

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 026**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 9/107 (2006.01)
C08G 77/452 (2006.01)
C08L 83/10 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/EP2015/081154**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102663**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15817384 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3236936**

54 Título: **Sistemas de polímeros anfifílicos**

30 Prioridad:

23.12.2014 EP 14199975

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL (100.0%)
Rechtsdienst, Hebelstrasse 32
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HUNZIKER, PATRICK y
LIU, KEGANG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 797 026 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

Sistemas de polímeros anfífilicos

Campo

5 La presente invención se refiere a partículas auto-ensambladas que comprenden polímeros anfífilicos, sus métodos de preparación y su uso terapéutico y/o diagnóstico. La invención también se refiere a los polímeros anfífilicos y a sus métodos de preparación.

Antecedentes

La administración de fármacos y los sistemas de diagnóstico basados en vehículos poliméricos específicos de objetivo se han vuelto interesantes en los últimos años.

10 La administración dirigida de fármacos, es decir, la administración de un fármaco terapéutico a un tejido específico o célula enferma está asociada con una serie de ventajas. Con un enfoque dirigido, se puede reducir o evitar la toxicidad sistémica; también se puede reducir la dosificación del fármaco. También se puede superar el problema de la escasa solubilidad de un candidato farmacológico eficaz. El uso de sistemas de administración de polímeros también es ventajoso porque se pueden retener y circular durante un período de tiempo más largo, evitando así la eliminación típicamente más rápida del agente activo del cuerpo. Con respecto a la administración dirigida de agentes de diagnóstico, una localización mejorada de un agente de imagen para un órgano o para un tipo de tejido específico puede generar un diagnóstico más seguro.

20 Un ejemplo de sistemas de suministro de fármacos poliméricos es aquel basado en PEG (polietilenglicol). Se han desarrollado productos farmacéuticos o biofarmacéuticos de pequeño peso molecular conjugados con polímeros PEG y, de hecho, se ha descubierto que muchos de estos conjugados tienen propiedades mejoradas, tales como una mayor solubilidad del fármaco, extensión de la vida media, baja citotoxicidad e inmunogenicidad. Aunque el PEG, hasta cierto punto, sigue siendo un estándar de oro en aplicaciones biomédicas basadas en polímeros, sin embargo, existen desventajas y limitaciones con respecto a este tipo de polímero. Por ejemplo, en varios casos se han observado hipersensibilidad y la formación de anticuerpos de PEG. En particular, el PEG tiene algo limitada su funcionalidad disponible para la modificación y para la funcionalización ortogonal.

25 También se han investigado otros sistemas de polímeros, tales como los basados en la poli-2-oxazolina (también abreviado como POX). Este tipo de polímero es útil en aplicaciones biomédicas, ya que generalmente también se ha encontrado que son biocompatibles y, además, tienden a tener un 'sigilo' inmunológico, es decir, tienen propiedades de unión no específicas, de modo que se evita el reconocimiento por parte del sistema de defensa inmune y la rápida eliminación.

30 Se han desarrollado sistemas de polímeros anfífilicos que comprenden la poli-2-oxazolina como un elemento estructural.

35 Por ejemplo, el Documento de Patente de los EE.UU. de Número US2008/0305149 describe la preparación de copolímeros segmentados tribloque anfífilicos que comprenden segmentos de poli-2-metiloxazolina y de polidimetilsiloxano (es decir, polímeros tribloque de bloque de poli(2-metiloxazolina) - bloque de poli(dimetilsiloxano) - bloque de poli(2-metiloxazolina), o abreviado como PMOXA-PDMS-PMOXA), y su uso en la fabricación de vesículas con una superficie externa mucoadhesiva. Se describe que estas vesículas se pueden usar para la administración de un agente activo, que se encapsula dentro de la vesícula. Sin embargo, tales vesículas no se pueden modificar fácilmente para la administración dirigida de fármacos. Los polímeros anfífilicos usados para preparar las vesículas están limitados en términos de opciones para una funcionalización adicional.

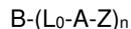
40 Broz et al. (J. Control. Release 2005 (102) 475-488) describen nanocontenedores basados también en polímeros anfífilicos PMOXA-PDMS-PMOXA. En este caso, los polímeros anfífilicos están funcionalizados terminalmente con biotina. El ligando de biotina se usa como un medio para unir el nanocontenedor, con estreptavidina como un eje, a un ligando específico de receptor, es decir, un oligonucleótido de ácido poliguanílico (polyG) que también está biotinilado. Aunque el enlace biotina-estreptavidina es fuerte, sin embargo, no es irreversible; este tipo de enlace tampoco es el más adecuado para el uso in vivo.

45 La solicitud de patente WO2008153966 describe una partícula auto-ensamblada que comprende un homopolímero de polímero anfífilico de Fórmula II y "Z" es solo un grupo terminal, y difiere en que no se forman micelas y que no se propone combinación con un segundo polímero anfífilico diferente de Fórmula II. También se usa un método de preparación completamente diferente.

50 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención introducir nuevos polímeros y copolímeros anfífilicos de poli-2-oxazolina, para su uso en la preparación de partículas auto-ensambladas, y que superan cualquiera de las limitaciones y desventajas de los sistemas de polímeros actuales. Un objeto adicional es desarrollar partículas auto-ensambladas que se puedan usar para la administración dirigida de un agente terapéutico o de un agente de diagnóstico.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una partícula auto-ensamblada que comprende un polímero anfifílico de Fórmula general (I):



5 en donde n es 1 o 2;

B es un segmento de polisiloxano hidrófobo;

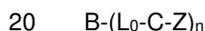
L_0 es un segmento de conector divalente;

A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo; y

en donde Z es un grupo terminal o un conector conjugado a un ligando.

10 En particular, la presente invención proporciona partículas auto-ensambladas tales como micelas que comprenden un polímero anfifílico de la Fórmula general (I), que son útiles para la administración dirigida de agentes terapéuticos, o de agentes de diagnóstico. En un aspecto, las partículas auto-ensambladas pueden comprender un polímero anfifílico de Fórmula general (I) que comprende un ligando específico de receptor que es útil para abordar células y tejidos específicos. En otro aspecto, las partículas auto-ensambladas comprenden un polímero anfifílico de la Fórmula general (I) que se conjuga a un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. En otro aspecto adicional, las partículas auto-ensambladas son adecuadas para su uso en la administración génica y en la terapia génica, y comprenden un polímero anfifílico de la Fórmula general (I) que comprende funcionalidad a base de amina.

15 La invención se refiere además a partículas auto-ensambladas que comprenden un polímero anfifílico de Fórmula (I) en combinación con un polímero anfifílico de Fórmula (II):



en donde n es 1 o 2;

B es un segmento de polisiloxano hidrófobo;

L_0 es un segmento de conector divalente;

C es un segmento de homopolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo;

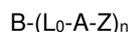
25 y en donde Z es un grupo terminal o un conector conjugado a un ligando.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a partículas auto-ensambladas en la forma de micelas o vesículas.

En un aspecto adicional añadido, la invención se refiere a los polímeros anfifílicos de Fórmula general (I) y a los métodos para su preparación.

Descripción detallada de la invención

30 En un primer aspecto, la invención se refiere a una partícula auto-ensamblada que comprende un polímero anfifílico de Fórmula general (I):



en donde n es 1 o 2;

B es un segmento de polisiloxano hidrófobo;

35 L_0 es un segmento de conector divalente;

A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo; y

Z es un grupo terminal o un conector conjugado a un ligando.

40 Una partícula auto-ensamblada, como se entiende en el presente documento, se refiere a una estructura que comprende uno o más polímeros anfifílicos, y que se forma como resultado de un equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas entre los polímeros y una disolución acuosa madre. Auto-ensamblaje se refiere a la agregación de tales polímeros para minimizar y optimizar los efectos de la interfaz hidrófobo-agua. Como resultado de la agregación y debido a las interacciones moleculares (por ejemplo, repulsión estérica) entre los componentes anfifílicos como tales, se pueden formar partículas de una estructura definible. Típicamente, se requiere una concentración mínima de anfifílicos para la transición de soluto libre a agregado (a menudo denominado concentración mínima de agregado) en partículas. Como se entiende en el presente documento, el término partícula se refiere a cualquier tipo de estructura

45

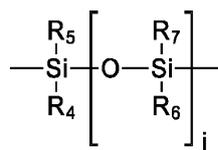
definible que se forma a partir de la agregación de anfífilicos, incluidas, pero no limitadas a micelas y vesículas, y cualquiera de sus variaciones morfológicas. Particularmente preferidas son las partículas auto-ensambladas en forma de micelas.

5 El término polímero anfílico como se usa en el presente documento se refiere a un polímero que comprende elementos estructurales que tienen afinidad hacia el agua o hacia un entorno acuoso, así como elementos estructurales que tienen una afinidad hacia entornos no polares, hidrófobos o lipídicos. Típicamente, un polímero o compuesto anfílico comprende al menos una porción hidrófila y al menos una porción hidrófoba (o lipófila). El segmento hidrófobo se disuelve en o se humecta más fácilmente con, disolventes no polares, tales como los hidrocarburos, que con agua. La propiedad del segmento hidrófilo, por otro lado, tiene una mayor afinidad por un
10 entorno más polar y generalmente se humedece o disuelve más fácilmente con agua.

Además, un polímero es un compuesto que se forma a partir de la unión química de dos o más unidades repetitivas o monómeros. Como se usa en el presente documento, un copolímero se refiere a un polímero derivado de dos o más monómeros diferentes, mientras que un homopolímero se refiere a un polímero que consiste en una única unidad monomérica repetitiva. El término copolímero en bloques o polímero en bloques se refiere a polímeros que comprenden al menos dos segmentos de polímero diferentes, en donde cada segmento de polímero comprende típicamente dos o más unidades adyacentes o monómeros del mismo tipo.

En una realización, el polímero anfílico de la Fórmula general (I) comprende un segmento B de polisiloxano hidrófobo y un segmento A de copolímero hidrófilo; en otras palabras, n es un número entero 1, lo más preferiblemente, n es un número entero 2, de modo que el polímero anfílico de Fórmula (I) comprende un segmento B de polisiloxano hidrófobo y dos segmentos A de copolímero hidrófilo, es decir (Z-A-L₀)-B-(L₀-A-Z)

Más específicamente, el segmento B de polisiloxano hidrófobo puede ser un polisiloxano de Fórmula (III)



en donde j es un número entero de 5-1000; y en donde el 80-100 % de R₄, R₅, R₆, R₇ son, independientemente entre sí, alquilo C1-C10, y el 0-20 % de R₄, R₅, R₆, R₇ son independientemente entre sí, alqueno C3-C12, alquilo C1-C4 sin sustituir fenilo sustituido con alcoxi C1-C4, fluoro(alquilo C1-C18), o ciano(alquilo C1-C12).

Preferiblemente, j es un número entero de 10 a 300. En una realización particular, j es un número entero de 10 a 150.

Preferiblemente, el 90-100 % de R₄, R₅, R₆, R₇ se seleccionan independientemente de alquilo que tiene hasta 6 átomos de carbono, en particular hasta 4 átomos de carbono.

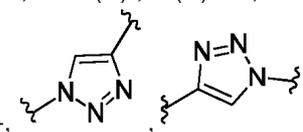
En otra realización, el 0-10 % de R₄, R₅, R₆, R₇ se seleccionan independientemente de alqueno C3-C8, fenilo no sustituido o sustituido con metilo, etilo, metoxilo o etoxilo, flúor(alquilo C1-C8) o ciano(alquilo C1-C4).

En una realización particularmente preferida, R₄, R₅, R₆, R₇ son todos metilo o todos etilo, es decir, el segmento B de polisiloxano hidrófobo se selecciona de polidimetilsiloxano o polidietilsiloxano, en donde el segmento comprende preferiblemente de 10 a 150 unidades de monómero.

El segmento de conector divalente L₀ proporciona un medio para unir covalentemente el segmento B de polisiloxano hidrófobo al segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo.

El término conector, intercambiable con el término enlace, elemento de enlace o espaciador, cuando se usa en el presente documento con respecto a un polímero, ligando o cualquier otra entidad química se refiere a uniones covalentes entre al menos dos restos químicos distintos. El conector puede ser un resto intermedio, que actúa como un espaciador entre dichos dos restos, formándose el resto intermedio o espaciador también a partir de una o más reacciones químicas que dan lugar a la unión covalente. En tales casos, el conector se puede describir como divalente. En otros casos, un conector puede ser multivalente, es decir, funcionar como un medio de enlace para más de dos restos.

En particular, L₀ está representado por la fórmula R₈(Q)_u, en donde R₈ es un grupo alqueno o arileno que contiene hasta 20 átomos de carbono, y Q se selecciona de -O-, -S-, -S-S-, -NR₉-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-

45 , -OC(O)-, C(O)O-, -NHC(O)NH-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHC(S)NH-, , en donde R₉ es hidrógeno o alquilo C1-C4 y u es 0, 1 o 2.

El segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo comprende al menos dos monómeros de 2-oxazolina 2-sustituída, es decir, el copolímero se puede obtener a partir de la copolimerización de al menos dos monómeros de oxazolina 2-sustituída. Los monómeros de 2-oxazolina se pueden seleccionar de monómeros de 2-oxazolina sustituida con restos alifáticos o aromáticos, por ejemplo 2-alquil-2-oxazolinas tales como 2-metil-2-oxazolina, 2-etil-2-oxazolina, 2-propil-2-oxazolina, o 2-aril-2-oxazolinas tales como 2-fenil-2-oxazolina. Unidades de 2-oxazolina más preferidas que se pueden usar para la preparación del segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo son aquellas sustituidas y funcionalizadas en la posición 2 con restos que comprenden grupos funcionales tales como una amina, una azida, un alquino, un aldehído, un acetal, un alcohol, un ácido carboxílico activado, una oxiamina, una cetona, un cetal, un éster, una maleimida, una vinilsulfona, un disulfuro de ortopiridilo o un cloroformiato, que además se pueden modificar químicamente y usar como un medio para la conjugación con otras entidades químicas. El segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo se puede obtener a partir de la copolimerización de dos o más de estos tipos de monómeros de 2-oxazolina.

En una realización particular, el segmento A comprende dos o más monómeros de 2-oxazolina 2-sustituída, en donde al menos uno de los monómeros se selecciona de una 2-alquil-2-oxazolina, tal como 2-metil-2-oxazolina, o una 2-aril-2-oxazolina. En tales casos, el segmento A se puede obtener a partir de la copolimerización de al menos dos monómeros de 2-oxazolina 2-sustituída, en donde al menos uno de los monómeros es una 2-alquil-2-oxazolina o una 2-aril-2-oxazolina.

En general, el término alquilo como se usa en el presente documento incluye grupos hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que comprenden de 1 a 40 átomos de carbono en la cadena principal. La cadena hidrocarbonada puede ser saturada o insaturada (es decir, comprender enlaces dobles (alqueno) y/o enlaces triples (alquino)). La cadena hidrocarbonada también puede ser cíclica, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, o comprender una porción que es cíclica (también se incluyen los grupos alquilo policíclicos, por ejemplo, pero no se limitan a colesterilo, adamantilo, norbornilo, biciclo[2.2.2]octilo). La cadena hidrocarbonada del grupo alquilo puede interrumpirse con heteroátomos seleccionados de uno o más átomos tales como oxígeno, nitrógeno, azufre o silicio. Cada grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido a través de los átomos de carbono disponibles con sustituyentes que incluyen, por ejemplo, alquilo, halo (F, Cl, Br, I), haloalquilo (por ejemplo, CCl₃ o CF₃), alcoxilo, ariloxilo, alquiltio, hidroxilo, metoxi, carboxilo, epoxi, alquilocarbonilo, alquilcarbonilo, amino, carbamoilo (por ejemplo, NH₂C(=O)- o NHRC(=O)-, en donde R es un alquilo o un arilo), urea (-NHCONH₂), tiourea (-NHSONH₂), alquilurea, arilo, éter, éster, tioéster, nitrilo, nitro, amida, carbonilo, oxo, carboxilato, tiol, sulfuro de alquilo, sulfuro de arilo, sulfona, sulfóxido, dialquilsililo, dialquilarilsililo, alquildiarilsililo y triarilsililo. Ejemplos de alquilos simples incluyen, sin limitación, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, y nonilo.

Como se usa en este documento, el término arilo se refiere a grupos hidrocarbonados aromáticos monocíclicos y bicíclicos que contienen de 6 a 12 átomos de carbono en la porción del anillo o grupos aromáticos que incluyen un anillo aromático único de 5 y 6 miembros. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos a través de los átomos de carbono disponibles con sustituyentes como se definió anteriormente. El sistema del anillo aromático puede incluir de 1 a 4 heteroátomos tales como azufre, oxígeno o nitrógeno. Ejemplos de arilos precedentes incluyen, sin limitación, fenilo, toliilo, hidroxifenilo, bencilo, naftilo, bifenilo, pirrol, furano, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazina, triazina, tetrazina, piridina, pirazina, piridazina, y pirimidina.

En una realización preferida adicional, el segmento A se puede obtener a partir de la copolimerización de 2-metil-2-oxazolina y un monómero de 2-oxazolina funcionalizada con azida, especialmente una 2-(4-azidoalquil)-2-oxazolina tal como 2-(4-azidobutil)-2-oxazolina.

