

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 887 404**

(51) Int. Cl.:

**C08G 73/02** (2006.01)  
**A61K 47/50** (2007.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080669**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097377**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15823330 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 3242903**

---

### (54) Título: Composiciones para introducir ácido nucleico en células

(30) Prioridad:

**19.12.2014 EP 14199439**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.12.2021**

(73) Titular/es:

**ETHRIS GMBH (100.0%)  
Semmelweisstrasse 3  
82152 Planegg , DE**

(72) Inventor/es:

**DOHMEN, CHRISTIAN;  
PLANK, CHRISTIAN y  
RUDOLPH, CARSTEN**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 887 404 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

Composiciones para introducir ácido nucleico en células

- 5 La presente invención se refiere a polímeros que comprenden unidades de repetición de alquilenamina características que son útiles como vehículos para transfectar una célula con un ácido nucleico, en particular ARN. La presente invención se refiere además a una composición que comprende al menos un ácido nucleico y un polímero que comprende tales unidades de repetición de alquilenamina y a un método para transfectar una célula usando dicha composición. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y sus usos.
- 10 La viabilidad de las terapias con ácido nucleico depende en última instancia de la disponibilidad de métodos eficientes para suministrar ácidos nucleicos a células.
- 15 En el suministro de ácidos nucleicos en general, el uso de ácidos nucleicos desnudos es adecuado y suficiente en algunos casos para transfectar células (Wolff *et al.* 1990, *Science*, 247, 1465-1468). Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones prácticas previstas, es ventajoso o incluso necesario formular el ácido nucleico con al menos un segundo agente que proteja el ácido nucleico de la degradación durante el suministro y/o facilite la distribución a y en un tejido diana y/o facilite la captación celular y permita un procesamiento intracelular adecuado. Tales formulaciones para el suministro de ácido nucleico se denominan vectores en la bibliografía científica. Una gran variedad de compuestos para la vectorización de ácidos nucleicos, los denominados reactivos de transfección, se han descrito previamente. Estos compuestos son habitualmente o bien policationes o bien composiciones que comprenden lípidos catiónicos o compuestos similares a lípidos tales como lipidoides (documento US 8.450.298). Los complejos de ácidos nucleicos con policationes se denominan poliplexos, aquellos con lípidos catiónicos se denominan lipoplexos (Felgner *et al.* 1997, *Hum Gene Ther*, 8, 511-512). También se han descrito complejos que comprenden tanto un polication como lípidos (Li y Huang en "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press 1999, capítulo 13, 295-303). Se usan reactivos de transfección para unir y compactar ácidos nucleicos para dar como resultado complejos primarios en el intervalo de tamaño nanométrico. En medios que contienen sal, estos complejos tienden a agregarse, también conocido como agregación inducida por sal, lo que puede ser ventajoso para la transfección en cultivo celular o administración localizada *in vivo* (Ogris *et al.* 1998, *Gene Ther*, 5, 1425-1433; Ogris *et al.* 2001, *AAPS PharmSci*, 3, E21). Puede evitarse la agregación y pueden estabilizarse complejos de ácidos nucleicos con reactivos de transfección mediante protección superficial con polímeros tales como poli(etilenglicol). La protección también se usa para evitar la opsonización de y la activación del complemento por complejos de ácido nucleico con reactivos de transfección (Finsinger *et al.* 2000, *Gene Ther*, 7, 1183-1192). La compactación de ácidos nucleicos por reactivos de transfección no solo los protege contra la degradación por nucleasas, sino que también los hace adecuados para la captación celular por endocitosis. Numerosos policationes lineales y ramificados son adecuados para unirse a y compactar ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a, poli(etilenimina), dendrimeros de poli(amidoamina), polí(metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo) (pDMAEMA) o derivados catiónicos de poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (pHPMA), poli(beta-aminoéster)es (Akinc *et al.*, 2003, *Bioconj Chem* 14(5):979-88), péptidos o polí(aminoácidos) catiónicos naturales y sintéticos tales como poli(lisinas), histonas, proteínas HMG o hidratos de carbono catiónicos tales como quitosanos. Además de polímeros que contienen aminas primarias, secundarias y/o terciarias, las estructuras mencionadas anteriormente que contienen restos guanidilo son una clase importante de moléculas para el propósito de la complejación y el suministro de ácidos nucleicos. Los polímeros modificados con guanidilo como estructuras basadas en arginina (Yamanouchi *et al.* 2008, *Biomaterials* 29(22):3269-77), PAMAM modificado con arginina (Son *et al.* 2013, *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol 34 n.º 3) o PEI guadinalizada (Lee *et al.* 2008, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, vol. 29, n.º 3) han destacado la eficiencia de tales sistemas. Especialmente en caso de interacción con ARN, las características moleculares del resto guanidilo presentan propiedades de unión únicas (Calnan *et al.* 19991, *Science* 252(5009), 1167-1171). Para la generación de tales estructuras, pueden usarse métodos revisados por Katritzky y Rogovoy (Katritzky & Rogovoy 2005, ARKIVOC (iv) 49-87). A menudo, los poliplexos se modifican adicionalmente para contener un resto de direccionamiento celular o de direccionamiento intracelular y/o un componente desestabilizadores de la membrana tal como un virus inactivado (Curiel *et al.* 1991, ProcNatl Acad Sci USA, 88, 8850-8854), una cápside viral o una proteína o péptido viral (Fender *et al.* 1997, Nat Biotechnol, 15, 52-56, Zhang *et al.* 1999, *Gene Ther*, 6, 171-181) o un péptido sintético disruptivo de membrana (Wagner *et al.* 1992, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 7934-7938, Plank *et al.* 1994, *J Biol Chem*, 269, 12918-12924).
- 45 Tras la captación endocítica, los complejos se secuestran en vesículas intracelulares tales como endosomas y lisosomas donde se exponen a la maquinaria de degradación celular. Por lo tanto, se ha reconocido que el escape de las vesículas intracelulares es esencial para el suministro eficiente de ácido nucleico funcional, un requisito que también se aplica para la infección viral funcional (Wagner *et al.* 1992, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 7934-7938, Plank *et al.* 1994, *J Biol Chem*, 269, 12918-12924). Los mecanismos que la naturaleza ha desarrollado para la infectividad viral se han imitado para lograr un suministro de ácido nucleico eficiente por vectores sintéticos. Para este fin, se han usado péptidos anfífilos desestabilizadores de la membrana tales como los péptidos INF, GALA y KALA o melitina y derivados de melitina (Boecler *et al.* 2006, *J. Control Release*, 112, 240-248) con gran éxito para complementar los reactivos de transfección policationicos con funcionalidad de escape endosómico (Plank *et al.* 1998, *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35). En lipoplexos, tal funcionalidad es inherente a la capacidad de sus restos lipídicos para fusionarse con membranas celulares (Xu y Szoka 1996, *Biochemistry*, 35, 5616-5623, Zelphati y Szoka 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93, 11493-11498). Desde el artículo fundamental de Boussif *et al.* (Boussif *et al.* 1995, Proc Natl Acad Sci USA,
- 55
- 60
- 65

