptimo)



Agente de transfección/pGFP (P/P óptimo)



Agente de transfección/pGFP (P/P óptimo)

Figura 6

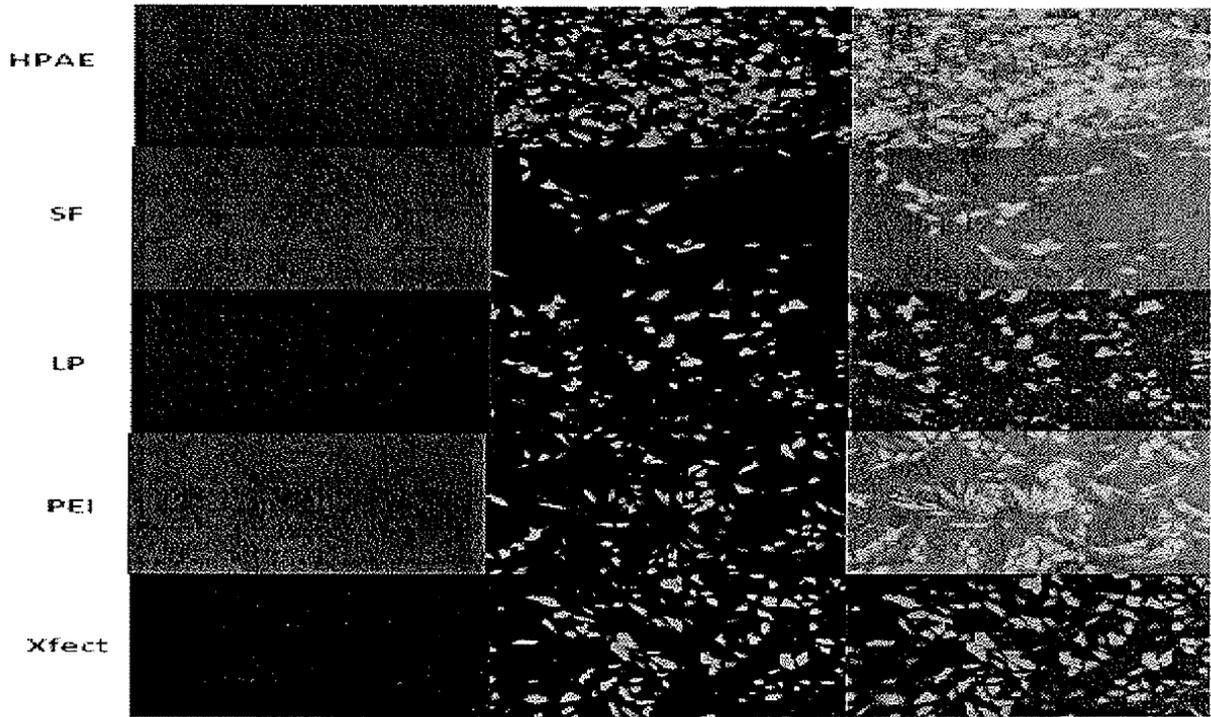


Figura 7A

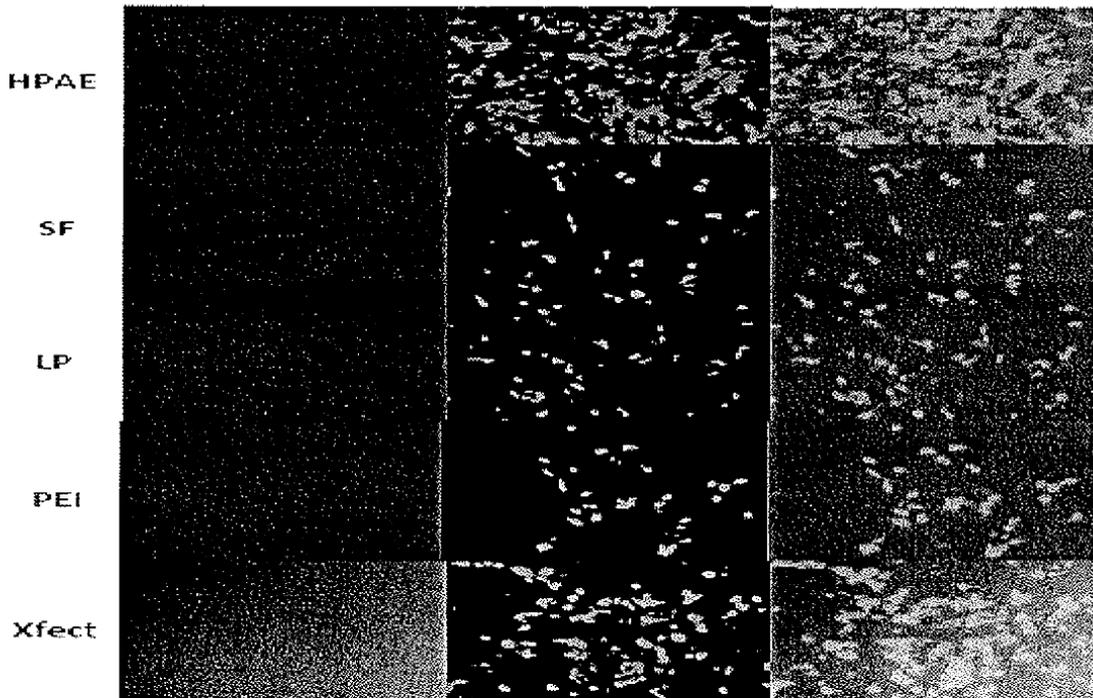