En otro aspecto, el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina se puede seleccionar de un copolímero aleatorio de poli-2-oxazolina, un copolímero dibloque de poli-2-oxazolina y de un copolímero tribloque de poli-2-oxazolina. Un copolímero aleatorio de poli-2-oxazolina comprende al menos dos unidades diferentes de monómero de 2-oxazolina que se distribuyen aleatoriamente en el copolímero, mientras que un copolímero en bloques de poli-2-oxazolina comprende al menos dos segmentos poliméricos diferentes, cada uno de los cuales comprende independientemente un monómero específico de 2-oxazolina. Se prefiere particularmente un copolímero en bloques que comprende dos segmentos (es decir, un copolímero dibloque de poli-2-oxazolina), al igual que los copolímeros en bloques que comprenden tres segmentos (es decir, un copolímero tribloque). Los copolímeros aleatorios de poli-2-oxazolina se pueden obtener mediante la adición simultánea de al menos dos unidades de monómero de poli-2-oxazolina durante el proceso de copolimerización. Por el contrario, los copolímeros en bloques se pueden obtener mediante la adición secuencial de los monómeros de poli-2-oxazolina durante el proceso de copolimerización.

La cadena principal del segmento A es el copolímero de poli-2-oxazolina. Sin embargo, en algunas realizaciones, el copolímero de poli-2-oxazolina se conjuga adicionalmente a un resto químico que tiene, por ejemplo, una función terapéutica o diagnóstica. En particular, la partícula auto-ensamblada puede comprender un polímero anfifílico de Fórmula (I) en donde el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo se conjuga con un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, o con un ligando tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un polipéptido o un carbohidrato. Ligandos preferidos son biotina, folato o un péptido.

Agentes terapéuticos preferidos son ingredientes o fármacos farmacéuticamente activos tales como agentes

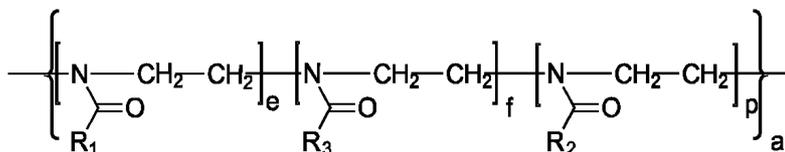
modificadores de lípidos, inmunosupresores, corticosteroides, agentes antiinflamatorios, antitrombóticos, analgésicos, agentes antibacterianos, o agentes para la terapia fotodinámica. Se prefieren particularmente los agentes quimioterapéuticos y antineoplásicos, por ejemplo, doxorubicina o taxol.

5 Agentes de diagnóstico preferidos incluyen tintes fluorescentes tales como tintes fluorescentes de infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés), radiomarcadores, agentes de imagen PET (por sus siglas en inglés), agentes de imagen MRI (por sus siglas en inglés), sensibilizadores, y un agente de imagen fotoacústica. Ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen fluoresceína, rodamina, cianinas, ftalocianinas, BODIPY y sus derivados. Dichos agentes de diagnóstico también pueden proporcionar actividad terapéutica; por ejemplo, funcionan como agentes para terapia fotodinámica.

10 En este contexto, el término conjugado se refiere a la unión de los agentes o ligandos al segmento de copolímero de poli-2-oxazolina mediante unión covalente. La conjugación comprende preferiblemente un enlace covalente que se puede escindir o hidrolizar en condiciones fisiológicas. Si bien las condiciones fisiológicas pueden variar dependiendo del microambiente local de un tejido, órgano o ambiente celular dado con respecto, por ejemplo, al pH, al ambiente redox, etc., generalmente se entiende que la condición fisiológica se refiere a temperaturas de aproximadamente la temperatura fisiológica, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C; en particular 33-37°C y un pH de aproximadamente 6-8. La hidrólisis o escisión del enlace covalente también puede ser enzimática. A los efectos de la administración de fármacos, se prefiere particularmente un enlace escindible o hidrolizable para la conjugación de los agentes terapéuticos con el segmento de copolímero. Alternativamente, la conjugación puede ser en la forma de un enlace no hidrolizable o de un enlace que no es propenso a la escisión en condiciones fisiológicas o por cualquier enzima nativa.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "un agente de diagnóstico" o "un agente terapéutico" o "un ligando" no se limitan al singular, es decir, un único compuesto conjugado con el polímero. Como el polímero comprende unidades repetitivas, se debe entender que más de una unidad se puede conjugar a un agente de diagnóstico o a un agente terapéutico, o a un ligando. También se debe entender que no todas las unidades repetitivas del polímero se pueden conjugar a un agente de diagnóstico, a un agente terapéutico o a un ligando. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 1 % o aproximadamente el 10 % o al menos aproximadamente el 60 % de las unidades repetitivas del segmento de copolímero de poli-2-oxazolina se pueden conjugar a un agente de diagnóstico, a un agente terapéutico, a un ligando, o a una combinación de los mismos. En una realización, el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina se puede conjugar tanto a un agente de diagnóstico como a un agente terapéutico. En otra realización, el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina se puede conjugar a más de un agente terapéutico.

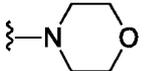
En una realización específica adicional, la partícula auto-ensamblada comprende un polímero anfifílico de Fórmula (I) en donde el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina comprende un segmento de Fórmula (Ia):

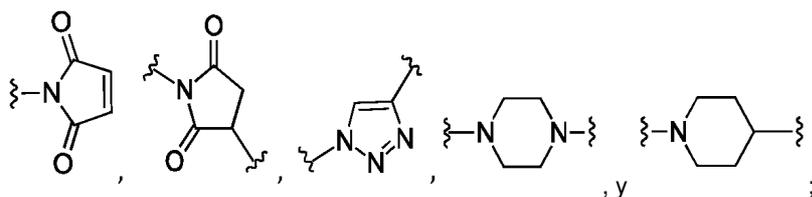


35 en donde R₁ y R₃ se seleccionan independientemente de un conector conjugado a un grupo funcional seleccionado de una amina, una azida, un alquino, un aldehído, un acetal, un alcohol, un ácido carboxílico, un ácido carboxílico activado, una oxiamina, una cetona, un cetal, un éster, una maleimida, una vinilsulfona, un disulfuro de ortopiridilo y un cloroformiato; y un conector conjugado a un agente terapéutico, a una agente de diagnóstico, o a un ligando. R₂ se selecciona independientemente de grupos alquilo y aralquilo C1-C20. Además, e, f son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 500, siempre que e y f no se seleccionen simultáneamente como 0; p es un número entero seleccionado de 2-500; y a se selecciona de ran y block, en donde ran indica un copolímero aleatorio cuyas unidades definidas por e, f y p están dispuestas en aleatorio, mientras que block indica un copolímero en bloques cuyas unidades definidas por e, f y p están en segmentos secuenciales.

45 Los grupos funcionales pueden servir como medios para la modificación química o funcionalización adicional. En otros casos, pueden ser grupos funcionales que ya son estructuralmente relevantes para el producto final de polímero anfifílico y no requieren modificaciones adicionales. En una realización particularmente preferida, R₁ y R₃ se seleccionan independientemente de un conector, preferiblemente un alqueno de C1 a C30 o un arileno, conjugado a una amina o una azida.

50 En una realización preferida adicional, la partícula auto-ensamblada comprende un polímero anfifílico de Fórmula (I) en donde Z es un grupo terminal. Z está directamente unido a un extremo terminal del segmento A de polímero de poli-2-oxazolina, y se puede derivar (o modificar) directamente a partir del nucleófilo que se usa para apagar o terminar la reacción de copolimerización de la poli-2-oxazolina. Preferiblemente, Z se selecciona de un grupo terminal de

fórmula $\text{-X}_1\text{-Q}_0$, en donde X₁ se selecciona de -O- , -S- , -NH- , $\text{-NR}_{10}\text{-}$, , -N_3 ,



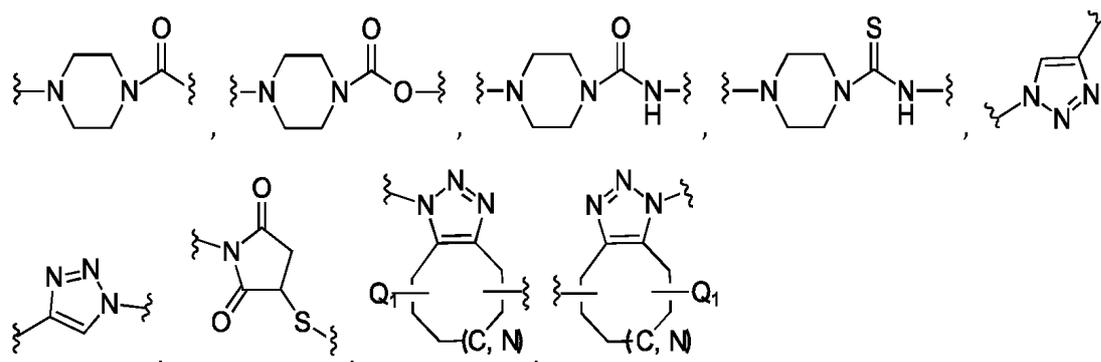
5 y en donde Q_0 está ausente o se selecciona de H, alquilo, alqueno, aralquilo, alquinilo, heterociclilo o arilo no sustituido o sustituido, $-C(O)-(CH_2)_q-COOH$, $-C(O)O-R_{10}$, $-(CH_2)_q-C(O)O-R_{10}$, $-C(O)R_{10}$, $-NHC(O)-(CH_2)_q-N_3$, $-(CH_2)_q-N_3$, y $-SR_{10}$, en donde R_{10} se selecciona de un grupo alquilo, alqueno, aralquilo no sustituido o sustituido y q es un número entero de 1 a 10. Más preferiblemente, Z es hidroxilo (-OH).

10 Alternativamente, la partícula auto-ensamblada comprende un polímero anfílico de Fórmula (I) en donde Z es un conector conjugado a un ligando que es útil para abordar células y tejidos específicos. El ligando es preferiblemente un ligando específico de receptor (por ejemplo, un ligando específico de receptor de tumor) que permite que la partícula auto-ensamblada se dirija, interactúe y se una a un tipo específico de receptor, célula o tejido. El ligando se puede seleccionar de una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un péptido, y un carbohidrato. Ligandos particularmente preferidos son folato y sus derivados, biotina y péptidos.

15 Ejemplos de ligandos incluyen, pero no se limitan a, RGD (ácido arginilglicilapártico) y péptidos que contienen RGD y sus análogos dirigidos a células que expresan integrinas; EGF (por sus siglas en inglés) y péptidos dirigidos a células que expresan receptores de EGF (por sus siglas en inglés); PD1 y péptidos dirigidos a Neuropilin 1; proteína y péptidos de fibra adenoviral dirigidos a células que expresan receptor de Coxsackie-adenoviral (CAR); ApoE y péptidos dirigidos al receptor de LDL; factor de von Willebrand y péptidos dirigidos a colágeno expuesto; péptidos de melanotropina (alfa MSH), transferrina, péptidos de somatostatina y FGF2 dirigidos a tumor; factor del crecimiento de células endoteliales vasculares dirigido a células endoteliales; folato y sus análogos dirigido a células tumorales con receptores de superficie celular, sialil-lewis dirigido a una región de inflamación.

20 El conector, además de ser un medio de conexión del ligando al extremo del polímero de poli-2-oxazolona, también puede ser útil para facilitar el posicionamiento del ligando en la partícula auto-ensamblada, y para garantizar una presentación adecuada del ligando para la unión al tejido y a la célula. El conector puede comprender un enlace covalente hidrolizable, o alternativamente, ningún enlace covalente hidrolizable.

25 En particular, Z puede ser un conector conjugado a un ligando representado por la fórmula $-L_3-R_{11}$, en donde L_3 se selecciona de $-S-$, $-O-$, $-OC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-NHC(O)NH-$, $-NHC(S)NH-$, $-NHC(O)O-$,

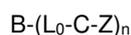


en donde Q_1 representa uno o más sustituyentes;

30 y en donde R_{11} es un ligando seleccionado de una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un polipéptido y un carbohidrato, y en particular de folato, biotina y péptidos.

35 Las partículas auto-ensambladas que se forman predominantemente con un polímero anfílico de Fórmula (I) como un componente estructural principal en una realización particularmente preferida comprenden un polímero anfílico de Fórmula (I) en donde B es un segmento de polidimetilsiloxano, el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolona comprende al menos un bloque de poli-2-metiloxazolona, y Z es un grupo terminal.

En otro aspecto de la invención, la partícula auto-ensamblada comprende un polímero anfílico de Fórmula (II):



en donde n es 1 o 2;

B es un segmento de polisiloxano hidrófobo;

L₀ es un segmento de conector divalente;

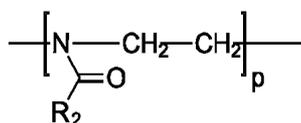
C es un segmento de homopolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo;

5 y en donde Z se selecciona de un grupo terminal o un conector conjugado a un ligando.

El polisiloxano B hidrófobo, el segmento de conector divalente L₀ y el grupo terminal Z o conector conjugado a un ligando son como se definieron anteriormente por la Fórmula (I).

10 El segmento C de homopolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo comprende un polímero que se puede obtener a partir de la polimerización de cualquier monómero de 2-oxazolina 2-sustituido; particularmente preferidos son los monómeros de 2-oxazolina 2-alkilo sustituido o 2-arilo sustituido. En una realización particularmente preferida, el polímero anfífilo de Fórmula (II) comprende un segmento de poli-2-metil-oxazolina. Además, el segmento C de homopolímero de poli-2-oxazolina puede comprender opcionalmente al menos 5 y hasta 50 o más unidades del monómero de 2-oxazolina. Preferiblemente, el segmento C de homopolímero de poli-2-oxazolina comprende entre 5-30 unidades de monómero.

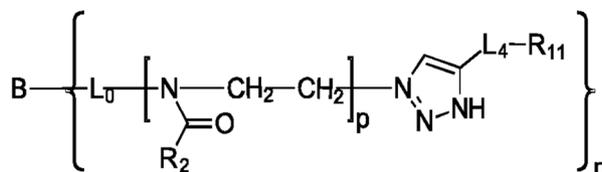
15 El polímero anfífilo de Fórmula (II) puede comprender un segmento C de Fórmula (II-a):



en donde R₂ se selecciona de un grupo alkilo o aralkilo C1-C20; y p es un número entero seleccionado de 2-500.

20 En una realización particular de un polímero anfífilo de Fórmula (II) que comprende un segmento C de Fórmula (II-a), Z es de la fórmula -L₃-R₁₁ como se describió anteriormente, en particular en donde L₃ es un conector triazol. En tales casos, el conector de triazol es el resultado de la conjugación del ligando o derivado de ligando con el extremo terminal del polímero anfífilo de Fórmula (II) o (IIa) por medio de una cicloadición azida-alkino 1,3-dipolar.

En una realización, una partícula auto-ensamblada comprende un polímero de Fórmula (IV):



25 en donde L₄ es un grupo conector que comprende un grupo alkileno o arileno C1-C20, o un grupo alkileno o arileno C1-C20, que puede estar interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N o S (por ejemplo -O-CH₂-CH₂-O-, -CH₂NH-, -CH₂-S-S-CH₂-CH₂-O-); con p preferiblemente en el intervalo de 5 a 100, en particular de 20 a 40; y en donde B, L₀, R₂ y R₁₁ son como se describieron anteriormente. Preferiblemente, R₁₁ es un ligando seleccionado de una molécula pequeña, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), anticuerpo de dominio único, oligonucleótido, un carbohidrato, y en particular de folato, biotina o un péptido.

30 En otra realización particular de la invención, la partícula auto-ensamblada es una micela que comprende al menos un polímero anfífilo de Fórmula (II) en donde Z es un grupo terminal.

35 En una realización preferida, la invención se refiere a partículas auto-ensambladas que comprenden al menos un polímero anfífilo de Fórmula (II) en donde Z es un grupo terminal, en donde la partícula auto-ensamblada es una micela; y en donde la partícula auto-ensamblada comprende al menos un polímero anfífilo de Fórmula (II) en donde Z es un conector conjugado a un ligando receptor de folato, preferiblemente folato o un derivado del mismo.

En otra realización, las micelas pueden comprender además un polímero anfífilo de Fórmula (II), en donde Z es un conector conjugado a un agente terapéutico o de diagnóstico.

40 En otra realización de la invención, la partícula auto-ensamblada comprende al menos un polímero anfífilo de Fórmula (II) en donde Z es un grupo terminal, y al menos un polímero anfífilo de Fórmula (II) en donde Z es un conector conjugado a un ligando, en donde el ligando es un ligando específico de receptor, por ejemplo folato o un derivado del mismo, un péptido, y también otras moléculas pequeñas que son ligandos específicos de receptor; o un ligando seleccionado de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), un anticuerpo

de dominio único, un oligonucleótido, un polipéptido y un carbohidrato.

En cualquiera de las realizaciones precedentes, se prefiere además que estas micelas o partículas auto-ensambladas que comprenden al menos un polímero anfifílico de Fórmula (II) en donde Z es un grupo terminal, y al menos un polímero anfifílico de Fórmula (II) en donde Z es un conector conjugado a un ligando, comprenden dichos polímeros en donde el segmento B hidrófobo es un polidimetilsiloxano y en donde el segmento C hidrófilo es una poli-2-metil-oxazolina. Preferiblemente, el segmento C de homopolímero de poli-2-oxazolina comprende entre 5-30 unidades de monómero.

En una realización, una partícula auto-ensamblada que comprende un polímero anfifílico de la Fórmula general (I) como se describió anteriormente comprende además al menos un polímero anfifílico de la Fórmula (II). En estas y otras realizaciones, se prefiere especialmente que la partícula auto-ensamblada que comprende un polímero anfifílico de Fórmula (II), comprenda dicho polímero en donde B es un polidimetilsiloxano y C es una poli-2-metil-oxazolina.

En otra realización adicional, las partículas auto-ensambladas comprenden independientemente un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un oligonucleótido. En otras palabras, las partículas auto-ensambladas incorporan, o están cargadas con, un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, un oligonucleótido o una combinación de los mismos, que son físicamente independientes, es decir, no están unidos covalentemente a las partículas auto-ensambladas como tales.