92, 7297-7301) se sabe que la funcionalidad de escape endosómico de los poliplexos puede realizarse por medios fisicoquímicos. Cuando se usa poli(etilenimina) (PEI) como polication para formar poliplexos, su capacidad tamponante a pH ácido es suficiente para desencadenar el escape endosómico. Se sabe que la luz de los endosomas está acidificada por una bomba de protones que reside en las membranas endosómicas (Lafourcade *et al.* 2008, PLoS One, 3, e2758). Esta acidificación es el desencadenante para el escape endosómico de algunos virus tales como influenza o adenovirus. La denominada teoría de la esponja de protones, respaldada por evidencia experimental, describe la supuesta acción mecánica de polímeros que comprenden características estructurales químicas de PEI: Una fracción sustancial de los grupos amino de PEI no están protonados a pH neutro (fisiológico) (Ziebarth y Wang 2010, Biomacromolecules, 11, 29-38). En virtud de los grupos amino protonados y, por lo tanto, cargados positivamente, los polímeros de tipo PEI pueden unirse y compactar ácidos nucleicos. Las aminas no protonadas pueden protonarse a pH ácido y, por lo tanto, tienen capacidad tamponante dentro de los endosomas. La acidificación endosómica por la bomba de protones va acompañada de la acumulación de iones cloruro (Sonawane *et al.* 2003, J Biol Chem, 278, 44826-44831). En presencia de una molécula tamponante tal como PEI en la luz endosómica, la bomba de protones transportará muchos más protones a la luz endosómica, junto con la acumulación de cloruro, como lo haría en su ausencia hasta que se alcanza el pH endosómico ácido natural. Se cree que la acumulación desproporcionada de iones dentro de los endosomas conduce a una desestabilización osmótica de las vesículas, lo que conduce en última instancia a la ruptura de la vesícula y a la liberación del complejo de ácido nucleico en el citoplasma.

20 Basándose en la teoría de la esponja de protones, numerosos investigadores han recogido las características estructurales de PEI en la creación de novedosas bibliotecas de polímeros que comprenden aminas con capacidad tamponante a pH ácido. En los documentos US 7.780.957 y US 7.829.657, Kataoka *et al.* describen polímeros basados en una cadena principal de poli(ácido glutámico) o poli(ácido aspártico) donde las cadenas laterales de ácido carboxílico se derivatizan con cadenas laterales de amina protonables a pH ácido. Sin embargo, no se ha explorado el rico espacio estructural de oligo(alquilenaminas) que contiene unidades de alquilenamina alternas, no idénticas para servir como restos que mejoran la transfección en policationes. En particular, no se ha investigado previamente la transfección de ARNm.