Figura 7B

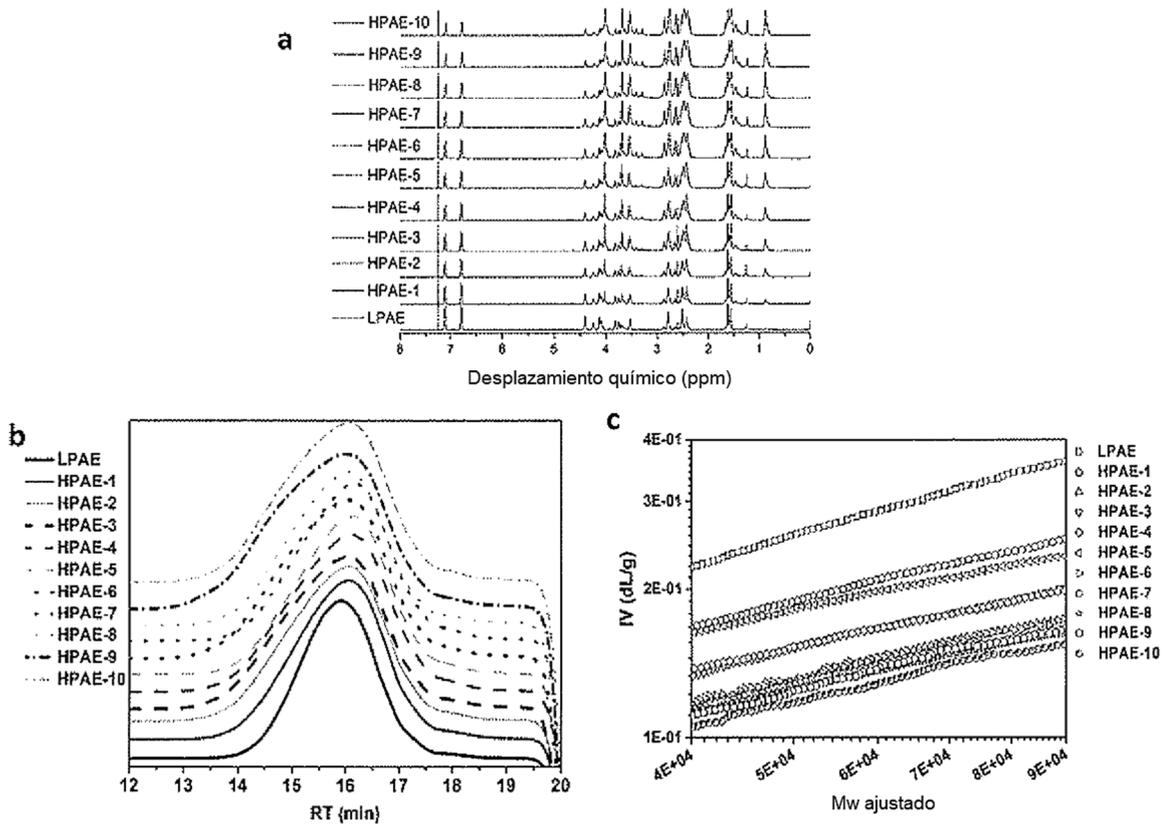


Figura 9

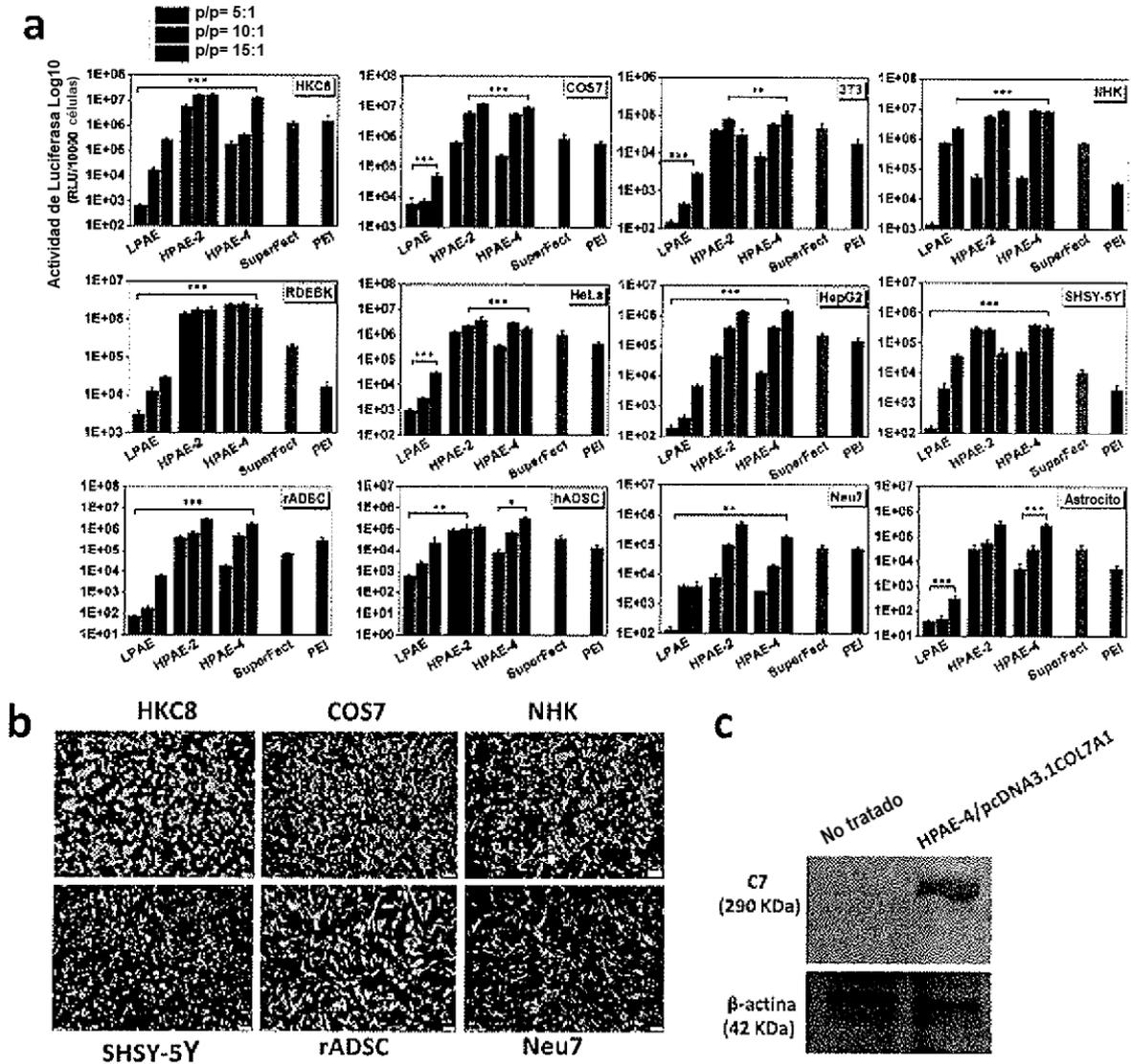