Está dentro del alcance de la invención que se puedan usar diversas combinaciones de los polímeros anfifílicos de la Fórmula (I) y de la Fórmula (II) para formar partículas auto-ensambladas de la invención. Particularmente preferidas son las partículas auto-ensambladas que se preparan a partir de las siguientes combinaciones de polímeros anfifílicos:

(A1) Un polímero anfifílico de Fórmula (I) en donde Z es un grupo terminal, combinado con un polímero anfifílico de Fórmula (II) en donde Z es también un grupo terminal. El porcentaje en peso del polímero de Fórmula (I) puede variar de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 %.

(B1) La combinación de polímeros anfifílicos (A1), como se describieron anteriormente, que comprende además un polímero anfifílico de Fórmula (I) o de Fórmula (II) en donde Z es un conector conjugado a un ligando. El porcentaje en peso de este polímero anfifílico adicional conjugado a un ligando es preferiblemente de aproximadamente el 1 % al 20 %, en relación con el peso total de los polímeros anfifílicos.

(C1) La combinación de polímeros anfifílicos (A1), como se describieron anteriormente, en donde la partícula auto-ensamblada resultante comprende un agente terapéutico y/o un agente de diagnóstico que no está unido covalentemente a ninguno de los polímeros anfifílicos. El porcentaje en peso del agente terapéutico, en relación con el peso total de la composición de partículas auto-ensambladas es preferiblemente de aproximadamente el 1 al 50 %. El porcentaje en peso del agente de diagnóstico, en relación con el peso total de la composición de partículas auto-ensambladas es preferiblemente de aproximadamente el 1 al 10 %.

(D1) La combinación B1 como se describió anteriormente, en donde la partícula auto-ensamblada resultante comprende además un agente terapéutico y/o un agente de diagnóstico que no está unido covalentemente a ninguno de los polímeros anfifílicos. El porcentaje en peso, en relación con el peso total de los polímeros anfifílicos, del polímero anfifílico conjugado con un ligando es preferiblemente de aproximadamente el 1 % al 20 %. El porcentaje en peso del agente terapéutico, en relación con el peso total de la composición de partículas auto-ensambladas es preferiblemente de aproximadamente el 1 al 50 %. El porcentaje en peso del agente de diagnóstico, en relación con el peso total de la composición de partículas auto-ensambladas es preferiblemente de aproximadamente el 1 al 10 %.

Las partículas auto-ensambladas, como se describieron en todas las realizaciones precedentes, se seleccionan preferiblemente de una micela o una vesícula. Particularmente preferidas son las micelas. En comparación con las vesículas, las micelas se pueden preparar más fácilmente y también se encuentran que son más estables después de la encapsulación del fármaco, en particular en la encapsulación de agentes terapéuticos hidrófobos y/o poco o muy poco solubles en agua.

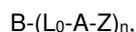
Se puede entender que una micela es una partícula auto-ensamblada que comprende un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Se puede formar una micela invertida, es decir, con un interior hidrófilo y un exterior hidrófobo en un disolvente hidrófobo. A una concentración dada en agua como el disolvente a granel (es decir, la concentración micelar crítica, o CMC, por sus siglas en inglés), los polímeros anfifílicos de la invención comenzarán a agregarse y auto-ensamblarse para formar una estructura micelar definida. Este proceso es reversible; por debajo de esta concentración, los polímeros anfifílicos se disociarán en gran medida. Si bien pueden ser factibles varias formas y disposiciones geométricas (por ejemplo, laminillas, cilindros), las micelas de la invención son preferiblemente esféricas o elipsoidales.

Una vesícula, como se entiende en el presente documento, es una partícula auto-ensamblada que comprende una estructura de membrana de bicapa cerrada, y un compartimento acuoso encerrado. La superficie externa de la vesícula que mira al disolvente y la superficie de la vesícula que mira hacia el compartimento interno usualmente presentan los segmentos hidrófilos de los polímeros anfifílicos. La vesícula puede ser unilamelar, es decir, que comprende una bicapa, o puede ser multilamelar, es decir, que comprende más de una membrana bicapa.

Como se mencionó, las micelas y vesículas de la invención son preferiblemente de forma sustancialmente esférica. El diámetro promedio de tales micelas está generalmente en el intervalo de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 150 nm. El diámetro promedio de las vesículas formadas a partir de los polímeros anfífilicos está generalmente en el intervalo de 40 nm a 250 nm. El tamaño, la forma y las geometrías de las micelas se pueden determinar mediante los métodos de caracterización habituales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante análisis DLS (por sus siglas en inglés) o TEM (por sus siglas en inglés).

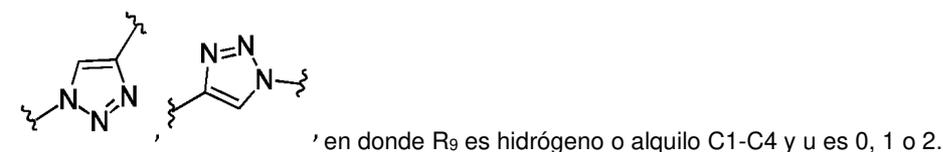
Las micelas y vesículas también se pueden preparar por métodos generalmente conocidos en la técnica, que incluyen métodos tales como hidratación de película o nano-precipitación, que se describen con más detalle a continuación en la sección de Ejemplos. En una realización adicional, las partículas auto-ensambladas se transforman en partículas sólidas o nanopartículas por medio de la liofilización u otros métodos generalmente conocidos en la técnica para preparar partículas sólidas a partir de dispersiones coloidales.

En otro aspecto, la invención se refiere a polímeros anfífilicos de Fórmula (I) y sus métodos de preparación, es decir, los polímeros anfífilicos de la Fórmula general (I)

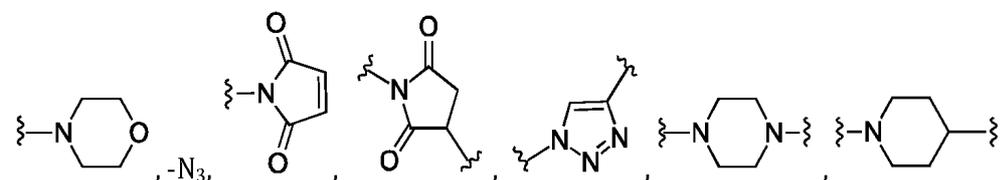


en donde n es 1, o 2 y B es un segmento de polisiloxano hidrófobo; y en donde L₀, Z y A son como sigue:

El segmento de conector divalente L₀ está representado por la fórmula: R₈(Q)_u, en donde R₈ se selecciona de un grupo alquileo o arileno que contiene de 1 a 20 átomos de carbono y un grupo alquileo o arileno que contiene de 1 a 20 átomos de carbono interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S; Q se selecciona de -O-, -S-, -S-S-, -NR₉-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -OC(O)-, C(O)O-, -NHC(O)NH-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHC(S)NH-,

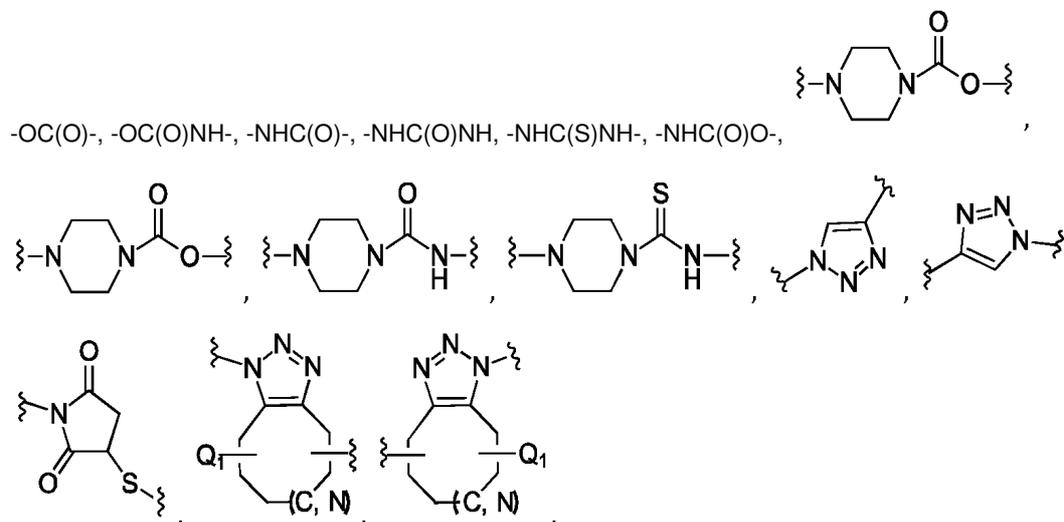


Z es un grupo terminal de fórmula -X₁-Q₀, en donde X₁ se selecciona de -O-, -S-, -NH-, -NR₁₀-,



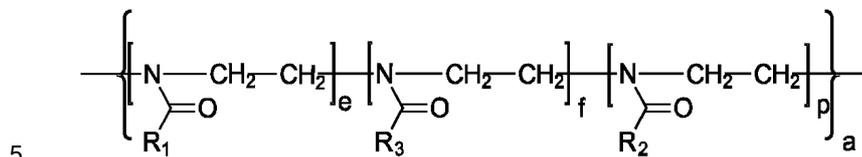
y Q₀ está ausente o se selecciona de H, alquilo, alqueno, aralquilo, alquinilo, heterociclilo o arilo no sustituido o sustituido, -C(O)-(CH₂)_q-COOH, -C(O)O-R₁₀, -(CH₂)_q-C(O)O-R₁₀, -C(O)R₁₀, -NHC(O)-(CH₂)_q-N₃, -(CH₂)_q-N₃, o -SR₁₀, en donde R₁₀ se selecciona del grupo alquilo, alqueno, aralquilo no sustituido o sustituido y q es un número entero de 1 a 10.

Alternativamente, Z es un conector conjugado a un ligando de fórmula -L₃-R₁₁, en donde L₃ se selecciona de -S-, -O-,



en donde Q₁ representa uno o más sustituyentes; y R₁₁ es un ligando seleccionado de una molécula pequeña, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno (fab, por sus siglas en inglés), anticuerpo de dominio único, oligonucleótido, un carbohidrato, y en particular de folato, biotina o péptidos.

El segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrofílico es de Fórmula (I-a):



en donde R₁, R₃ se seleccionan independientemente de un conector conjugado a un agente terapéutico, a un agente de diagnóstico o a un ligando; y un conector que comprende un grupo funcional seleccionado de una amina, una azida, un alquino, un aldehído, un acetal, un alcohol, un ácido carboxílico, un ácido carboxílico activado, una oxiamina, una cetona, un cetal, un éster, una maleimida, una vinilsulfona, un disulfuro de ortopiridilo o un cloroformiato;

10 R₂ se selecciona independientemente de un grupo alquilo o aralquilo C1-C20;

e, f, son números enteros seleccionados independientemente de 0-500, siempre que e y f no se seleccionen simultáneamente como 0;

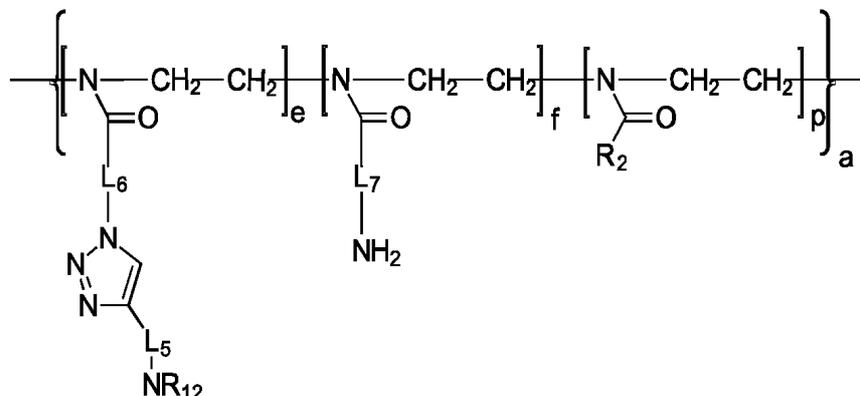
p es un número entero seleccionado de 2-500;

15 y a se selecciona de ran que indica un copolímero aleatorio en donde las unidades definidas por los números enteros e, f y p son aleatorias o en bloque, lo que indica un copolímero en bloques en donde las unidades definidas por los números enteros e, f y p son segmentos secuenciales.

El polisiloxano B hidrófobo de tales polímeros anfifílicos es preferiblemente un polisiloxano como se describió anteriormente de Fórmula (III) o un compuesto relacionado.

20 Con respecto a los grupos R₁ y R₃, estos comprenden preferiblemente un conector conjugado a un agente terapéutico, a un agente de diagnóstico o a un ligando. En una realización, el conector comprende un enlace covalente que es hidrolizable, es decir, que se puede escindir por hidrólisis, preferiblemente en condiciones fisiológicas. En otra realización, el conector comprende solo enlaces covalentes no hidrolizables. Alternativamente, R₁ y R₃ pueden ser un conector que comprende un grupo funcional que se puede modificar químicamente (es decir, en condiciones generales de reacción con nucleófilos o electrófilos) y que permite la unión de, o el enlace a otra entidad química, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico o un ligando. En una realización preferida, los restos R₁ y R₃ comprenden un grupo funcional seleccionado de una amina (que puede ser secundaria, o terciaria o cuaternaria) y una azida.

30 R₂, por otro lado, es preferiblemente un grupo químicamente inerte, es decir, no experimenta reacciones químicas fácilmente, por ejemplo, durante la modificación química de R₁ o R₃, y tampoco con ninguno de los grupos funcionales potencialmente reactivos de R₁ o R₃. R₂ es preferiblemente un grupo alquilo o aralquilo C1-C20; en particular, R₂ puede ser un alquilo C1-C10 tal como metilo o etilo. En una realización, el polímero anfifílico de Fórmula (I) como anteriormente comprende un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina de Fórmula (I-b):

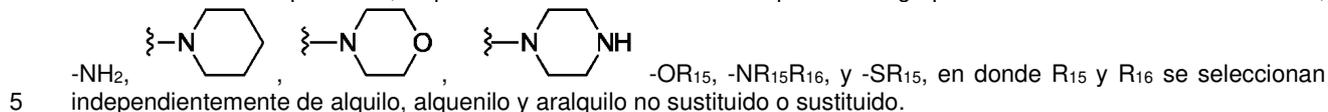


en donde

35 L₅, L₆ y L₇ se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S;

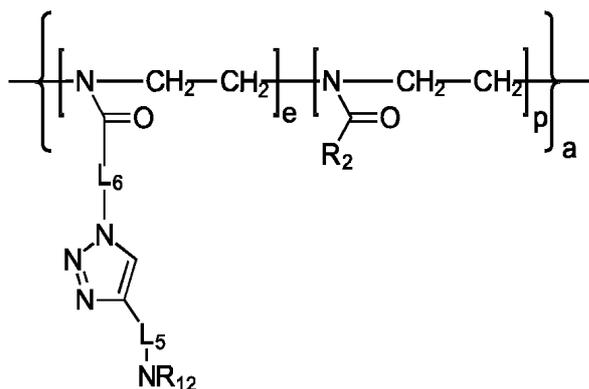
R₁₂ se selecciona de -H(H), -(H)R₁₃, -(R₁₃)₂ o -(R₁₃)₂R₁₄X, en donde R₁₃, R₁₄ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C20 no sustituido o sustituido y aralquilo no sustituido o sustituido, y en donde X es un contraión negativo.

En esta realización particular, el polímero anfifílico también comprende un grupo terminal Z seleccionado de -OH,



Preferiblemente, L₆ y L₇ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C20, en particular de alquilo C3-C10.

En una realización adicional, f es 0, de modo que A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-c):



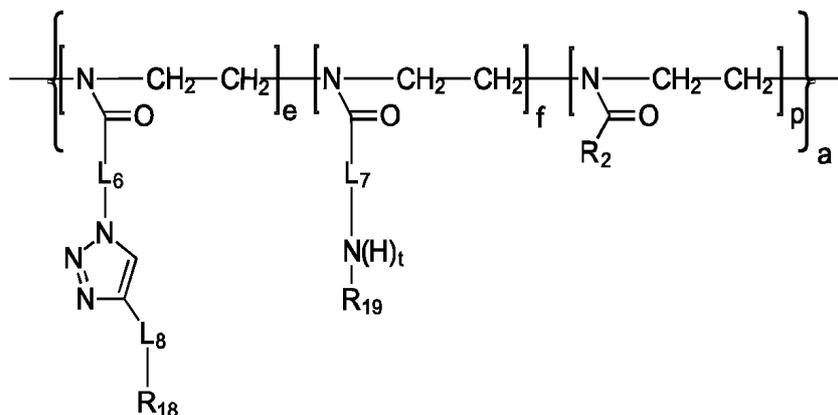
10 En este caso, el copolímero de poli-2-oxazolina se deriva de dos monómeros de 2-oxazolina.

Preferiblemente, R₂ en la Fórmula (I-b) o en la Fórmula (I-c) es un grupo alquilo o aralquilo C1-C20; en particular, el sustituyente R₂ puede ser un alquilo C1-C10 tal como metilo o etilo. También se prefieren realizaciones en las que L₅ es un alqueno C1-C10, en particular metileno, y donde R₁₂ es -H(H), -(H)R₁₃, -(R₁₃)₂ o -(R₁₃)₂R₁₄X, donde R₁₃, R₁₄ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C5 no sustituido; en particular, metilo.

15 Preferencias adicionales para el polímero anfifílico que comprende un segmento hidrófilo de Fórmula (I-a), (I-b) o (I-c) incluyen realizaciones donde e se selecciona como 0 y f se selecciona del intervalo de 1 a 20; o donde f se selecciona como 0 y e se selecciona del intervalo de 1-20.