30 Por el contrario, gran parte del trabajo científico de Kataoka *et al.* se ha centrado en poli{N-[N'-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamida}. En una publicación de Uchida *et al.* (2011, J Am Chem Soc, 133, 15524-15532), el mismo grupo ha examinado una serie de poliaspartamidas N-sustituidas que poseen unidades de aminoetileno de repetición en las cadenas laterales de la fórmula general -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)<sub>m</sub>-H. Curiosamente, cuando los autores examinaron la eficiencia de la familia de polímeros en la transfección de ADN plasmídico, "se observó un efecto distintivo par/impar de las unidades de aminoetileno de repetición en la cadena lateral del polímero sobre las eficiencias del escape endosómico y la transfección a varias líneas celulares. Los poliplexos de los polímeros con un número par de unidades de aminoetileno de repetición (PA-E) lograron una eficiencia de transfección de orden de magnitud más alta, sin citotoxicidad marcada, que la de los polímeros con un número impar de unidades de aminoetileno de repetición (PA-O). Este efecto par-impar estuvo de acuerdo bien con la capacidad tamponante de estos polímeros, así como su capacidad para alterar selectivamente la integridad de la membrana a pH endosómico, lo que conduce a un escape endosómico altamente eficiente de los poliplexos PA-E. Además, se demostró que la formación de una matriz cargada polivalente con un espaciado preciso entre grupos amino protonados en la cadena lateral del polímero era esencial para la alteración eficiente de la membrana endosómica, facilitando así el transporte del poliplexo al interior del citoplasma" (Resumen de Uchida *et al.* 2011, J Am Chem Soc, 133, 15524-15532). Curiosamente, cuando el mismo grupo de investigadores comparó derivados de poli(aspartamida) que llevan cadenas laterales de 1,2-diaminoetano, [PAsp(DET)] frente a análogos que llevan cadenas laterales de 1,3-diaminopropano, [PAsp(DPT)], observaron que los poliplexos de PAsp(DPT) mostraron una caída significativa en la eficiencia de transfección del ADN plasmídico a altas razones N/P debido a la citotoxicidad progresivamente aumentada con la razón N/P, a pesar de que las diferencias fisicoquímicas con respecto a [PAsp(DET)] en el tamaño de partícula y el potencial  $\zeta$  fueron insignificantes (Miyata *et al.* 2008, J Am Chem Soc, 130, 16287-16294). Por lo tanto, basándose en la regla de par-impar, se esperaría que los polímeros que comprenden 3 grupos amino protonables y grupos espaciadores de propileno fueran inferiores a PAsp(DET) y que cadenas laterales que comprenden 1,3-diaminopropano están asociadas con problemas de toxicidad. No se sabe nada sobre las relaciones de estructura-actividad de tales polímeros para la transfección de ARNm.

55 M. Krämer, "Polymeric Nanocarriers with Dendritic Core-Shell Architectures", Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., 2004, describe la transfección génica usando partículas de dendrímeros basados en PEI que pueden insertarse con cadenas laterales o grupos terminales de propilenimina.

60 Geall y colaboradores han descrito carbamatos de colesterol-poliamina con el resto poliamina que tiene la fórmula general:

-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde m = 0, 1 o 2 y donde n = 0 o 1 (Geall *et al.* 1999, FEBS Lett, 459, 337-342). Han examinado los valores de pK<sub>a</sub> de estas sustancias y sus características en la condensación de ADN de timo de ternero. Descubrieron que la distribución regioquímica de cargas positivas a lo largo de los carbamatos de colesterol-poliamina desempeña papeles significativos en la modulación de

la afinidad de unión al ADN y la eficiencia de la lipofección. Descubrieron que entre los carbamatos de colesterol-poliamina examinados, espermina que constituye el resto poliamina, -HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (propil/butil/propil) produjo de lejos la mayor expresión de gen indicador tras la transfección de ADN plasmídico que codifica beta-galactosidasa en cultivo celular, mientras que, por ejemplo, -HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (etil/propil/etil) fue de tres a diez veces menos eficiente. Por lo tanto, en vista de las enseñanzas de Kataoka *et al.* (regla de par-impar) y los hallazgos de Geall *et al.*, el experto en la técnica descartaría esta última estructura en el contexto del suministro de ácido nucleico.

Wang *et al.* han descrito poli(metacrilato de metilo)-injerto-oligoaminas como reactivos de transfección eficientes y poco citotóxicos para ADN plasmídico (Wang *et al.* 2010, Molecular BioSystems, 6, 256-263). Estos polímeros se obtuvieron por aminólisis de poli(metacrilato de metilo) con oligoaminas de la fórmula general H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub>, donde m = 1, 2 o 3. Los autores descubrieron que la eficiencia de transfección aumentaba con una longitud creciente de aminas.

Ou *et al.* han descrito poli(disulfuroamidoaminas) que se derivan de oligoaminas protegidas terminalmente que tienen la estructura Dde-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH-Dde por copolimerización con N,N'-cistaminabisacrilamida (Ou *et al.* 2009, Biomaterials 30, 5804-5814; documento WO 2010/065660). Examinaron las combinaciones a = 2 y b = 2, a = 2 y b = 3, a = 3 y b = 2, a = 3 y b = 3, a = 3 y b = 4 (espermina). Dde es el grupo protector de 2-acetildimedona. Despues de la retirada del grupo protector, la síntesis produce poli(disulfuroamidoaminas) donde las aminas internas,

originalmente secundarias se convierten en aminas terciarias como parte de la cadena principal del polímero y las aminas terminales se convierten en parte de las cadenas laterales de etileno o propilenamina colgantes. Tales polímeros tienen capacidad tamponante en el intervalo de pH relevante para el suministro de ácido nucleico y son útiles para transfectar ADN plasmídico en células.