Figura 10

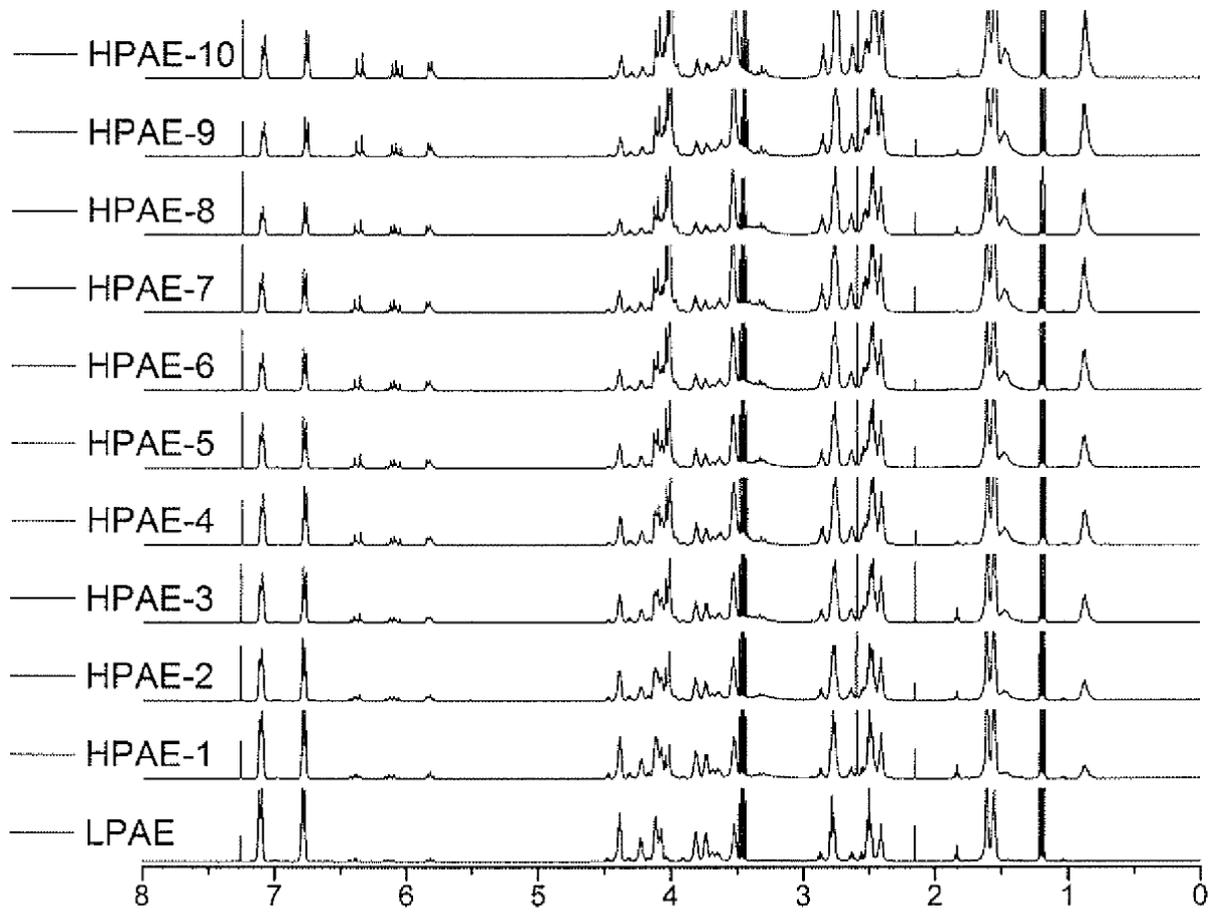


Figura 11

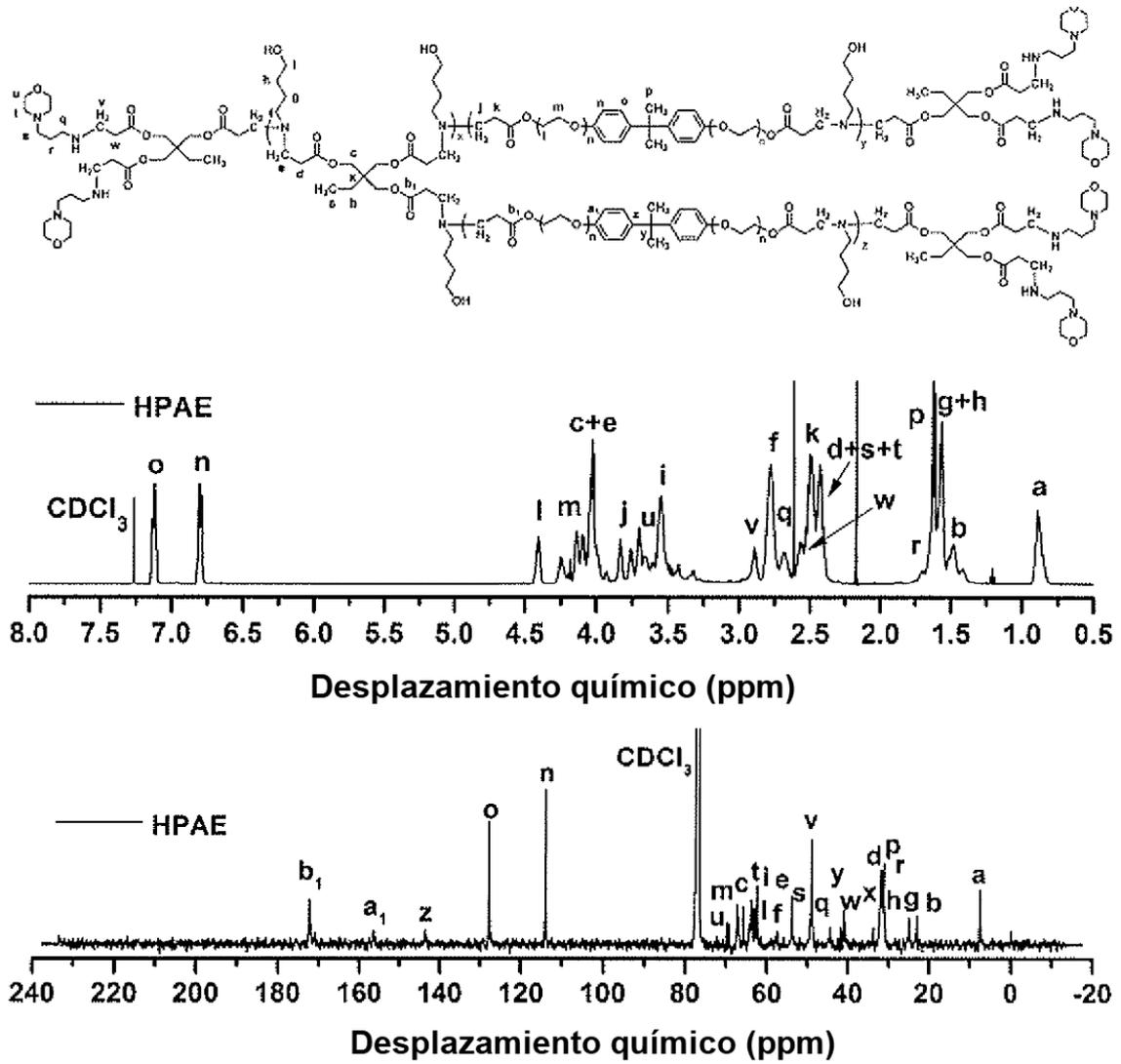