20 Los polímeros anfifílicos que comprenden un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina de Fórmula (I-b) o Fórmula (I-c), y las partículas auto-ensambladas que comprenden y se preparan a partir de ellos se encuentran, en particular, que son útiles para la administración de genes y la terapia génica. En otra realización adicional, las partículas auto-ensambladas que comprenden tales polímeros anfifílicos comprenden además un gen o fragmento de gen o derivados (por ejemplo, ADN, plásmidos, ARN pequeño de interferencia (ARNip), etc.). Los grupos funcionales amino pendientes en tales polímeros anfifílicos pueden cargarse positivamente en condiciones fisiológicas normales, lo cual es útil para la incorporación del material genético.

25 En otra realización adicional, el polímero anfifílico de Fórmula (I) como se describió anteriormente comprende un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-d):



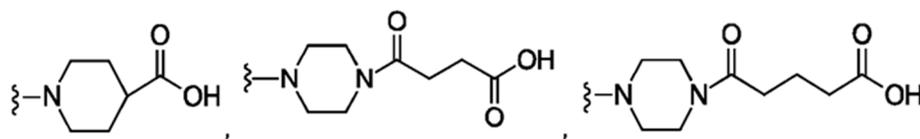
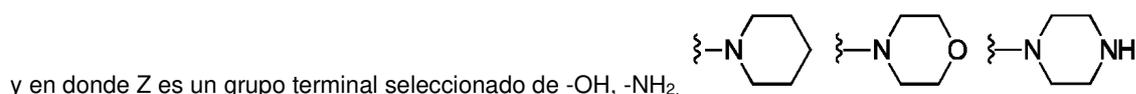
en donde

R₁₈ y R₁₉ se seleccionan independientemente para cada unidad monomérica de un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un ligando, y un sustituyente preferiblemente seleccionado de hidrógeno, alquileo C1-C20, y arileno C1-C20; siempre que, para al menos una unidad monomérica, R₁₈ y/o R₁₉ sea un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o un ligando;

L₆ y L₇ se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S;

L₈ es un conector divalente de fórmula -R₂₀(Y)_s, en donde R₂₀ es un alquileo o arileno C1-C20, o un grupo alquileo o arileno C1-C20 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S; Y es -S-S-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)O-, -NHC(O)NH-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHC(S)NH-, -NH- y -C(O)-NH-N=, y s es 0, 1 o 2;

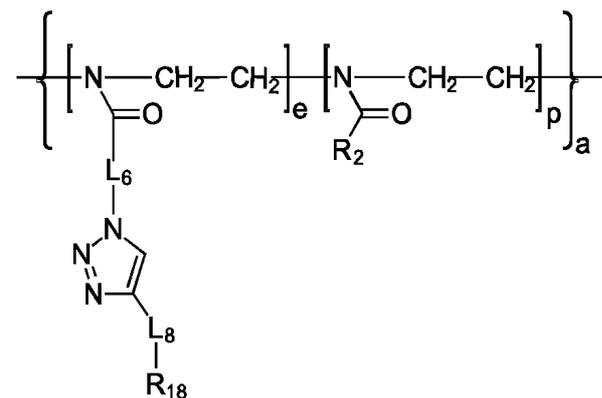
t se selecciona de un número entero de 0 o 1;



-OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆, en donde R₁₆ y R₁₇ se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno o aralquilo no sustituido o sustituido.

Debe entenderse que la frase que se refiere a la selección independiente para R₁₈ R₁₉ para cada unidad monomérica se refiere también a la selección independiente para cada uno de los restos R₁₈ y R₁₉, de un agente de diagnóstico, de un agente terapéutico, de un ligando o de un sustituyente. Los restos R₁₈ y R₁₉ de las unidades de monómero son sustituyentes distintos de un ligando, de un agente de diagnóstico o de un agente terapéutico, sustituyentes particularmente preferidos son hidrógeno (H), alquileo C1-C20 o arileno C1-C20.

Sin embargo, en una realización preferida, todas las unidades monoméricas definidas por el número entero e y/o f pueden comprender uno o más de agente de diagnóstico, agente terapéutico, ligando o combinaciones de los mismos. En una realización adicional de la Fórmula (I-d), f es 0, de modo que A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolona hidrófilo de Fórmula (I-e):

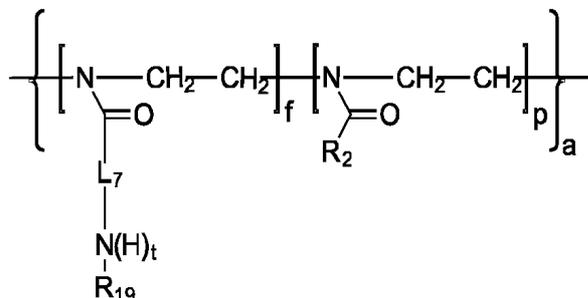


en donde R₁₈ se selecciona independientemente para cada unidad monomérica de un agente terapéutico o de un agente de diagnóstico o de un sustituyente que no sea un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, siempre que, para al menos una unidad monomérica, R₁₈ sea un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o un ligando. El sustituyente se selecciona preferiblemente de hidrógeno, alquileo C1-C20 y arileno C1-C20. El agente terapéutico se selecciona preferiblemente de un agente quimioterapéutico y antineoplásico tal como doxorubicina o taxol. El agente de diagnóstico se selecciona preferiblemente de un tinte fluorescente, un radiomarcador, un agente de imagen PET (por sus siglas en inglés), un agente de imagen MRI (por sus siglas en inglés) y un sensibilizador. En una realización, el agente de diagnóstico se selecciona de agentes de imagen fotoacústica.

En general, la unión covalente o conjugación de un agente terapéutico tal como un fármaco a los polímeros anfífilos de la invención se logra por la reacción de un grupo químico activo en la porción del polímero con un grupo químico funcional complementario en el agente terapéutico. En una opción, la unión covalente se produce en la parte del

conector (es decir, L_8). Preferiblemente, L_8 comprende un enlace hidrolizable, que a menudo es útil para la liberación in vivo del fármaco. Enlaces hidrolizables preferidos incluyen enlaces éster, carbamato, amida, urea y tiourea.

En otra realización adicional de la Fórmula (I-d), e es 0, de modo que A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-f):



5

en donde R_{19} se selecciona independientemente para cada unidad monomérica de un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un sustituyente preferiblemente seleccionado de hidrógeno, alquileo C1-C20 y arileno C1-C20, siempre que, para al menos una unidad monomérica, R_{19} sea un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o un ligando. El agente terapéutico se selecciona preferiblemente de un agente quimioterapéutico o antineoplásico tal como doxorrubicina o taxol. El agente de diagnóstico se selecciona preferiblemente de un tinte fluorescente, un radiomarcador, un agente de imagen PET (por sus siglas en inglés), un agente de imagen MRI (por sus siglas en inglés) y un sensibilizador. En una realización, el agente de diagnóstico se selecciona de agentes de imagen fotoacústica.

El segmento de copolímero de Fórmula (I-d) o (I-e), por ejemplo, puede comprender unidades monoméricas en donde el resto R_{18} es un agente de diagnóstico y también unidades monoméricas en donde el resto R_{18} es un agente terapéutico. Asimismo, el segmento de copolímero de Fórmula (I-d) o (I-f) también puede comprender unidades monoméricas en donde el resto R_{19} es un agente de diagnóstico y también unidades monoméricas en donde R_{19} es un agente terapéutico. En otras realizaciones del segmento de copolímero de Fórmula (I-d), las unidades monoméricas definidas por el número entero e pueden comprender unidades monoméricas en donde R_{18} es un agente terapéutico, y unidades monoméricas definidas por el número entero f que comprenden unidades monoméricas en donde R_{19} es un sustituyente distinto de un agente de diagnóstico o de un agente terapéutico, o en donde R_{19} es un agente de diagnóstico. En otro ejemplo, el segmento de copolímero de Fórmula (I-d) o (I-e) puede comprender unidades monoméricas definidas por el número entero e en donde R_{18} es un agente terapéutico, así como unidades monoméricas en donde R_{18} es un segundo agente terapéutico.

Preferiblemente, L_6 de Fórmula (I-d) y L_7 de Fórmula (I-f) se seleccionan de alquilo C1-C20, en particular de alquilo C3-C10. Los polímeros anfífilicos de Fórmula (I) se pueden preparar según dos métodos generales. En un método, el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo y el segmento B de polisiloxano hidrófobo se preparan independientemente, y luego se unen mediante una reacción entre dos grupos funcionales activos en los respectivos terminales extremos de los polímeros. En un ejemplo de este método, el copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo comprende un grupo funcional azida en un extremo terminal, mientras que el segmento B de polisiloxano comprende un grupo funcional alquínilo en un extremo terminal (o viceversa); los segmentos A y B se unen a través de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar (también conocida como una cicloadición azida-alquino 1,3-dipolar o [3+2] o como una reacción 'clic').

En el segundo método general de preparación de un polímero anfífilico de Fórmula (I), un segmento A hidrófilo o un segmento B hidrófobo se prepara y modifica independientemente para servir como un precursor e iniciador adecuado en la polimerización del segundo segmento.

En una realización de la invención, se prepara un polímero anfífilico de Fórmula (I) a partir de un segmento B hidrófobo que está funcionalizado en uno o ambos extremos terminales de la cadena de polímero con un grupo iniciador tal como -Br, -I, -OMs (-O-SO₂CH₃, mesilato), -OTs (-O-SO₂-C₆H₄-p-CH₃, o tosilato), -OTf (-O-SO₂-CF₃, triflato). El grupo iniciador más preferido es el triflato. El segmento o segmentos A de polímero de poli-2-oxazolina A se prepara(n) a partir de este precursor, también denominado en el presente documento como macroiniciador, por medio de un proceso de polimerización catiónico viviente. Dicho proceso comprende las etapas de iniciación y de propagación de la cadena mediante la adición de un monómero de 2-oxazolina al macroiniciador, y una etapa de terminación, tal como mediante la adición de un reactivo nucleófilo (por ejemplo, un hidróxido, piperazina, o azida, etc.). Se puede añadir un catalizador para promover el proceso de polimerización.

Estos métodos también se pueden aplicar a la síntesis de un polímero anfífilico de Fórmula general (II).

Este proceso de polimerización se lleva a cabo preferiblemente en disolventes sustancialmente inertes tales como, hexano, tolueno, benceno, cloroformo, o disolventes apróticos polares tales como, acetato de etilo, acetonitrilo, DMF,

DMSO, diclorometano, o mezclas de los mismos. Disolventes preferidos para la polimerización son cloroformo y acetonitrilo.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de polimerización para formar el segmento de polímero de poli-2-oxazolina se puede llevar a cabo de varias maneras. En una realización, se hace reaccionar una mezcla de dos o más monómeros de 2-oxazolina apropiados con el macroiniciador de polisiloxano hidrófobo para producir un segmento de copolímero aleatorio. En otra realización, el segmento A de poli-2-oxazolina se puede sintetizar en bloques iniciando la polimerización con un iniciador de polisiloxano apropiado con un primer monómero de 2-oxazolina, seguido de la adición de un segundo monómero de 2-oxazolina cuando la polimerización del primer bloque está completa. La adición del segundo monómero de 2-oxazolina reinicia la polimerización con el catión viviente en el extremo de la cadena del polímero. Las condiciones de reacción pueden diferir para cada etapa. En ambos procesos, el proceso de polimerización se termina mediante la adición de un reactivo nucleofílico.

En una realización preferida, la invención proporciona un método para preparar un polímero anfífilo de Fórmula (I) que comprende una etapa de polimerización de apertura de anillo catiónico de un iniciador de polisiloxano con al menos un monómero de 2-(azidoalquil)-2-oxazolina y al menos un monómero de 2-alquil-2-oxazolina o de 2-arálquil-2-oxazolina. En particular, los polímeros anfífilos que comprenden un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de la presente invención se pueden preparar mediante copolimerización de al menos dos 2-oxazinas 2-sustituidas, preferiblemente una 2-(azidoalquil)-2-oxazolina y una 2-alquil-2-oxazolina o un monómero de 2-arálquil-2-oxazolina, usando un segmento B de polidimetilsiloxano hidrófobo funcionalizado con triflato como microiniciador.

Los polímeros anfífilos resultantes de estos procesos de polimerización son muy versátiles con respecto a una funcionalización adicional. Esto proporciona, a su vez, un enfoque fácil y modular para la preparación de las partículas auto-ensambladas de la invención, y para ajustar sus propiedades. Por ejemplo, los segmentos de poli-2-oxazolina se pueden modificar, por ejemplo, con la adición de conectores y/o de un agente activo tal como un agente de diagnóstico, un ligando, o un agente terapéutico.

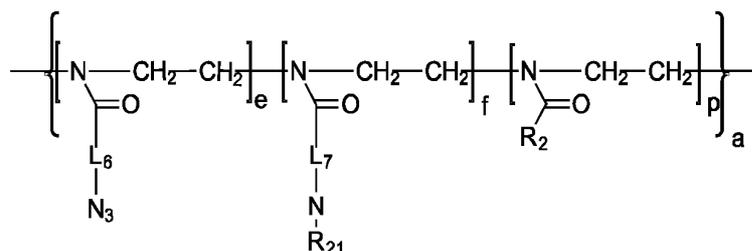
Los métodos para preparar un polímero anfífilo de Fórmula (I) como se describió anteriormente pueden comprender además una etapa de reducción de azida y/o una etapa de cicloadición dipolar 1,3 con un compuesto alquinílico.

En general, un polímero anfífilo que comprende un grupo funcional azida se puede usar como precursor de un polímero anfífilo con un grupo funcional amino. Si bien se contempla que cualquier reacción de reducción de azida o condiciones de reacción conocidas en la técnica se pueden usar para este propósito, se prefieren métodos que sean suaves y que sean compatibles con los elementos estructurales del polímero anfífilo (especialmente el segmento de polisiloxano lábil a los ácidos). Se ha encontrado que los tioles son reactivos particularmente adecuados para reducir los grupos funcionales azida en los polímeros anfífilos de la invención.

La funcionalidad azida también se puede usar como un compañero para una cicloadición 1,3 dipolar con una entidad que comprende un grupo funcional alquinilo. El aducto de triazol resultante puede servir como un medio selectivo para unir covalentemente el polímero anfífilo a, por ejemplo, un agente farmacéutico activo, o a un ligando. Las condiciones de reacción para estas reacciones son típicamente suaves y, por lo tanto, particularmente susceptibles de un acoplamiento selectivo del polímero anfífilo a compuestos y moléculas que comprenden una funcionalidad sensible o reactiva. En una realización, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar está catalizada por cobre. El catalizador se puede seleccionar de Cu^+ , Cu^{++} , tales como CuI , CuBr , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, complejos de cobre. Aditivos útiles para estas reacciones incluyen, pero no se limitan a, ascorbato de sodio, trietilamina, DIPEA, TBTA (Tris [(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina), PMEDTA (N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentriamina).

Los inventores han descubierto que la introducción de azida a través de un monómero de 2-oxazolina que comprende la funcionalidad descrita anteriormente en el proceso de copolimerización proporciona un manejo versátil para la posterior funcionalización y diversificación de los polímeros anfífilos de la Fórmula general (I), $\text{B}-(\text{L}_0\text{-A-Z})_n$. El grupo funcional azido de tales polímeros anfífilos puede estar sujeto a reacciones de reducción y/o reacciones de cicloadición 1,3-dipolar como se describió anteriormente. Por ejemplo, y como se ejemplifica en el Ejemplo 8 a continuación, al someter un polímero anfífilo que comprende un segmento de Fórmula (I-d) a un proceso que comprende primero una etapa de cicloadición 1,3-dipolar, luego una etapa de reducción de azida que proporciona un aducto de polímero anfífilo que comprende ambos grupos funcionales triazol y amino.

Además, los polímeros anfífilos de la Fórmula general (I) como se describieron anteriormente que comprenden un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina de Fórmula (I-b) o de Fórmula (I-c) se pueden preparar a partir de un polímero anfífilo precursor que comprende un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina de fórmula (I-g):

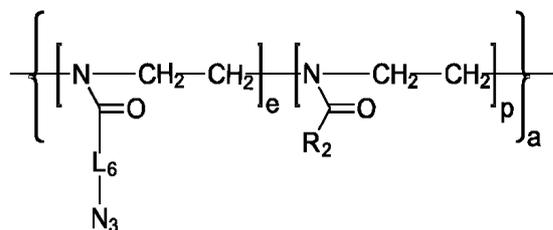


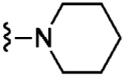
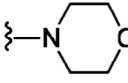
en donde

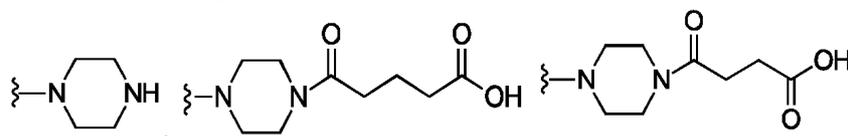
L₆ y L₇ se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por los heteroátomos O, N, S;

- 5 y R₂₁ se selecciona de H(H), H(R₂₂), (R₂₂)₂ y (R₂₂)₂R₂₃X, en donde R₂₂ y R₂₃ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C20 sustituido o no sustituido y aralquilo sustituido o no sustituido, y en donde X es un contraión negativo.