Recientemente, se ha descubierto la utilidad de una nueva clase de estructuras sintéticas similares a lípidos pero no lipídicas, los llamados lipidoides, para el suministro de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo* (documento US 8.450.298; Love *et al.* 2010, PNAS 107, 1864-1869; documento WO2006/138380; Akinc *et al.* 2008, Nat Biotechnol 26, 561-569). Los lipidoides se obtienen haciendo reaccionar compuestos que contienen amina con epóxidos alifáticos, acrilatos, acrilamidas o aldehídos. Los autores/inventores han proporcionado procedimientos de síntesis para obtener bibliotecas de lipidoides y procedimientos de cribado para seleccionar compuestos útiles con utilidad en el suministro de ácido nucleico a células *in vitro*.

Como es evidente a partir de lo anterior, en el pasado se han realizado muchos trabajos de investigación y desarrollo sobre el suministro de otras moléculas de ácido nucleico tales como ADN plasmídico, oligonucleótidos, ARNip o análogos de ácido nucleico. El suministro de ARNm no se ha investigado en mucha profundidad. Algunos autores han supuesto que los compuestos y formulaciones que funcionan bien para el suministro de ADN o ARNip funcionarían de manera similar para el suministro de ARNm. Sin embargo, en contraste con el ADN plasmídico o ARNip, el ARNm es una molécula monocatenaria. Por lo tanto, basándose solo en consideraciones estructurales, se esperarían diferentes requisitos para compuestos y formulaciones para el suministro de ARNm frente al suministro de ADN o ARNip.

La bibliografía anterior citada anteriormente describe el suministro de ácidos nucleicos bicatenarios tales como ADN plasmídico o ARNip a células, pero no se sabe si los métodos y compuestos descritos son capaces de suministrar ácidos nucleicos monocatenarios tales como ARNm a células. Notablemente, se ha observado previamente que la transfección de ARNm difiere sustancialmente de la transfección de ADN plasmídico a células (Bettinger *et al.* 2001, Nucleic Acids Res, 29,3882-91, Uzgün *et al.* 2011, Pharm Res, 28, 2223-32).

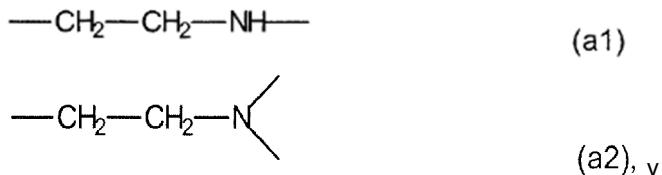
En línea con esto, los presentes inventores descubrieron que, cuando se seleccionan más de 100 miembros de una familia de polímeros dada a conocer en el documento WO 2011/154331 por su idoneidad en el suministro de ARN, preferiblemente suministro de ARN monocatenario tal como ARNm, a células, ninguno de los compuestos fue útil para transfectar ARNm de una manera que dé lugar a la expresión de un gen codificado por el ARNm. Por el contrario, todos estos compuestos son eficientes en el suministro de ADN plasmídico y/o ARNip. Por lo tanto, las reglas establecidas para el suministro de ácidos nucleicos bicatenarios a células no se aplican a priori para el ARNm monocatenario. La divulgación del documento WO 2011/154331 comprende oligómeros químicamente definidos que son 2 - 60 unidades de unidades de ácido de oligo(alquilenamino) que corresponden a la fórmula general HOOC-Z-R-NH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-NH]<sub>a</sub>-H, donde Z es una serie de metileno o una variedad de otras agrupaciones, R es un residuo de metileno o carboxilo y a y b son independientemente números enteros de 1-7 o 2-7, respectivamente. Los oligómeros de esta familia comprenden grupos amino protonables capaces de ejercer un denominado efecto de esponja de protones y se ha demostrado que son altamente activos en la transfección de ADN plasmídico y ARNip *in vitro* e *in vivo*. De manera importante, el documento WO 2011/154331 y las publicaciones científicas asociadas enseñan con gran detalle cómo pueden establecerse bibliotecas de oligómeros/polímeros definidas por secuencia a partir de elementos estructurales correspondientes a la fórmula general HOOC-Z-R-NH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-NH]<sub>a</sub>-H.

La tarea técnica que subyace a la presente invención era, por lo tanto, proporcionar una composición que fuera adecuada para el suministro de ácidos nucleicos, y en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, con una alta eficiencia a una célula o a un tejido.

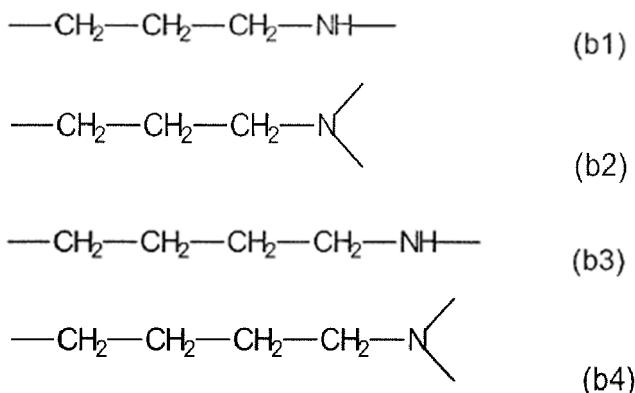
Esta tarea se ha logrado mediante la provisión de las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones y se ilustran con más detalle en la siguiente descripción general y los ejemplos.