Figura 12

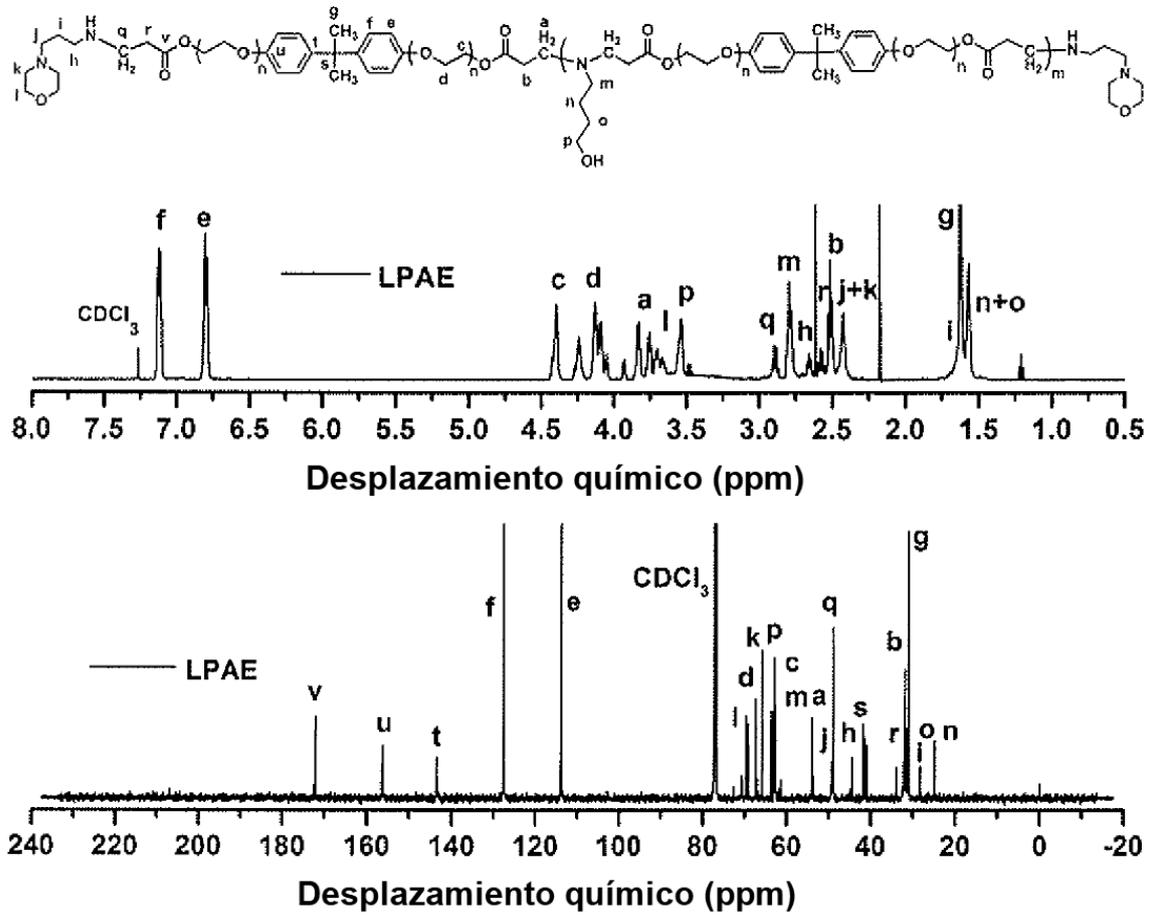


Figura 13

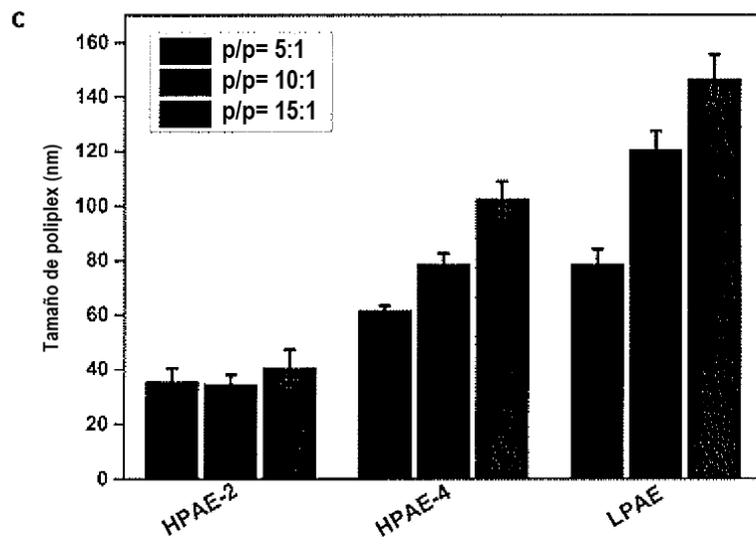