En una realización particular, f es 0 tal que el polímero anfifílico comprende un segmento de copolímero de poli-2-oxazolona hidrófilo de Fórmula (I-h):



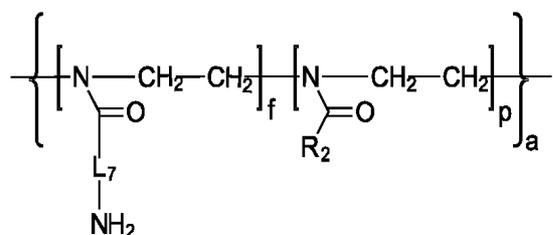
- 10 y en donde Z es un grupo terminal seleccionado de -OH, -N₃, -NH₂, , , -OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆,

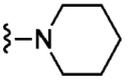
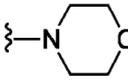


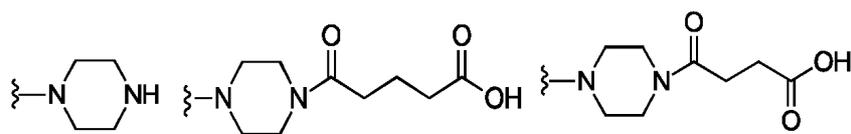
, en donde R₁₆ y R₁₇ se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno y aralquilo no sustituido o sustituido.

- 15 La funcionalidad azida de este polímero anfifílico puede funcionar como un medio directo para unir covalentemente un agente terapéutico a los polímeros anfifílicos de la invención, para proporcionar, por ejemplo, un polímero anfifílico que comprende un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolona hidrófilo de Fórmula (I-e). En tales casos, se puede conjugar directamente un agente terapéutico modificado para comprender un grupo funcional alquilo que contiene al polímero anfifílico a través de una reacción clic de cicloadición 1,3 dipolar.

- 20 En otra realización adicional de un polímero anfifílico que comprende un segmento A de copolímero de poli-2-oxazolona de Fórmula (I-g), e es 0 y R₂₁ es H(H), de modo que A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolona hidrófilo de Fórmula (I-i)



- y en donde Z es un grupo terminal seleccionado de -OH, -N₃, -NH₂, , , -OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆,



, en donde R_{16} y R_{17} se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo y aralquilo no sustituido o sustituido.

La amina primaria libre pendiente de los polímeros anfífilos que comprenden un segmento de Fórmula (I-i) se puede usar como un nucleófilo en reacciones de acoplamiento con agentes de diagnóstico o de terapia fotodinámica. Agentes comerciales que son adecuados para el acoplamiento y que no requieren modificación química se pueden usar directamente (por ejemplo, isocianato de fluoresceína (FITC), isocianato de rodamina), alternativamente, la terapia de fotodinámica o el diagnóstico se puede modificar químicamente para proporcionar un medio para el acoplamiento con el resto de amina primaria colgante del polímero anfílico.

Como se mencionó anteriormente, los polímeros anfífilos de la invención pueden comprender un grupo Z en un extremo terminal del polímero. Cuando el grupo terminal se selecciona como $-OH$, $-NH_2$ o como una amina secundaria, estos se pueden usar adicionalmente como una pareja nucleófila en una reacción de acoplamiento asistida por reactivo con un ligando. Alternativamente, cuando el grupo terminal es una azida, un ligando modificado que comprende un grupo funcional alquínico se puede conjugar al extremo terminal del polímero anfílico a través de una reacción clic de cicloadición 1,3 dipolar.

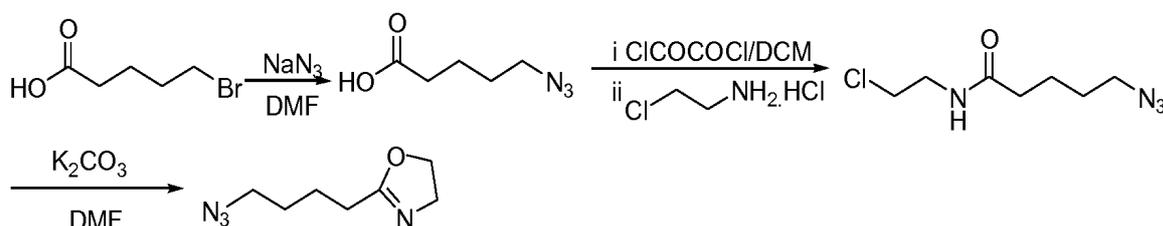
Realizaciones, opciones y/o preferencias adicionales se ilustran mediante los siguientes ejemplos y figuras.

Ejemplos

Síntesis de polímeros anfífilos

Ejemplo 1

Preparación de 2-(4-azidobutil)-oxazolina (1)



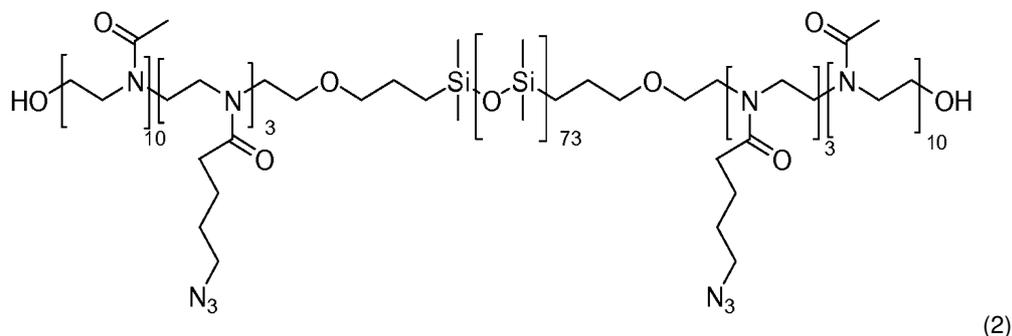
A una disolución de ácido 5-bromopentanoico (5,7 g, 32 mmol) en DMF (40 ml) se le añadió azida sódica sólida (3,0 g, 48 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 70°C y se agitó durante 12 h a la misma temperatura. El disolvente se eliminó a alto vacío para proporcionar un residuo. El residuo se diluyó con diclorometano y se lavó con HCl 0,1 N. La fase acuosa se extrajo con diclorometano dos veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron para proporcionar 2,75 g de ácido 5-azidopentanoico como un aceite amarillo. Rendimiento: 61 % $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9,30(br, 1H), 3,29(t, 2H, $J=6,5$ Hz), 2,37(t, 2H, $J=7,1$ Hz), 1,66(m, 4H) ppm.

Una disolución de ácido 5-azidopentanoico (2,75 g, 19,2 mmol) y una cantidad traza de DMF anhidra en diclorometano (40 ml) se enfrió a 0°C - 4°C en un baño de hielo bajo argón. Luego se añadió gota a gota una disolución de cloruro de oxalilo (4,84 g, 38,4 mmol) en diclorometano seco (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. Se añadió otra disolución de clorhidrato de 2-cloroetilamina (6,68 g, 57,6 mmol) en piridina seca (10 ml). Después de la adición, se retiró el baño de refrigeración. La mezcla se transfirió a un embudo separador y se lavó con HCl acuoso al 10 % y agua, respectivamente. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró por evaporación para producir 1,95 g de 5-azido-N-(2-cloroetil) pentan-amida como un aceite amarillo. Rendimiento: 50 % $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,95(br, 1H), 3,60(m, 4H), 3,30(t, 2H, $J=6,5$ Hz), 2,25(t, 2H, $J=7,4$ Hz), 1,73(m, 2H), 1,65(m, 2H) ppm.

A una disolución de 5-azido-N-(2-cloroetil) pentanamida (1,9 g, 9,3 mmol) en DMF seca (20 ml) se le añadió carbonato de potasio sólido (2,56 g, 18,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 55°C durante 30 h. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se filtró y el sólido se lavó con acetato de etilo varias veces. Las fases orgánicas combinadas se evaporaron y se secaron a alto vacío durante la noche para dar 1,55 g del compuesto (1) como un aceite ligeramente amarillo. Rendimiento: 99 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,25(t, 2H, $J=9,4$ Hz), 3,83(t, 2H, $J=9,4$ Hz), 3,30(t, 2H, $J=6,4$ Hz), 2,33(t, 2H, $J=7,2$ Hz), 1,71(m, 2H), 1,66(m, 2H) ppm.

Ejemplo 2

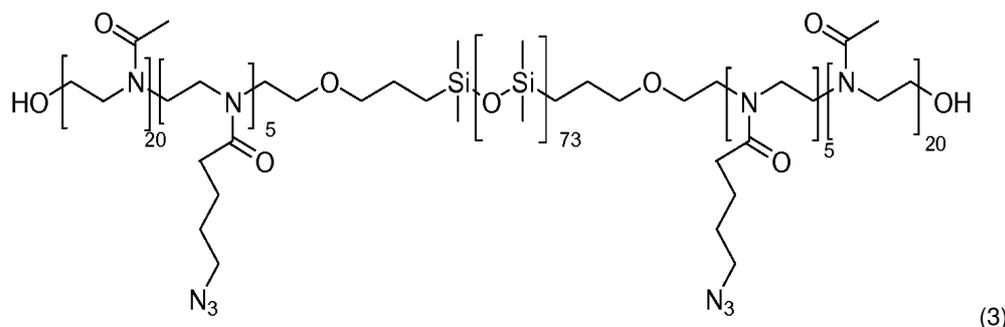
Preparación de



5 A la disolución de poli(dimetilsiloxano), terminado con bis(hidroalquilo) (5,6 g, 1 mmol) en tolueno (25 ml) se le añadió 2,6-lutidina (0,35 ml, 3 mmol), seguido de la adición gota a gota de una disolución de anhídrido trifluorometanosulfónico (0,4 ml, 2,4 mmol) en hexano (2,5 ml) en un baño de hielo bajo argón. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 h. Luego se eliminó el disolvente al vacío para dar un intermedio activo como un aceite amarillo. El aceite se disolvió en un disolvente mixto de cloroformo (15 ml) y acetonitrilo (20 ml). Se añadió un primer monómero, 2-(4-azidobutil)-oxazol (1,03 g, 6,1 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó y se agitó a 60°C durante 43 h. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se añadió el segundo monómero 2-metil-oxazolina (1,7 ml, 20 mmol). La mezcla de reacción se calentó nuevamente a 60°C y se agitó a la misma temperatura durante 48 h, luego se enfrió rápidamente con una disolución de trietilamina en agua a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces. En la primera vez, se añadieron 5 ml de una disolución saturada de NaHCO₃ como eluyente para producir 6,5 g del compuesto (2) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 78 %, ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,30-3,75(m, 128H), 2,30-2,50(m, 12H), 2,05-2,21(m, 60H), 1,50-1,75(m, 28H), 0,50(m, 4H), 0,02-0,09(m, 444H) ppm.

Ejemplo 3

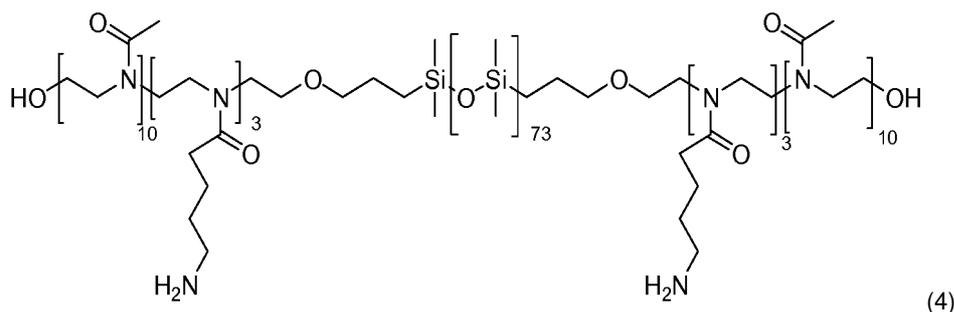
Preparación de



20 El compuesto (3) se preparó en analogía a la síntesis del compuesto (2). Rendimiento: 75 %. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 3,40-3,75(m, 212H), 3,37(m, 24H), 2,30-2,57(m, 20H), 2,05-2,19(m, 120H), 1,58-1,75(m, 44H), 0,56(m, 4H), 0,03-0,17(m, 444H) ppm.

Ejemplo 4

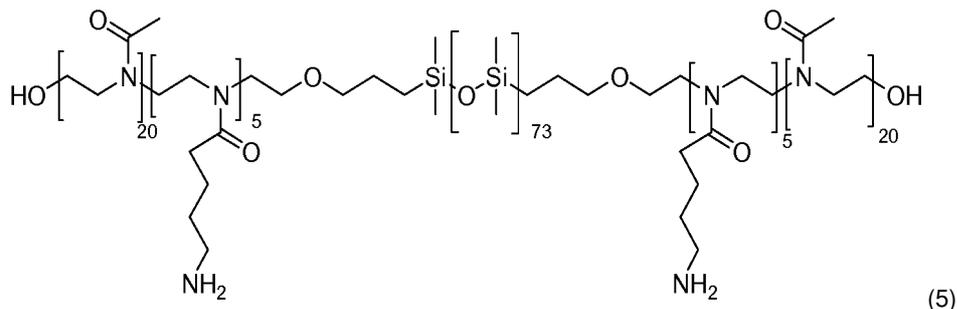
25 Preparación de



5 A una disolución del compuesto (2) (840 mg, 0,1 mmol) en metanol (5 ml) se le añadió trietilamina (0,56 mg, 4,0 mmol) a temperatura ambiente, seguido de la adición de 1,3-propanditiol (0,40 ml, 4,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El disolvente se eliminó al vacío para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 560 mg del compuesto (2) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 67 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 3,38-3,79(m, 116H), 2,68(m, 12H), 2,30-2,53(m, 12H), 2,05-2,15(m, 60H), 1,45-1,70(m, 28H), 0,57(m, 4H), 0,03-0,17(m, 444H) ppm.

Ejemplo 5

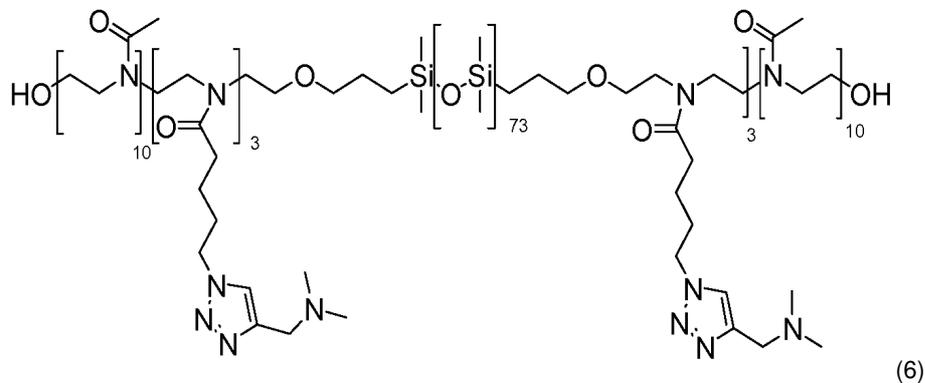
Preparación de



El compuesto (5) se preparó a partir del compuesto (3), en analogía a la preparación del compuesto (4). Rendimiento: 70 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 3,38-3,75(m, 212H), 2,68(m, 20H), 2,30-2,53(m, 20H), 2,05-2,15(m, 120H), 1,45-1,70(m, 44H), 0,57(m, 4H), 0,03-0,17(m, 444H) ppm.

Ejemplo 6

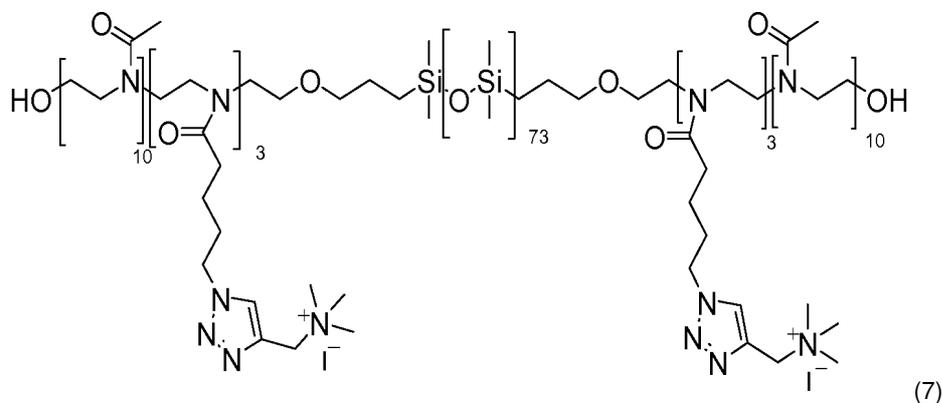
15 Preparación de



A una disolución del compuesto (2) (840 mg, 0,1 mmol) en THF (6 ml, desgasificado con argón antes del uso) se le añadió 3-dimetilamino-1-propino (83 mg, 1,0 m) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 5 minutos a la misma temperatura. Se añadió una disolución acuosa de L-ascorbato de sodio (15 mg, 0,08 mmol) (0,5 ml), seguido de la adición de una disolución acuosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (7,5 mg, 0,03 mmol) (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 780 mg de compuesto (2) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 88 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,93(m, 6H), 4,45(m, 12H), 3,38-3,75(m, 128H), 2,30-2,53(m, 12H), 2,27(s, 36H), 2,05-2,15(m, 60H), 1,95(m, 12H), 1,59(m, 16H), 0,59(m, 4H), 0,05-0,11(m, 444H) ppm.