Sorprendentemente, se encontró que copolímeros que contienen una disposición estadística/aleatoria de unidades de repetición de alquilenamina de longitud alterna en composiciones para transfectar una célula con un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, fueron constantemente más eficaces que polímeros que contienen disposiciones análogas de unidades de repetición de alquilenamina de longitud no alterna.

Por lo tanto, la invención proporciona, en un primer aspecto, un copolímero estadístico que comprende una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (a1) y (a2):



una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (b1) a (b4):



en el que la razón molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y

en el que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) contenidas en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

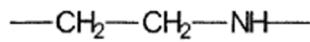
En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende un ácido nucleico, en particular un ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, y el copolímero anterior.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones según la invención. La invención también abarca métodos para la preparación de los copolímeros según la invención, así como las composiciones y composiciones farmacéuticas según la invención.

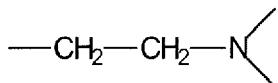
Todavía aspectos adicionales se refieren al uso de una composición según la invención o un copolímero según la invención para suministrar un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula diana o a un tejido, y a un método para suministrar un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula que comprende la etapa de poner en contacto una composición con la célula según la invención.

Los copolímeros según la presente invención combinan unidades de repetición más cortas (a) con unidades de repetición más largas (b) en forma de un copolímero estadístico, en particular un copolímero aleatorio, y en razones definidas. Se ha encontrado que esta disposición de las unidades de repetición (a) y (b) proporciona ventajas inesperadas en cuanto a la idoneidad del copolímero resultante como vehículo para suministrar un ácido nucleico, en particular un ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula.

Como se ha indicado anteriormente, el copolímero según la invención es un copolímero estadístico que comprende una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (a1) y (a2):

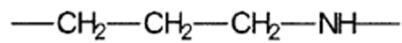


(a1)

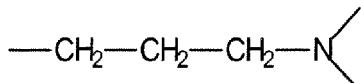


(a2), y

- 5 una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (b1) a (b4):

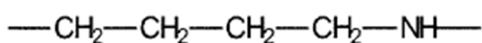


(b1)

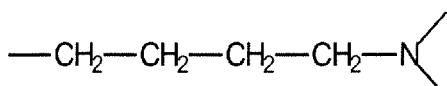


(b2)

10



(b3)



(b4)

- 15 en el que la razón molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y

en el que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) contenidas en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

- 20 El copolímero es un copolímero estadístico, en el que cualquier unidad de repetición (a) y cualquier unidad de repetición (b) se distribuyen estadísticamente en la macromolécula de copolímero. Se obtiene normalmente a partir de la copolimerización de una mezcla de monómeros que producen, durante la reacción de polimerización, las unidades de repetición (a) con monómeros que producen, durante la reacción de polimerización, las unidades de repetición (b). Preferiblemente, el copolímero es un copolímero aleatorio en el que cualquier unidad de repetición (a) y cualquier unidad de repetición (b) se distribuye aleatoriamente en la macromolécula de polímero.

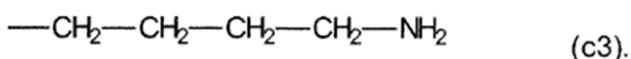
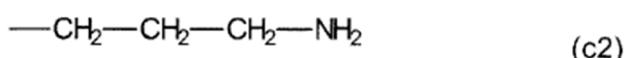
25 El copolímero según la invención puede ser un copolímero lineal, ramificado o dendrítico. Como entenderá el lector experto, una unidad de repetición de la fórmula (a1), (b1) o (b3) con dos valencias (es decir, enlaces abiertos a unidades vecinas) conduce a una propagación de la estructura de copolímero de manera lineal. Por lo tanto, un copolímero lineal de la invención comprende unidades de repetición de fórmula (a1) y uno o más tipos de las unidades de repetición de fórmulas (b1) y (b3), pero sin unidades de repetición de fórmula (a2), (b2) o (b4). Como se entenderá adicionalmente, la presencia de una unidad de repetición de fórmula (a2), (b2) o (b4) con tres valencias proporciona un punto de ramificación en la estructura de copolímero. Por lo tanto, un copolímero ramificado comprende uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a2), (b2) y (b4), y puede comprender además uno o más tipos de las unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y (b3).

30 35 El copolímero según la invención comprende una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (a1) y (a2) definidas anteriormente, y una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (b1) a (b4) definidas anteriormente. Se prefieren copolímeros que comprenden una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (a1) y (a2) definidas anteriormente, y una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (b1) y (b2) definidas anteriormente.

40 45 50 También se prefiere que el copolímero según la invención sea un copolímero ramificado que comprende uno o más tipos de unidades de repetición seleccionadas de unidades de repetición (a2), (b2) y (b4), y que opcionalmente comprende además uno o más tipos de las unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y (b3), y en particular un copolímero que comprende unidades de repetición de la fórmula (a2) y uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (b2) y (b4), y que opcionalmente comprende además uno o más tipos de las unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y (b3). En línea con lo anterior, un copolímero más preferido es, por lo tanto, un copolímero ramificado que comprende unidades de repetición de la fórmula (a2) y unidades de repetición de fórmula (b2), y que opcionalmente comprende además uno o más tipos de las unidades de repetición de fórmulas (a1) y (b1).