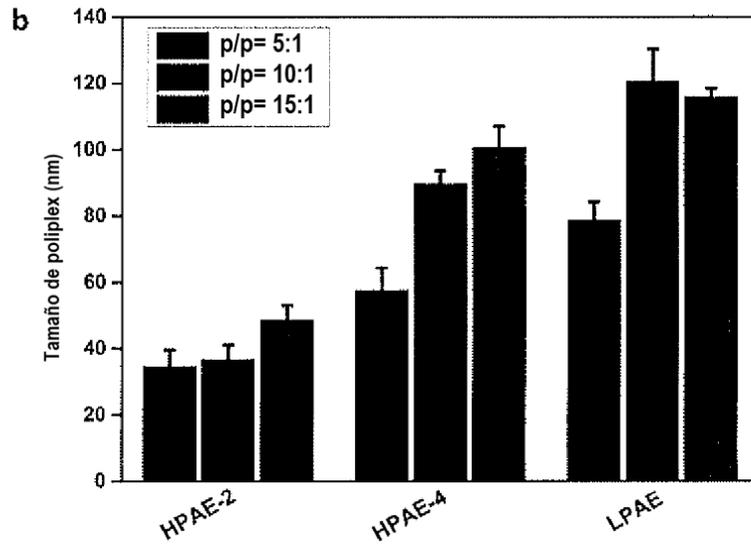
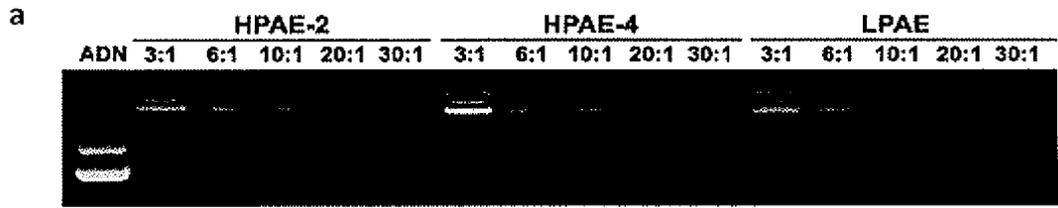