Ejemplo 7

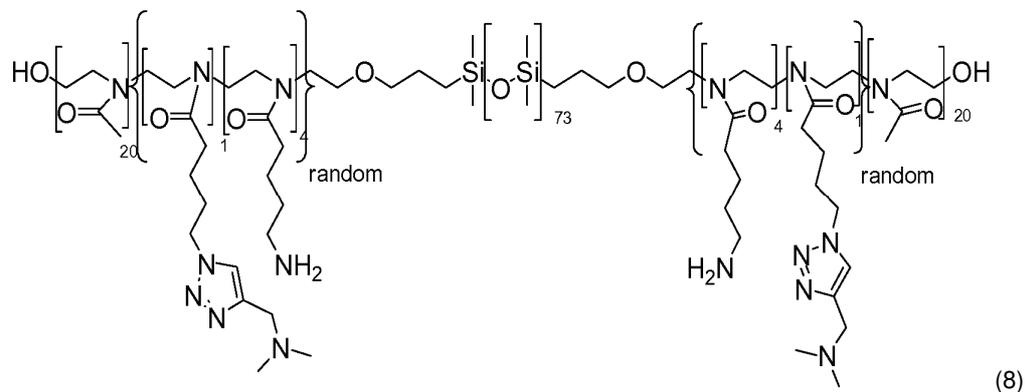
Preparación de



- 5 A una disolución del compuesto (6) (100 mg, 0,011 mmol) en THF (2 ml) se le añadió yoduro de metilo (14,2 mg, 0,10 mmol) en argón a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se lavó con hexano dos veces. Luego se secó a alto vacío para dar 110 mg del compuesto (7) como un sólido amarillo. Rendimiento: 100 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8,30-8,50(m, 6H), 4,50-4,80(m, 24H), 3,38-3,75(m, 116H), 2,94-3,20(m, 54H), 2,40-2,60 (s, 12H), 2,05-2,18(m, 60H), 2,00(m, 12H), 1,60(m, 16H), 0,56(m, 4H), 0,05-0,11(m, 444H) ppm.

10 Ejemplo 8

Preparación de

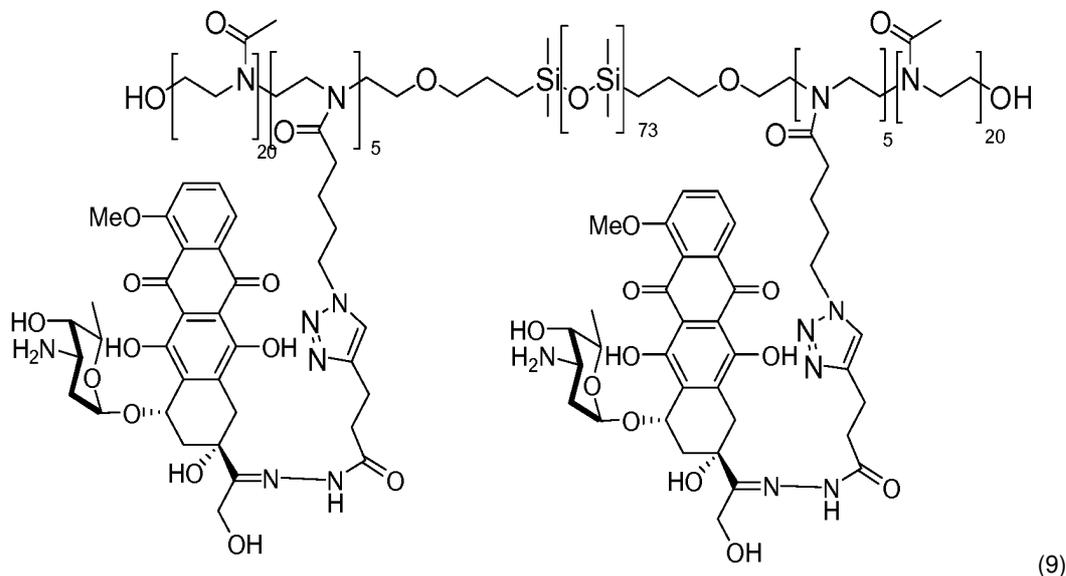


- 15 A una disolución del polímero (3) (550 mg, 0,05 mmol) en THF (4 ml), que se desgasificó bajo argón durante 20 minutos antes, se le añadió una disolución de 3-dimetilamino-1-propino (11,4 mg, 0,13 mmol) en *t*-BuOH (0,3 ml) a temperatura ambiente, seguido de la adición sucesivamente de una disolución acuosa de L-ascorbato sódico (5,4 mg, 0,027 mmol) (0,25 ml) y de una disolución acuosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,4 mg, 0,014 mmol) (0,25 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se eliminó el disolvente por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 500 mg de un intermedio como un sólido de color ligeramente amarillo. Rendimiento: 88 %.

- 25 El intermedio se disolvió en MeOH (3 ml) a temperatura ambiente, se añadieron sucesivamente TEA (0,2 ml, 1,44 mmol) y 1,3-propanodiol (0,15, 1,44 mmol). La mezcla resultante se agitó durante la noche. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 445 mg del compuesto (8) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 89 %. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,93(m, 2H), 4,43(m, 4H), 3,40-3,70(m, 216H), 2,60-2,80(m, 16H), 2,30-2,55(m, 20H), 2,25(s, 12H), 2,05-2,18(m, 120H), 1,90-2,00(m, 4H), 1,50-1,70(m, 40H), 0,59(m, 4H), 0,05-0,15(m, 444H) ppm.

Ejemplo 9

Preparación de



5 A una disolución del polímero (3) (550 mg, 0,05 mmol) en THF (desgasificado, 4 ml) se le añadió una disolución de pent-4-enoato de metilo (84 mg, 0,75 mmol) en *t*-BuOH (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron sucesivamente una disolución acuosa de L-ascorbato de sodio (7,5 mg, 0,04 mmol) (0,25 ml) y CuSO₄·5H₂O acuoso (3,75 mg, 0,015 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El disolvente se eliminó por evaporación para producir un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 430 mg de un intermedio como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 71 %. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,78(m, 10H), 4,38(m, 20H), 3,64(s, 30H), 3,40-3,70(m, 212H), 2,97(m, 20H), 2,70(m, 20H), 2,30-2,55(m, 20H), 2,05-2,18(m, 120H), 1,91(m, 20H), 1,57(m, 24H), 0,54(m, 4H), 0,05-0,15(m, 444H) ppm.

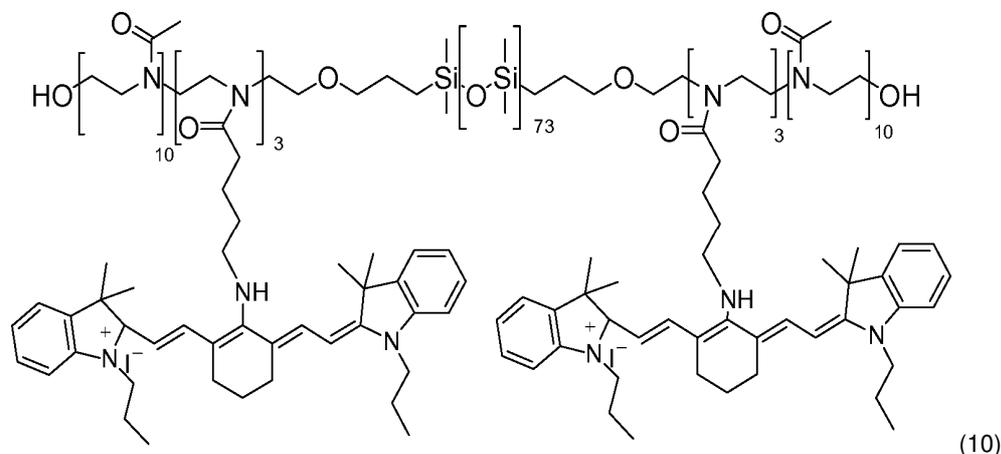
15 A una disolución de polímero intermedio (430 mg, 0,036 mmol) en etanol (5 ml) se le añadió NH₂NH₂·H₂O acuoso (50-60 %, 1 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se continuó agitando durante 12 h. Después de eso, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, lo que hace se pueda purificar directamente por ultrafiltración usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 310 mg de un intermedio de hidrazina como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 71 %. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,75(m, 10H), 4,37(m, 20H), 3,40-3,70(m, 212H), 2,98(t, 20H, J= 7,60 Hz), 2,50(t, 20H, J= 7,60 Hz), 2,30-2,60(m, 20H), 2,05-2,18(m, 120H), 1,90(m, 20H), 1,54(m, 24H), 0,56(m, 4H), 0,05-0,14(m, 444H) ppm.

25 A una disolución de intermedio de hidrazina (50 mg) en metanol (1,5 ml) se le añadió doxorubicina sólida (12 mg) a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se agitó durante 2 minutos. Luego se añadió una cantidad catalítica de TFA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se disolvió en etanol (10 ml) y la disolución se centrifugó. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro PPT (por sus siglas en inglés) (φ= 0,45 μm) para eliminar la doxorubicina sin reaccionar. El disolvente orgánico combinado se concentró al vacío para proporcionar 30 mg de compuesto de polímero-DOX (9) como un sólido rojo oscuro. La cantidad de carga de doxorubicina (peso de DOX/peso de polímero) es de alrededor del 24 %, según lo definido por las mediciones del espectro de UV y por el cálculo según la curva patrón de la absorción de UV del DOX.

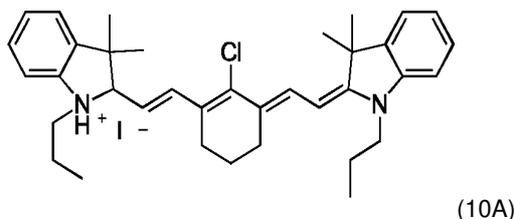
30

Ejemplo 10

Preparación de



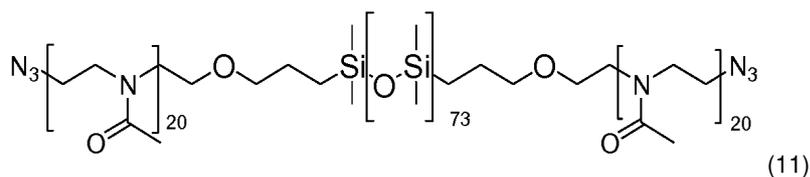
5 A una disolución del polímero (4) (82,0 mg, 0,01 mmol) en acetonitrilo (2mL) se le añadió DIPEA (0,04 ml, 0,3 mmol), seguido de la adición del compuesto (10A) (60mg, 0,09 mmol)



10 La mezcla de reacción se calentó a 80°C y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. Luego se eliminó el disolvente por evaporación para obtener un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 10.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 72 mg del compuesto (10) como un sólido verde oscuro. Rendimiento: 60 %. La longitud de onda de emisión máxima de fluorescencia del compuesto (10) se determinó (longitud de onda de excitación de 635 nm) que era 705 nm.

Ejemplo 11

Preparación de



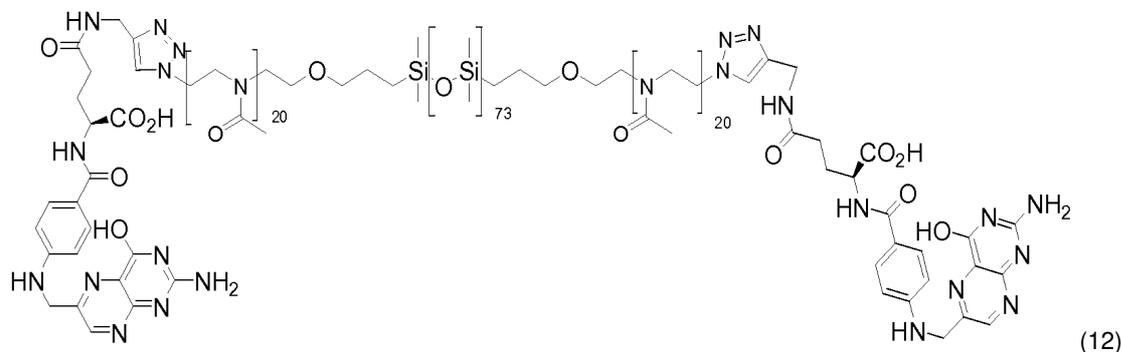
15 A una disolución de poli(dimetilsiloxano), terminado con bis(hidroxiálquilo) (5,6 g, 1 mmol) en tolueno (25 ml), se le añadió 2,6-lutidina (0,35 ml, 3 mmol), seguido de la adición de una disolución de anhídrido de trifluorometanosulfónico (0,4 ml, 2,4 mmol) en hexano (2,5 ml) gota a gota en baño de hielo bajo argón. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 h. Luego se eliminó el disolvente al vacío para dar un intermedio activo como un aceite amarillo. El aceite se disolvió en un disolvente mixto de cloroformo (15 ml) y acetonitrilo (20 ml). Se añadió el monómero 2-metil-oxazolina (3,4 ml, 40 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó nuevamente a 60°C y se agitó a la misma temperatura durante 48 h. Luego se apagó con azida de sodio (2,6 g, 40 mmol) a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por evaporación para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces. En la primera vez, se añadió 5 ml de una disolución saturada de NaHCO₃) como eluyente para producir 6,5 g del compuesto (11) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 72 %, ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,25-3,70(m, 160H), 2,05-2,21(m, 120H), 1,56(m, 4H), 0,50(m, 4H), -0,02-0,20(m, 444 H) ppm.

20

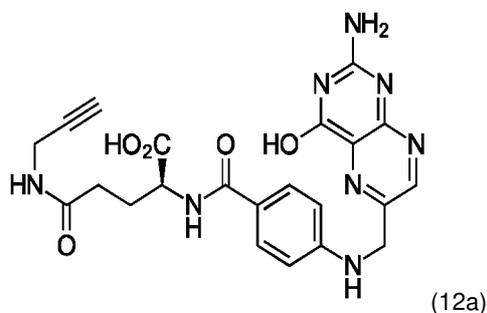
25

Ejemplo 12

Preparación de



- 5 A una disolución del polímero (11) (440 mg, 0,05 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentiaramina (PMDETA, 17,3 mg, 0,1 mmol), seguido por la adición del derivado de folato (12a) (59 mg, 0,12 mmol)



- 10 y de CuBr (14,3mg, 0,1 mmol) sucesivamente a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se expuso al aire y la disolución se hizo pasar a través de una columna de alúmina neutra. La DMF se eliminó al vacío para proporcionar un residuo. El residuo se purificó por ultrafiltración con una membrana de celulosa regenerada (un punto de corte a 5.000 dalton) usando etanol/agua (80:20, v/v, al menos por cuatro veces) como eluyente para producir 245 mg del compuesto (12) como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 50 %. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,72(m, 2H), 7,90(m, 2H), 7,71(m, 4H), 6,74(m, 4H), 4,20-4,90(m, 14H), 3,35-3,70(m, 160H), 1,90-2,25(m, 128H), 1,61(m, 4H), 0,58(m, 4H), 0,05-0,14(m, 444H) ppm.

- 15 Preparación de las partículas auto-ensambladas

Métodos generales de preparación

- 20 Los polímeros anfífilicos de la invención, es decir, las Fórmulas (I)-(II) se usan como componentes para la preparación de partículas auto-ensambladas, en particular micelas y vesículas. En algunas realizaciones, las partículas auto-ensambladas comprenden un agente terapéutico o de diagnóstico independiente, o un oligonucleótido. Las partículas auto-ensambladas se pueden obtener mediante los siguientes métodos:

A.- Nano-precipitación

- 25 Uno o más componentes poliméricos anfífilicos se disuelven en un disolvente orgánico (por ejemplo, etanol) bajo agitación. Luego a esta disolución se le añade gota a gota una disolución acuosa (por ejemplo, PBS). Después de 2 h-24 h de agitación continua, la disolución se filtra a través de filtros de un tamaño de poro definido (por ejemplo, Millex-GV, 0,22 μm; Millipore) para producir una población homogénea de una partícula auto-ensamblada. Este método es particularmente preferido para la preparación de micelas. El disolvente orgánico se elimina por evaporación. Se realiza una purificación adicional sobre una columna de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sepharose 2B). La concentración final de los componentes del polímero anfílico en la disolución de partículas auto-ensambladas varía desde la CMC (concentración crítica micelar) a aproximadamente 50 mg/ml.

- 30 Los disolventes orgánicos usados en el método anterior se pueden seleccionar, pero no se limitan a, disolventes orgánicos miscibles en agua tales como disolventes próticos polares, por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol o disolventes apróticos polares tales como THF, DMF, 1,4-dioxano, DMSO, acetona, acetonitrilo, dimetoxietano DME. Las disoluciones acuosas usadas en el método anterior se pueden seleccionar, pero no se limitan a agua bidestilada; disolución de cloruro de sodio (tal como 9 % en peso); tampones biológicos tales como tampón PBS, tampón Tris; y otras disoluciones de sales inorgánicas tales como disoluciones de
- 35

cloruro de amonio.

B.- Rehidratación de película

5 Uno o más polímeros anfífilos se disuelven en un disolvente orgánico. El disolvente se evapora a alto vacío y la película de polímero resultante se rehidrata en disolución acuosa, luego se extruye a través de un filtro de policarbonato (por ejemplo, tamaño de poro de 0,2 mm) y luego se purifica sobre una columna de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sepharose 2B). Este método es particularmente preferido para la preparación de vesículas.

La concentración final de los componentes del polímero anfílico en la disolución de partículas auto-ensambladas varía desde la CMC (concentración crítica micelar) a aproximadamente 50 mg/ml.

10 Los disolventes orgánicos usados en este método se pueden seleccionar de, pero no se limitan a, disolventes orgánicos volátiles tales como diclorometano, acetona, cloroformo, THF, etanol, metanol. Las disoluciones acuosas usadas en este método se pueden seleccionar de, pero no se limitan a, agua bidestilada; disolución de cloruro de sodio (por ejemplo, 9 % en peso); tampones biológicos tales como tampón PBS, tampón Tris; y otras disoluciones de sales inorgánicas tales como disoluciones de cloruro de amonio.

15 En ambos métodos A y B, se pueden incorporar agentes de diagnóstico o terapéuticos independientes u oligonucleótidos en las partículas auto-ensambladas de la siguiente manera: los agentes que son solubles en un disolvente orgánico (por ejemplo, un fármaco hidrófobo tal como el taxol) se disuelven en el mismo disolvente usado para disolver el polímero anfílico. Los agentes solubles en agua, tales como los oligonucleótidos, se disuelven previamente en una disolución acuosa.