En los copolímeros según la invención, el número total de las unidades de repetición (a) y las unidades de repetición (b) es normalmente de 20 o más, preferiblemente 50 o más y más preferiblemente 100 o más. Normalmente, el número total de las unidades de repetición (a) y las unidades de repetición (b) es de 5.000 o menos, preferiblemente 2.500 o menos, más preferiblemente 1.000 o menos y en particular 500 o menos.

- 5 Además, se prefiere para los copolímeros según la invención que las unidades de repetición (a) y (b) representen el 80 % en moles o más, más preferiblemente el 90 % en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero. Se prefieren además copolímeros en los que las unidades de repetición (a) seleccionadas de (a1) y (a2) y las unidades de repetición (b) seleccionadas de (b1) y (b2) representan el 80 % en moles o más, más preferiblemente el 90 % en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero. Lo más preferido es que todas las unidades de repetición en el copolímero sean unidades de repetición (a) o (b), en particular que todas las unidades de repetición en el copolímero sean unidades de repetición (a) seleccionadas de (a1) y (a2) o unidades de repetición (b) seleccionadas de (b1) y (b2).
- 10 15 El peso molecular promedio en peso del copolímero según la presente invención, tal como se mide, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular en relación con patrones lineales de polí(óxido de etileno), generalmente oscila entre 1.000 y 500.000 Da, preferiblemente entre 2.000 y 250.000 Da y más preferiblemente 5.000-50.000 Da.
- 20 25 Los grupos terminales del copolímero según la invención comprenden normalmente uno o más tipos de grupos (c) seleccionados independientemente de los grupos de las fórmulas (c1) a (c3) a continuación, preferiblemente de los grupos de las fórmulas (c1) y (c2) a continuación:



- 25 Preferiblemente, los grupos terminales en el copolímero consisten en uno o más tipos de grupos (c) seleccionados independientemente de grupos de las fórmulas (c1) a (c3) a continuación, preferiblemente de grupos de las fórmulas (c1) y (c2). Como entenderá el experto en la técnica, el número de grupos terminales depende de la estructura del copolímero según la invención. Mientras que un copolímero lineal tiene solo dos extremos terminales, están contenidos mayores números de grupos terminales en un grupo ramificado, en particular en un copolímero dendrítico. Como se entenderá adicionalmente, también uno o más de los átomos de nitrógeno de los grupos terminales (c) contenidos en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

- 30 35 En el copolímero según la invención, la razón molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y preferiblemente dentro del intervalo de 0,8/1,0 a 1,0/0,8. Esta razón molar puede determinarse, por ejemplo, a través de RMN. Por lo tanto, se entenderá que la razón se determina habitualmente para una pluralidad de macromoléculas del copolímero según la invención, y normalmente indica la razón global de la suma de unidades de repetición (a) con respecto a la suma de unidades de repetición (b) en la pluralidad de macromoléculas.

- 40 45 50 55 Como se indicó anteriormente, uno o más de los átomos de nitrógeno del copolímero según la invención pueden protonarse para dar como resultado un copolímero en forma catiónica, normalmente una forma oligocatiónica o policatiónica. Se entenderá que los grupos amino primarios, secundarios o terciarios en las unidades de repetición (a) o (b) o en los grupos terminales (c) pueden actuar como aceptores de protones, especialmente en agua y disoluciones acuosas, incluyendo fluidos fisiológicos. Por lo tanto, los copolímeros de la presente invención tienen normalmente una carga positiva global en una disolución acuosa a un pH inferior a 7,5. Una disolución acuosa, tal como se le hace referencia en el presente documento, es una disolución en la que el disolvente comprende el 50 % (vol./vol.) o más, preferiblemente el 80 o el 90 % o más, y lo más preferiblemente el 100 % de agua. Además, si las composiciones según la invención están en contacto con un fluido fisiológico que tiene un pH inferior a 7,5, incluyendo, por ejemplo, sangre y fluido pulmonar, contienen normalmente unidades de repetición (a) y (b) en las que los átomos de nitrógeno están protonados. Los valores de  $pK_a$  de los copolímeros usados en las composiciones según la invención pueden determinarse mediante valoración ácido-base usando un valorador de  $pK_a$  automatizado. La carga neta a un valor de pH dado puede calcularse entonces, por ejemplo, a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach. Cualquier carga puede compartirse entre varios de los centros básicos y no puede atribuirse necesariamente a un solo punto. Normalmente, en disoluciones a pH fisiológico, los copolímeros usados en las composiciones según la invención comprenden unidades de repetición con grupos amino en estado protonado y unidades de repetición con grupos amino

en estado no protonado.

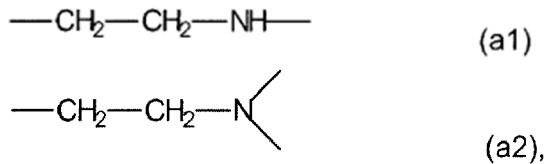
Sin embargo, como entenderá el lector experto, los copolímeros según la invención, así como las composiciones según la invención, también pueden proporcionarse como una forma de sal seca que contiene el copolímero en forma catiónica.