Figura 14

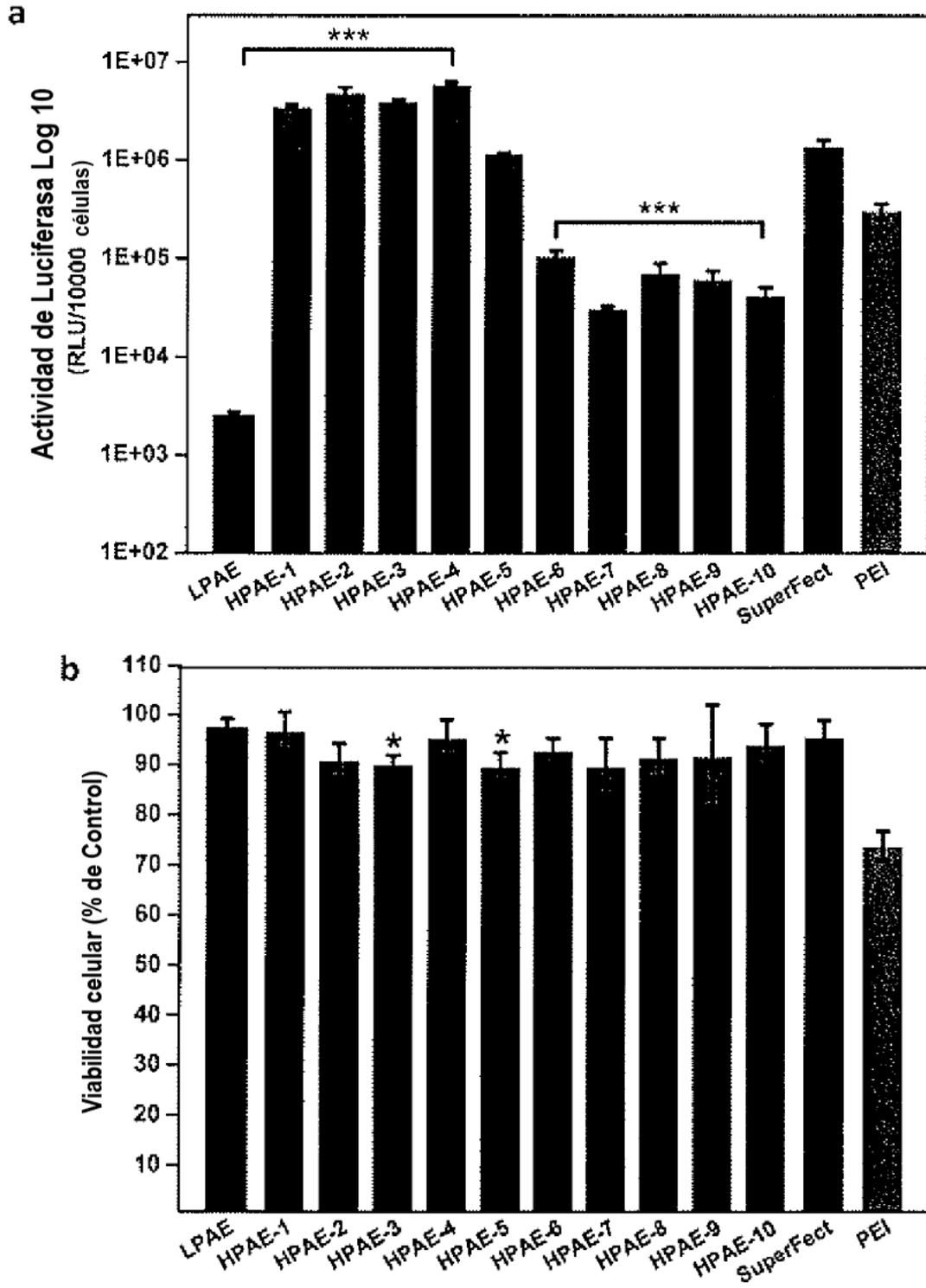


Figura 15

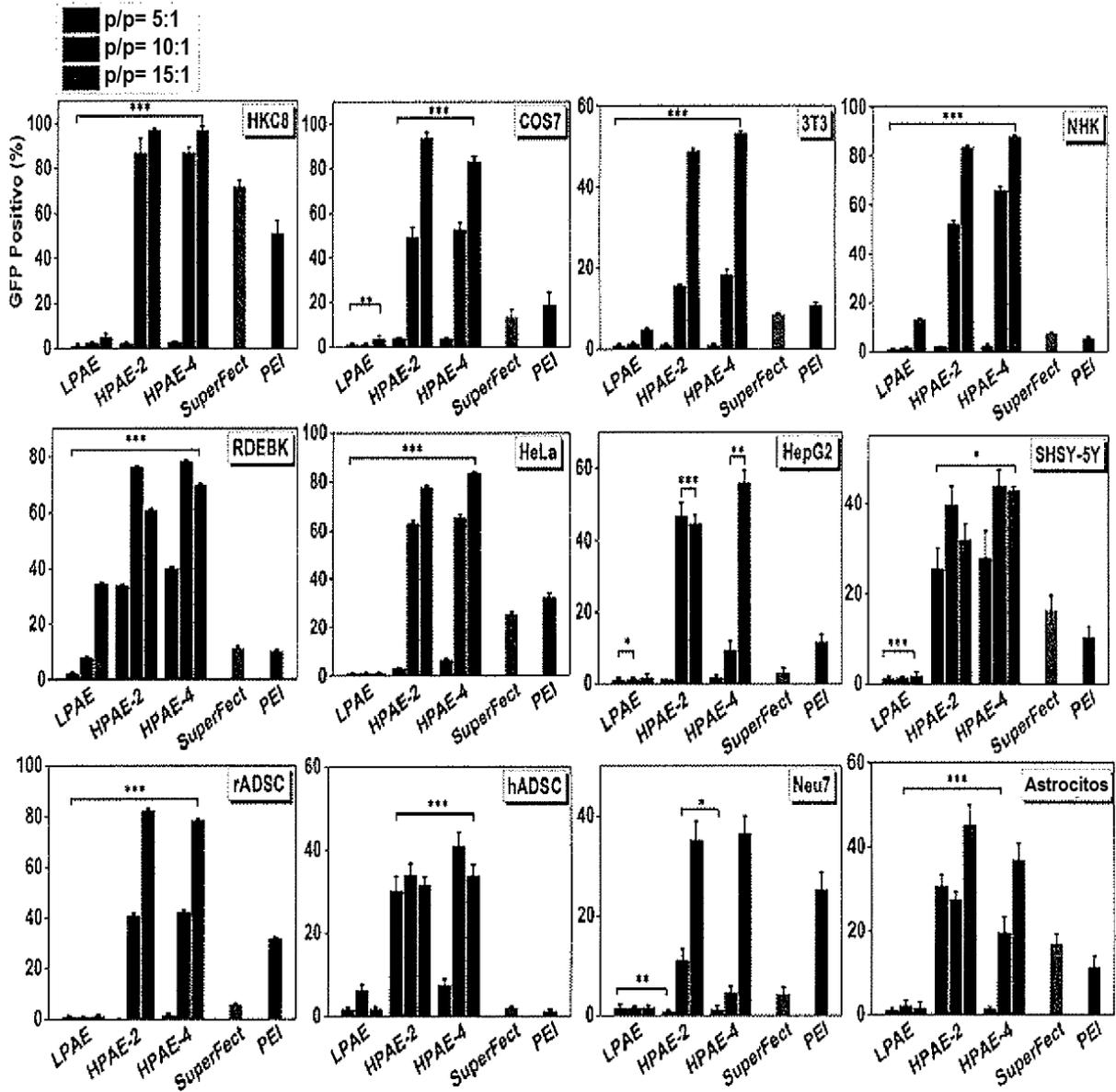