C.- Rehidratación sólida (método de hinchamiento en masa)

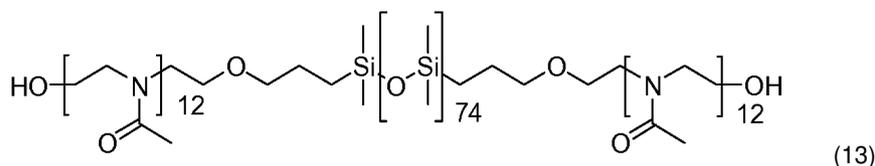
20 Uno o más de los polímeros anfífilos en forma de polvo en masa se añaden directamente a una disolución acuosa. La mezcla se agita continuamente hasta que se observa la hidratación completa del polímero. La mezcla resultante se extruye luego a través de un filtro de policarbonato (por ejemplo, filtro de tamaño de poro de 0,2 mm) y luego se purifica sobre una columna de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sepharose 2B).

25 Las partículas auto-ensambladas de la invención se caracterizan por métodos conocidos en la técnica. Se pueden usar mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) y análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), por ejemplo, para determinar el tamaño de las partículas. El diámetro promedio de las partículas se puede determinar con DLS (por sus siglas en inglés) y confirmar adicionalmente mediante mediciones TEM (por sus siglas en inglés). Las mediciones de DLS (por sus siglas en inglés) se realizan sobre muestras de partículas auto-ensambladas a 25°C en un Malevern Zetasizer NanoS (ZEN 1600). Las imágenes por TEM (por sus siglas) se toman usando un microscopio FEI CM 200 que funciona a un voltaje de aceleración de 200 kV. Para el análisis TEM (por sus siglas en inglés), se disuelve primero una muestra de las partículas auto-ensambladas en agua destilada (1 % en peso en agua) y luego se coloca en una rejilla de cobre cubierta por una película de nitroglicerina revestida con carbono. Luego se añade un agente de tinción (acetato de uranilo al 2 %).

Ejemplo 13 - Micelas que comprenden el polímero anfílico (6)

35 Para preparar las micelas, se disuelven 5 mg del polímero anfílico (6) en 50 µl de etanol bajo agitación. A esta disolución se le añaden, gota a gota, 0,95 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Después de 2 h de agitación continua, la disolución se filtra a través de filtros de un tamaño de poro definido (Millex-GV, 0,22 µm; Millipore) para proporcionar una población homogénea de micelas.

Ejemplo 14 - Micelas que comprenden los polímeros anfífilos (6) y (13)



Para preparar las micelas, se disuelven 5 mg del polímero anfílico (13) y 5 mg del polímero anfílico (6) en 50 µl de etanol bajo agitación. A esta disolución se le añaden gota a gota, 0,95 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Después de 4 h de agitación continua, la disolución se filtra a través de filtros de un tamaño de poro definido (Millex-GV, 0,22 µm; Millipore) para proporcionar una población homogénea de micelas.

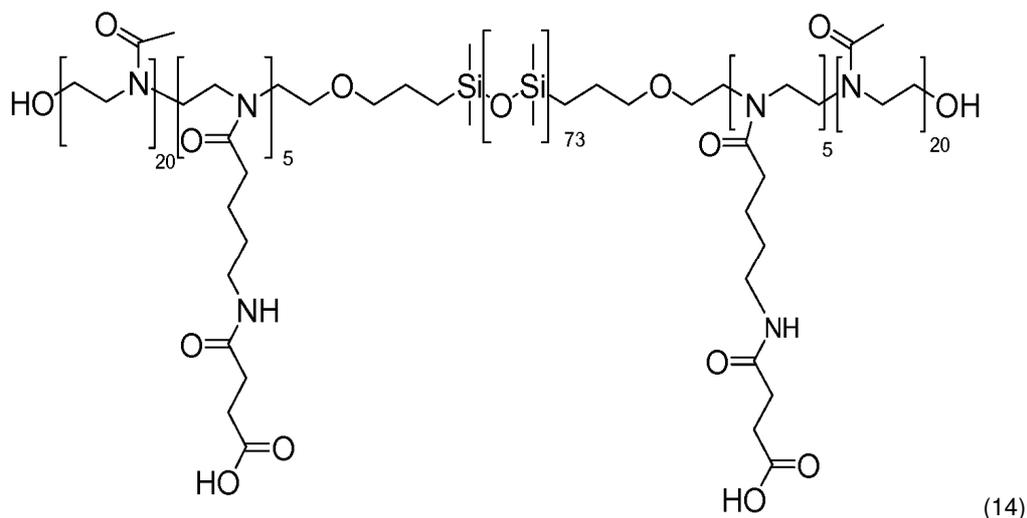
45 Ejemplo 15 - Vesículas que comprenden los polímeros anfífilos (6) y (13)

Para preparar las vesículas, se disuelven 10 mg del polímero (6) y 10 mg del polímero (13) en 10 ml de cloroformo. El disolvente se evapora a alto vacío para proporcionar una película de polímero seco y la película de polímero resultante se rehidrata en 20 ml de tampón 1X PBS (por sus siglas en inglés) (pH = 7,4) durante 12 h con agitación, luego se extruye a través de un filtro de policarbonato (tamaño de poro de 0,2 mm) para producir vesículas

Ejemplo 16 - Micelas que comprenden los polímeros anfifílicos (9) y (12)

Para preparar las micelas, se disuelven 5 mg del polímero (9) (conjugado con doxorubicina), 0,5 mg del polímero (12) en 50 μ l de etanol bajo agitación. A esta disolución se le añadieron gota a gota 0,95 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Después de 5 h de agitación continua, la disolución se filtra a través de filtros de un tamaño de poro definido (Millex-GV, 0,22 μ m; Millipore) para producir una población homogénea de micelas.

Ejemplo 17 - Micelas que comprenden los polímeros anfifílicos (14) y (12) que encapsulan clorhidrato de doxorubicina



Para preparar las micelas, se disuelven 5 mg del polímero (14), 0,5 mg del polímero (12) y 1,5 mg de hidrocloreto de doxorubicina en 50 μ l de etanol bajo agitación. A esta disolución se le añaden gota a gota 0,95 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Después de 6 h de agitación continua, la disolución se filtra a través de filtros de un tamaño de poro definido (Millex-GV, 0,22 μ m; Millipore) para producir una población homogénea de micelas. Las micelas se purifican adicionalmente sobre una columna de exclusión por tamaño para eliminar la doxorubicina no encapsulada usando un tampón de PBS (por sus siglas en inglés) como eluyente. A continuación, la disolución resultante se liofiliza para producir nanopartículas sólidas.

Ejemplo 18 - Micelas que comprenden los polímeros anfifílicos (4) y (12) y que encapsulan ARN pequeño de interferencia (ARNip)

Las micelas cargadas de ARN pequeño de interferencia (ARNip) basadas en los polímeros anfifílicos (4) y (12) se preparan mediante auto-ensamblaje acuoso. Cada uno de los polímeros se disuelve en 200 μ l de etanol bajo agitación para proporcionar disoluciones al 2,5 % (p/v). A continuación, las dos disoluciones de polímero se combinan para así obtener una relación N/P deseada (la relación de moles de los grupos amina del polímero (4) a los moles de fosfato del oligonucleótido), mientras tanto, la mezcla del polímero anfifílico también tiene un contenido del 0,5 % en moles del polímero (12). Posteriormente se añade una cantidad deseada de esta mezcla a 100 μ l de tampón PBS (por sus siglas en inglés) 10 mM que contiene 40 pmol de ARN pequeño de interferencia (ARNip). La mezcla resultante se agita energéticamente durante 2 minutos seguido de agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.

Ejemplo 19 - Micelas que comprenden los polímeros anfifílicos (5) y (12) y que encapsulan ARN pequeño de interferencia (ARNip), modelo de suministro de genes dirigido

Las micelas cargadas de ARN pequeño de interferencia (ARNip) basadas en los polímeros anfifílicos (4) y (12) se prepararon de forma análoga al método descrito en el Ejemplo 18. Los dos polímeros se disuelven en etanol y se mezclan suavemente con 100 μ l de PBS (por sus siglas en inglés) 10 mM pH 7,4 que contiene 40 pmol de ARN pequeño de interferencia (ARNip) para obtener una relación N/P deseada de 5. La mezcla resultante se incubó adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente.

El ARN pequeño de interferencia (ARNip) usado para la carga de micelas fueron ARN pequeño de interferencia (ARNip) anti-GFP marcado con fluorescencia Cy3, ARN pequeño de interferencia (ARNip) anti-GFP y ARN pequeño de interferencia (ARNip) de secuencia aleatoria (Microsynth, Balgach, Suiza). La secuencia de ARN pequeño de interferencia (ARNip) dirigida a GFP es 5-GCA GCA CGA CUU CAA G-3' (sentido) y 5-CGU CGU GCU GAA GUU C-3' (antisentido).

El potencial zeta de las micelas resultantes ("micelas dirigidas") se determinó midiendo la movilidad electroforética. La superficie de partículas de las micelas formadas antes de la adición del ARN pequeño de interferencia (ARNip) (no marcado) también se determinó que era ligeramente positiva (+4 mV), lo que indica que la mayor parte de la carga

positiva está protegida por la cubierta externa de PMOXA. Se determinó que las micelas que comprenden el ARN pequeño de interferencia (ARNip), preparadas a un N/P de 5, tenían una carga ligeramente positiva (+4 mV) y un tamaño de partícula pequeño (diámetro de 21 ± 3 nm). Las nanopartículas con carga superficial casi neutra (potencial zeta entre -10 y +10 mV) generalmente tienen menos probabilidades de afectar a las reacciones inmunológicas in vivo. Para evaluar la estabilidad a largo plazo, estas micelas se almacenaron en PBS (por sus siglas en inglés) (pH = 7,4) a 37°C durante 4 días y se midieron el tamaño y el potencial zeta. Se observó que no había un cambio significativo en el diámetro promedio de las micelas durante el estudio.

Se estudió la eficacia de la absorción celular de las micelas dirigidas cargadas con ARNip marcadas con fluorescencia Cy-3 (que comprenden los polímeros anfifílicos (5) y (12)), así como las micelas no dirigidas (que comprenden solo las micelas del polímero anfifílico (5)) sobre células (HeLa) positivas del receptor de folato (FR) canceroso o sobre células (HEK293) negativas de FR normal. Las células HeLa que expresan proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) se transfectaron en placas de 24 pocillos (Corning) usando las micelas preparadas y Lipofectamina™ RNAiMax como control positivo preparada según el protocolo del fabricante. Se prepararon complejos dentro del pocillo después de lo cual se añadieron las células (10.000 células/pocillo) y el medio. Las células se lavaron después de 24 h con PBS (por sus siglas en inglés) y se añadió medio de crecimiento nuevo después de la incubación a 37°C durante 48 h adicionales. La cuantificación de la regulación negativa de la expresión del gen objetivo se analizó mediante análisis de electrotransferencia (Western blot).

Los resultados del análisis de electrotransferencia (Western blot) demostraron una absorción celular significativa del ARN pequeño de interferencia (ARNip) marcado con fluorescencia Cy3 en células HeLa tratadas con las micelas dirigidas al receptor de ácido fólico después de un tiempo de incubación de 24 h. Se observó una señal más débil para el ARN pequeño de interferencia (ARNip) marcado con Cy3 en las células HeLa tratadas con los complejos no dirigidos (supresión al $92 \pm 4,2$ %). Las células HEK203 negativas para FR normal no demostraron una absorción celular significativa del ARN pequeño de interferencia (ARNip) anti-GFP marcado con Cy3 incluso después de 24 h de incubación. Se determinó que la expresión de GFP (por sus siglas en inglés) se suprimía al $69 \pm 5,5$ % (es decir, una eficiencia de eliminación de aproximadamente el 31 %) con estas micelas dirigidas.

También se examinó una evaluación de la viabilidad de las células HeLa tratadas con las micelas a diversas concentraciones durante períodos de 24 h y 48 h. Se descubrió que la viabilidad celular todavía está por encima del 90 % (en relación con el control de las células no tratadas) después de 48 h de incubación con micelas a una concentración de 50 μ m, es decir, diez veces mayor que la usada en los experimentos de absorción celular.

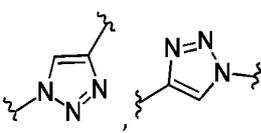
Se cree que la interacción que proporciona la presencia de múltiples grupos amino cargados positivamente característicos del polímero anfifílico (5), con el material de nucleótido cargado negativamente (es decir, el ARN pequeño de interferencia (ARNip)) permite la encapsulación eficiente y, por lo tanto, la protección de dicho material génico contra degradación enzimática y otros procesos fisiológicos. Estas micelas, que tienen, como se describió anteriormente, una carga neta neutra, buena estabilidad coloidal en suero y baja citotoxicidad, son por lo tanto adecuadas para su uso como portadores para la administración de genes. Al mismo tiempo, estas micelas, que también comprenden un polímero anfifílico marcado con ligando, pueden administrar selectivamente el ARN pequeño de interferencia (ARNip) y, por lo tanto, una eficacia de transfección mejorada. También se pueden esperar efectos similares para partículas auto-ensambladas preparadas a partir de los polímeros anfifílicos (6), (7), y (8) como los descritos anteriormente.

REIVINDICACIONES

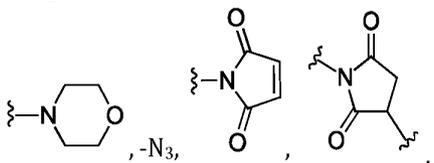
- 1.- Una partícula auto-ensamblada que comprende un polímero anfifílico de la Fórmula general (I):

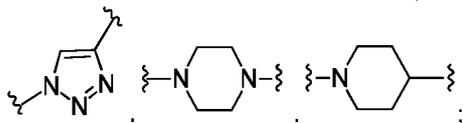
$$B-(L_0-A-Z)_n$$
en donde
5 n es 1 o 2;
B es un segmento de polisiloxano hidrófobo;
 L_0 es un segmento de conector divalente;
A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo; y
Z es un grupo terminal o un conector conjugado a un ligando.
- 10 2.- La partícula auto-ensamblada según la reivindicación 1, que comprende además al menos un polímero anfifílico de la Fórmula (II):

$$B-(L_0-C-Z)_n$$
en donde B, L_0 , Z y n son como se definen en la reivindicación 1
y en donde C es un segmento de homopolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo.
- 15 3.- La partícula auto-ensamblada según la reivindicación 1 o 2, en donde el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo se conjuga con un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, o un ligando tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un polipéptido o un carbohidrato.
- 20 4.- La partícula auto-ensamblada según cualquier reivindicación precedente, en donde el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo se puede obtener a partir de la copolimerización de al menos dos monómeros de 2-oxazolina 2-sustituida, en donde al menos uno de los monómeros es una 2-alkil-2-oxazolina o una 2-aril-2-oxazolina.
- 5.- La partícula auto-ensamblada según cualquier reivindicación precedente, en donde
el segmento B de polisiloxano hidrófobo del polímero anfifílico de la Fórmula general (I) es un segmento de polidimetilsiloxano;
25 el segmento A de copolímero de poli-2-oxazolina comprende al menos un bloque de poli-2-metil-oxazolina,
y en donde Z es un grupo terminal.
- 6.- La partícula auto-ensamblada según las reivindicaciones 2 a 5, en donde
el segmento B de polisiloxano hidrófobo del polímero anfifílico de Fórmula (II) es un polidimetilsiloxano,
y en donde C es una poli-2-metil-oxazolina.
- 30 7.- La partícula auto-ensamblada según cualquier reivindicación precedente, en donde la partícula es una micela o una vesícula, o en donde la partícula es una micela.
- 8.- La partícula auto-ensamblada según cualquier reivindicación precedente, que comprende independientemente un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un oligonucleótido o combinaciones de los mismos.
- 9.- Un polímero anfifílico de la Fórmula general (I)
35
$$B-(L_0-A-Z)_n$$
en donde B, L_0 , A, Z y n son como se definen en la reivindicación 1, y en donde
(a) L_0 es de fórmula $R_8(Q)_u$, en donde
 R_8 se selecciona de un grupo alquileo o arileno que contiene de 1 a 20 átomos de carbono y un grupo alquileo o arileno que contiene de 1 a 20 átomos de carbono interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S;
40 Q se selecciona de -O-, -S-, -S-S-, -NR₉-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -OC(O), C(O)O-, -

NHC(O)NH-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHC(S)NH-, , en donde R₉ es hidrógeno o alquilo C1-C4, y u es 0, 1 o 2;

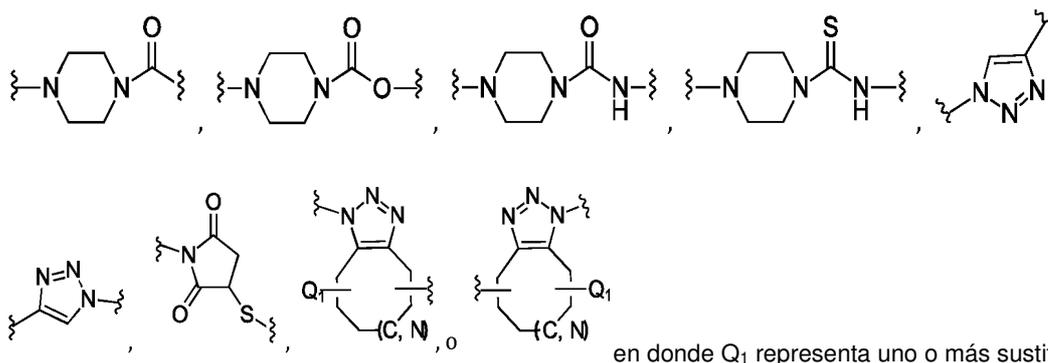
(b) Z es un grupo terminal de fórmula -X₁-Q₀ o un conector conjugado a un ligando de fórmula -L₃-R₁₁, en donde