Como se entenderá adicionalmente, se proporcionan normalmente contraíones (aniones) para las cargas positivas de grupos amino protonados en composiciones según la invención que comprenden el copolímero y ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, por restos aniónicos contenidos en el ácido nucleico. Si los grupos cargados positivamente están presentes en exceso en comparación con los restos aniónicos en el ácido nucleico, las cargas positivas pueden equilibrarse por otros aniones, en particular los que se encuentran normalmente en fluidos fisiológicos, tales como  $\text{Cl}^-$  o  $\text{HCO}_3^-$ .

En línea con lo anterior, un copolímero preferido según la invención es un copolímero aleatorio, en el que

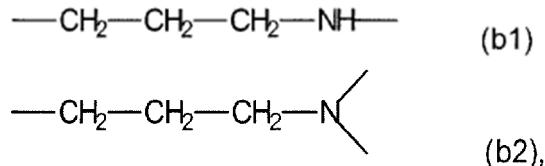
el 80 % en moles o más de todas las unidades de repetición, más preferiblemente todas las unidades de repetición, están formadas por

una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (a1) y (a2):



y

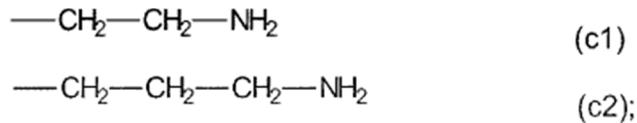
una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (b1) y (b2):



en el que la razón molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, más preferiblemente dentro del intervalo de 0,8/1,0 a 1,0/0,8;

en el que los grupos terminales del copolímero están formados por

grupos (c) seleccionados independientemente de grupos de fórmulas (c1) y (c2):



y

45 en el que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) y/o de los grupos terminales (c) contenidos en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico. Se prefiere además que el copolímero sea un copolímero ramificado, que comprende unidades (a2) y (b2), opcionalmente junto con unidades (a1) y/o (b1).

50 Los copolímeros según la invención pueden prepararse convenientemente con procedimientos análogos a los conocidos para la preparación de polialquileniminas, tal como polietilenimina (PEI) ramificada o lineal. Se entenderá que los monómeros usados para la producción de los copolímeros tendrán que ajustarse en consecuencia. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que los monómeros pueden hacerse reaccionar convenientemente de manera cuantitativa, de modo que la razón de las unidades (a) y (b) en el copolímero puede ajustarse ajustando la razón de monómeros en consecuencia en la mezcla de monómeros sometida a polimerización.

55

Mientras que la polietilenimina, también denominada poliaziridina, puede prepararse, por ejemplo, mediante polimerización por apertura de anillo de aziridina, los copolímeros según la invención pueden prepararse mediante polimerización por apertura de anillo de una mezcla de monómeros que comprende o consiste en aziridina, azetidina y, cuando sea aplicable, pirrolidina, o, en realizaciones preferidas, de aziridina y azetidina. Se entenderá que la expresión "cuando sea aplicable" se refiere a la presencia o ausencia de unidades de repetición (b3) y (b4) o grupos terminales (c3) que estarían formados por la pirrolidina. La polimerización por apertura de anillo de las aminas cíclicas no sustituidas conduce habitualmente a copolímeros ramificados. Pueden prepararse copolímeros lineales según la invención, por ejemplo, mediante polimerización de aziridinas N-sustituidas, azetidinas N-sustituidas y pirrolidinas N-sustituidas adecuadas, o aziridinas N-sustituidas y azetidinas N-sustituidas, que puede ir seguida de, por ejemplo, una escisión hidrolítica de sustituyentes N unidos a la cadena de polialquilenimina resultante, por ejemplo, en analogía con el procedimiento publicado en el documento de Katrien F. Weyts, Eric J. Goethals, *New synthesis of linear polyethyleneimine*, Polymer Bulletin, enero de 1988, volumen 19, tema 1, pág. 13-19.

Para la preparación de un dendrímero (o copolímero dendrítico), pueden aplicarse estrategias de síntesis de manera análoga que se conocen para la producción de dendrímeros de polietilenimina o polipropilenamina. Pueden sintetizarse dendrímeros de polipropilenimina a partir de elementos estructurales de acrilonitrilo usando una secuencia repetitiva de una adición de Michael a una amina primaria, seguido de una hidrogenación catalizada heterogéneamente (Newkome y Shreiner Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1→2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. Polymer 49 (2008) 1-173; De Brabander-Van Den Berg et al. Large-scale production of polypropylenimine dendrimers, Macromolecular Symposia (1994) 77 (1) 51-62). Pueden producirse dendrímeros de polietilenimina usando una secuencia repetitiva de una adición de Michael de un elemento estructural de bromuro de vinilo a una amina primaria seguido de una conversión de bromuro de alquilo en amina usando un método de síntesis de aminas de Gabriel (Yemul & Imae, Synthesis and characterization of poly(ethyleneimine) dendrimers, Colloid Polym Sci (2008) 286:747-752). Por lo tanto, el experto en la técnica podrá producir no solo dendrímeros con capas estrictamente alternantes de, por ejemplo, propileniminas y etileniminas. De manera similar, pueden generarse generaciones de dendrímeros con capas que comprenden o consisten en composiciones aleatorias de unidades de repetición de fórmula (a2), (b2) y (b4) y preferiblemente unidades de repetición (a2) y (b2).