Figura 16

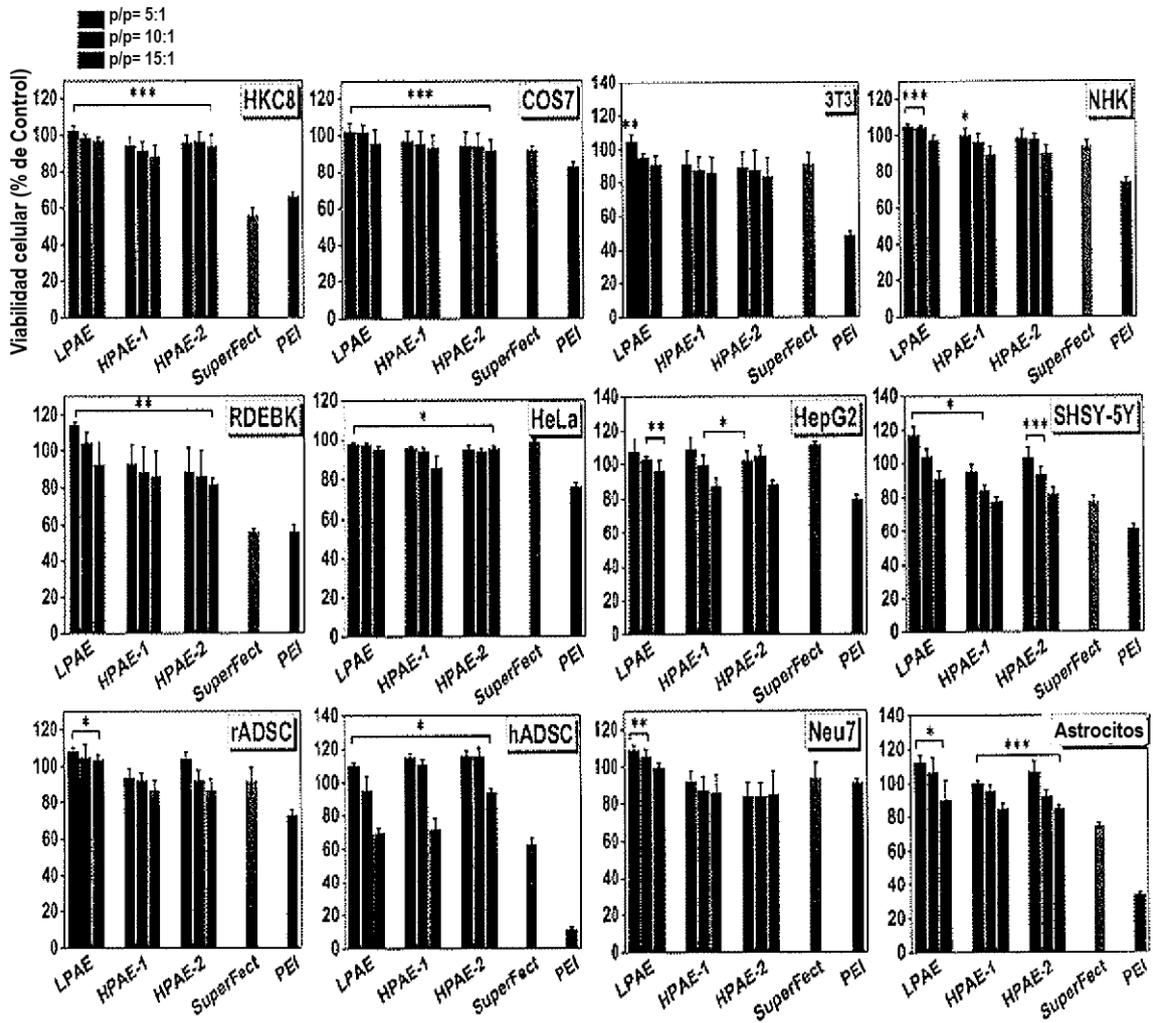


Figura 17