X₁ se selecciona de -O-, -S-, -NH-, -NR₁₀-, , -N₃,

5 ;

Q₀ está ausente o se selecciona de H, alquilo, alqueno, aralquilo, alquino, heterociclilo, arilo no sustituido o sustituido, -C(O)-(CH₂)_q-COOH, -C(O)O-R₁₀, -(CH₂)_q-C(O)O-R₁₀, -C(O)R₁₀, -NHC(O)-(CH₂)_q-N₃, -(CH₂)_q-N₃, o -SR₁₀, en donde R₁₀ es un grupo alquilo, alqueno o aralquilo no sustituido o sustituido, y q es un número entero de 1 a 10;

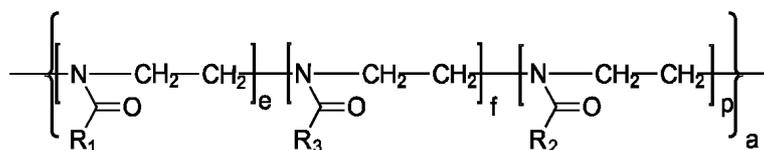
10 L₃ es -S-, -O-, -OC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -NHC(S)NH-, -NHC(O)O-



en donde Q₁ representa uno o más sustituyentes;

R₁₁ es un ligando seleccionado de una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un carbohidrato, y en particular de folato, biotina, o péptidos;

15 (c) A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-a):



en donde

20 R₁ y R₃ se seleccionan independientemente de un conector conjugado a un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, un ligando y un conector que comprende un grupo funcional seleccionado de una amina, una azida, un alquino, un aldehído, un acetal, un alcohol, un ácido carboxílico, un ácido carboxílico activado, una oxiamina, una cetona, un cetal, un éster, una maleimida, una vinilsulfona, un disulfuro de ortopiridilo y un cloroformiato;

R₂ es un grupo alquilo o aralquilo C1-C20;

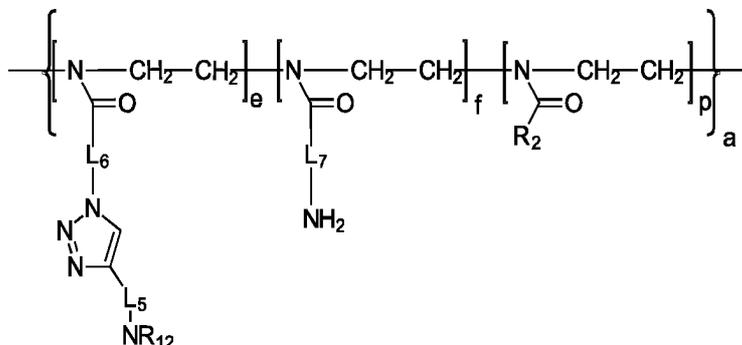
e y f son números enteros seleccionados independientemente de 0-500, siempre que e y f no se seleccionen simultáneamente como 0;

25 p es un número entero seleccionado de 2-500;

a se selecciona de ran y block, en donde ran indica un copolímero aleatorio en donde las unidades definidas por los números enteros e, f y p están en disposición aleatoria, y en donde block indica un copolímero en bloque en

donde las unidades definidas por los enteros e, f, y p son segmentos secuenciales.

10.- El polímero anfifílico según la reivindicación 9, en donde A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-b):

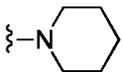
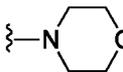
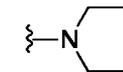


5 en donde

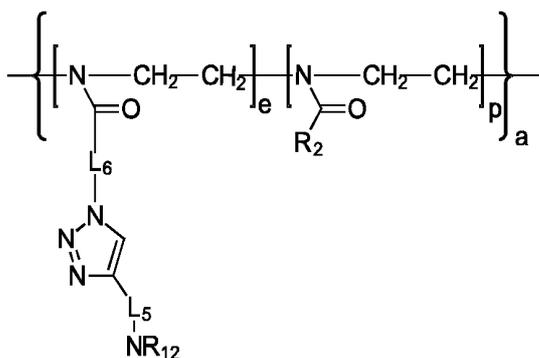
L₅, L₆ y L₇ se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S;

10 R₁₂ se selecciona de -H(H), -(H)R₁₃, -(R₁₃)₂, y -(R₁₃)₂R₁₄X, en donde R₁₃ y R₁₄ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C20 sustituido o no sustituido y aralquilo sustituido o no sustituido, y en donde X es un contraión negativo;

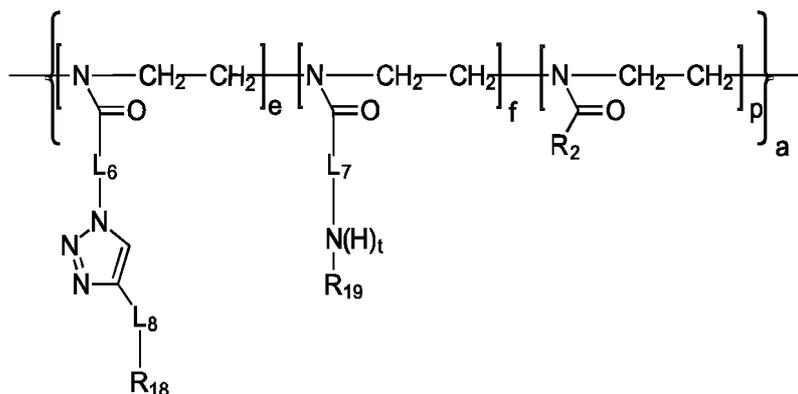
y en donde

Z es un grupo terminal seleccionado de -OH, -NH₂,   , -OR₁₅, -NR₁₅R₁₆, y -SR₁₅, en donde R₁₅ y R₁₆ se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno y aralquilo no sustituido o sustituido;

15 y opcionalmente, en donde f es 0 y en donde A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-c):



11.- El polímero anfifílico según la reivindicación 9, en donde A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-d):



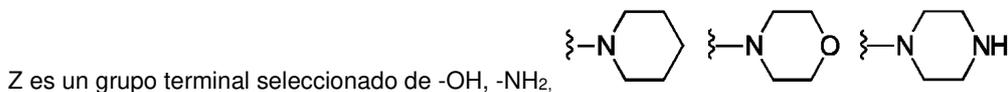
en donde

5 R_{18} y R_{19} se seleccionan independientemente para cada unidad monomérica de un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un ligando, y un sustituyente preferiblemente seleccionado de hidrógeno, alquileo C1-C20, y arileno C1-C20; siempre que, para al menos una unidad monomérica, R_{18} y/o R_{19} sea un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o un ligando;

L_6 y L_7 se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S;

10 L_8 es un conector divalente de fórmula $-R_{20}(Y)_s$, en donde R_{20} es un alquileo o arileno C1-C20, o un grupo alquileo o arileno C1-C20 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S; Y es -S-S-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)O-, -NHC(O)NH-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHC(S)NH-, -NH- y -C(O)-NH-N=, y s es 0, 1 o 2;

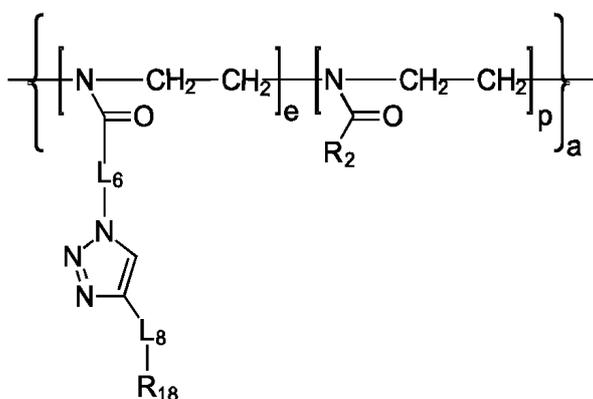
t se selecciona de un número entero de 0 o 1; y en donde



15 , -OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆, en donde R_{16} y R_{17} se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno o aralquilo no sustituido o sustituido;

y opcionalmente en donde:

a) f es 0, y en donde A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolona hidrófilo de Fórmula (I-e):



20 en donde

R_{18} se selecciona independientemente para cada unidad monomérica de un agente, seleccionado preferiblemente

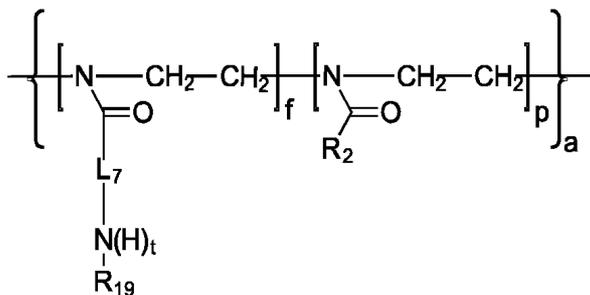
de un agente quimioterapéutico o antineoplásico tal como doxorrubicina o taxol; un agente de diagnóstico, seleccionado preferiblemente de un tinte fluorescente, un radiomarcador, un agente de imagen PET (por sus siglas en inglés), un agente de imagen MRI (por sus siglas en inglés) y un sensibilizador, o seleccionado de agentes de imagen fotoacústica; un sustituyente seleccionado preferiblemente de hidrógeno, alquileo C1-C20 y arileno C1-C20;

5

siempre que, para al menos una unidad monomérica, R₁₈ sea un agente terapéutico o agente de diagnóstico;

o

b) e es 0 y en donde A es un segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-f):



10 en donde

R₁₉ se selecciona independientemente para cada unidad monomérica de un agente terapéutico, preferiblemente seleccionado de un agente quimioterapéutico o antineoplásico tal como doxorrubicina o taxol; un agente de diagnóstico, preferiblemente seleccionado de un tinte fluorescente, un radiomarcador, un agente de imagen PET (por sus siglas en inglés), un agente de imagen MRI (por sus siglas en inglés) y un sensibilizador, o seleccionado de agentes de imagen fotoacústica; o un sustituyente seleccionado preferiblemente de hidrógeno, alquileo C1-C20 y arileno C1-C20;

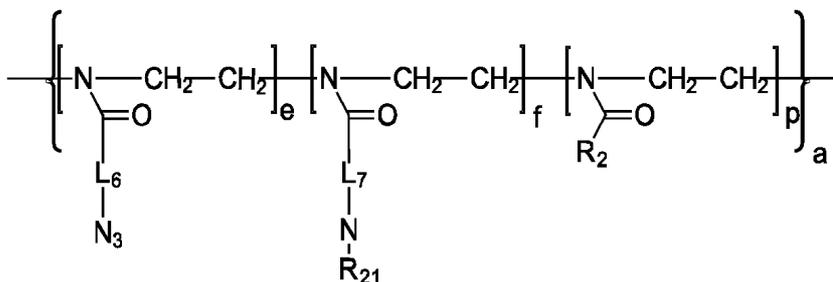
15

siempre que, para al menos una unidad monomérica, R₁₉ sea un agente terapéutico o agente de diagnóstico.

12.- Un método para preparar el polímero anfifílico de la reivindicación 9, que comprende una etapa de polimerización catiónica de apertura de anillo de un iniciador de polisiloxano con al menos un monómero de 2-(azidoalquil)-2-oxazolina y al menos un monómero de 2-alkil-2-oxazolina o de 2-araalkil-2-oxazolina; el método que comprende además opcionalmente una etapa de reducción de azida y/o una etapa de cicloadición dipolar 1,3 con un componente alquínilo.

20

13.- El polímero anfifílico según la reivindicación 9, en donde A es segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-g):



25

en donde

L₆ y L₇ y se seleccionan independientemente de alquileo C1-C20, arileno C4-C12, y alquileo C1-C20 o arileno C4-C12 interrumpido por uno o más de los heteroátomos O, N, S; y

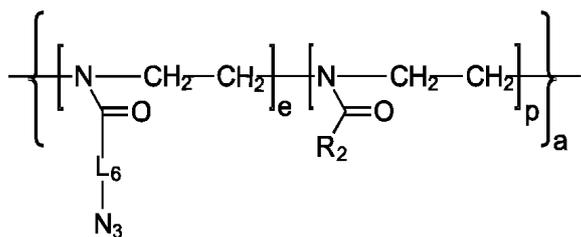
R₂₁ se selecciona de H(H), H(R₂₂), (R₂₂)₂ o (R₂₂)₂R₂₃X, en donde R₂₂ y R₂₃ se seleccionan independientemente de alquilo C1-C20 sustituido o no sustituido y aralquilo sustituido o no sustituido, y X es un contraión negativo.

30

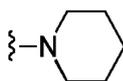
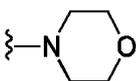
y opcionalmente, en donde

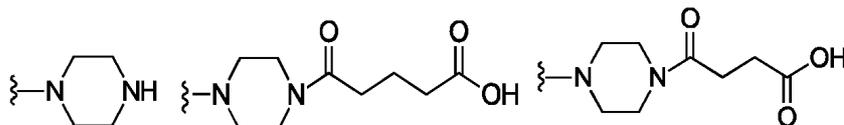
a) f es 0;

A es segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-h):



y en donde

Z es un grupo terminal seleccionado de -OH, -N₃, -NH₂,  , -OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆,



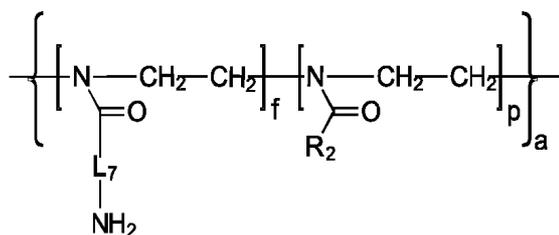
5 seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo y aralquilo no sustituido o sustituido;

o

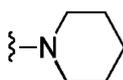
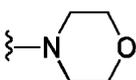
b) e es 0,

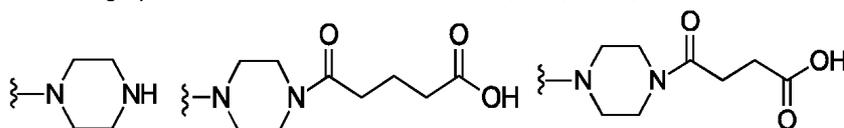
R₂₁ es H(H), y

A es segmento de copolímero de poli-2-oxazolina hidrófilo de Fórmula (I-i):



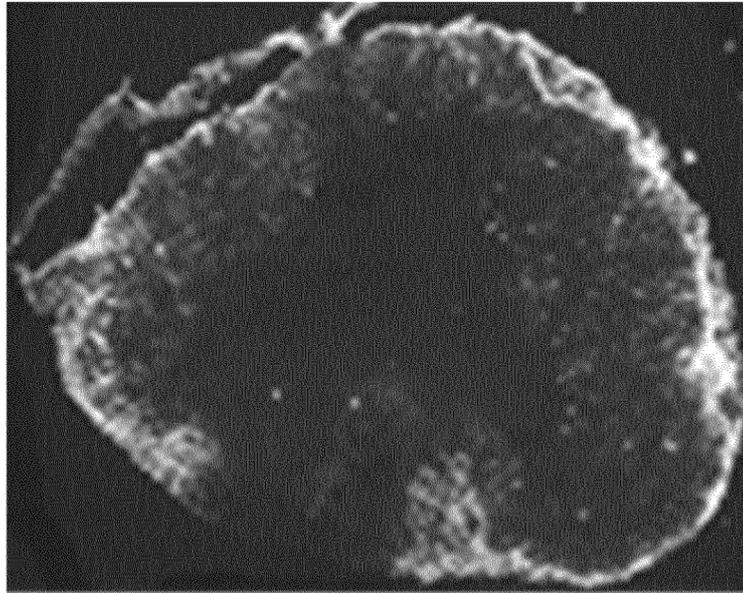
10

Z es un grupo terminal seleccionado de -OH, -N₃, -NH₂,  , -OR₁₆, -NR₁₆R₁₇, -SR₁₆,

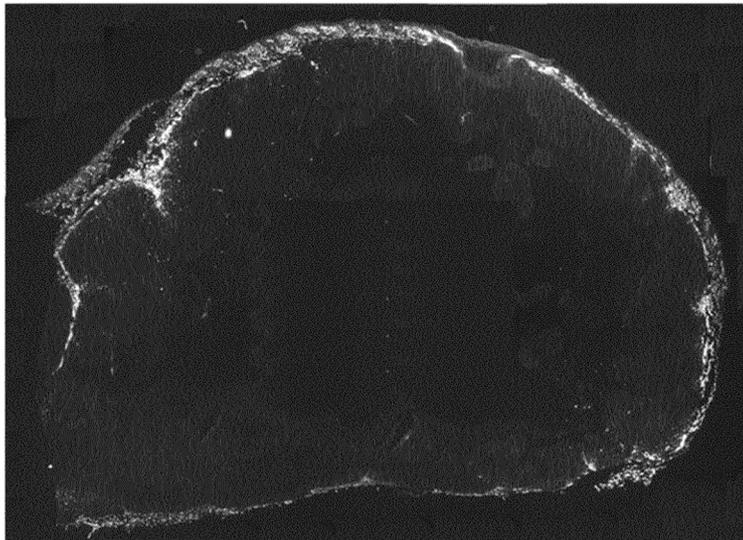


seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo y aralquilo no sustituido o sustituido.

15 14.- La partícula auto-ensamblada según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde Z es un grupo terminal como se define en la reivindicación 9 o un conector conjugado a un ligando seleccionado de una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (fab), un anticuerpo de dominio único, un oligonucleótido, un polipéptido y un carbohidrato.



1 A



1B