La polimerización por apertura de anillo de aziridina y azetidina, o de aziridina, azetidina y pirrolidina, puede llevarse a cabo en disolución, por ejemplo, en agua. La concentración total de monómero no está particularmente limitada, las concentraciones típicas oscilan entre el 10 % p/p y el 80 % p/p, preferiblemente el 30 % p/p y el 60 % p/p. Normalmente, la polimerización se inicia por protones, de modo que se prefiere añadir un ácido de Brønsted, en particular un ácido mineral tal como ácido sulfúrico al sistema de reacción. En general, son suficientes pequeñas cantidades de ácido, tal como de 0,001 a 0,01 equivalentes, basándose en la concentración total de monómeros. La reacción avanza a velocidades convenientes, por ejemplo, en el intervalo de temperatura de 50 a 150 °C, en particular de 90 a 140 °C. En estos intervalos, los copolímeros de peso molecular más alto están habitualmente a temperaturas más altas, y copolímeros de peso molecular más bajo a temperaturas más bajas.

#### 40 Ácido nucleico

Como se indicó anteriormente, un aspecto central de la invención es una composición que comprende un ácido nucleico, en particular un ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, y el copolímero anterior según la invención.

El término "ácido nucleico" abarca todas las formas de tipos que se producen de manera natural de ácidos nucleicos, así como ácidos nucleicos sintetizados química y/o enzimáticamente y también abarca análogos de ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligonucleósido tiofósfatos y fosfotriésteres, oligonucleótidos de morfolino, oligonucleótidos catiónicos (documentos US6017700 A, WO/2007/069092), ribooligonucleótidos sustituidos o fosforotioatos. Además, el término "ácido nucleico" también se refiere a cualquier molécula que comprende nucleótidos o análogos de nucleótidos. No hay limitaciones con respecto a la secuencia o el tamaño de un ácido nucleico comprendido en la composición de la presente invención. El ácido nucleico se define predominantemente por el efecto biológico que va a lograrse en la diana biológica a la que se suministra la composición de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de una aplicación en terapia génica o de ácido nucleico, el ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico puede definirse por el gen o fragmento génico que va a expresarse o por la sustitución o reparación prevista de un gen defectuoso o cualquier secuencia diana génica o por la secuencia diana de un gen que va a inhibirse, desactivarse o regularse por disminución.

Preferiblemente, el término "ácido nucleico" se refiere a oligonucleótidos o polinucleótidos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En lo que respecta al ARN, en principio, puede emplearse cualquier tipo de ARN en el contexto de la presente invención. En una realización preferida, el ARN es un ARN monocatenario. El término "ARN monocatenario" significa una sola cadena consecutiva de ribonucleótidos en contraste con moléculas de ARN en las que dos o más cadenas separadas forman una molécula bicatenaria debido a la hibridación de las cadenas separadas. El término "ARN monocatenario" no excluye que la molécula monocatenaria forme por sí misma estructuras bicatenarias tales como bucles, estructuras secundarias o terciarias.

El término "ARN" cubre el ARN que codifica una secuencia de aminoácidos, así como ARN que no codifica una secuencia de aminoácidos. Se ha sugerido que más del 80 % del genoma contiene elementos funcionales de ADN que no codifican proteínas. Estas secuencias no codificantes incluyen elementos de ADN reguladores (sitios de unión para factores de transcripción, reguladores y correguladores) y secuencias que codifican transcritos que nunca se traducen en proteínas. Estos transcritos, que están codificados por el genoma y se transcriben en ARN pero no se traducen en proteínas, se denominan ARN no codificantes (ARNnc). Por lo tanto, en una realización, el ARN es un ARN no codificador. Preferiblemente, el ARN no codificador es una molécula monocatenaria. Los estudios demuestran que los ARNnc son actores críticos en la regulación génica, el mantenimiento de la integridad genómica, la diferenciación celular y el desarrollo, y están regulados erróneamente en diversas enfermedades humanas. Existen diferentes tipos de ARNnc: ARNnc cortos (20-50 nt), medios (50-200 nt) y largos (>200 nt). El ARNnc corto incluye microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de interacción con piwi (piARN) y ARN iniciador de la transcripción (ARNti). Ejemplos de ARNnc medios son ARN nucleares pequeños (ARNsn), ARN nucleolares pequeños (ARNsno), ARN de transferencia (ARNt), ARN asociados al sitio de inicio de la transcripción (ARNTSSa), ARN pequeños asociados al promotor (PASR) y transcritos en sentido de 5' del promotor (PROMPT). Los ARN no codificantes largos (ARNncl) incluyen ARN no codificador intergénico largo (ARNlinc), ARNncl antisentido, ARNncl intrónico, ARN ultraconservados transcritos (T-UCR) y otros (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 26 de marzo de 2014. doi: 10.1002/cmcd.201300534). De los ARN no codificantes mencionados anteriormente, solo el ARNip es bicatenario. Por lo tanto, dado que en una realización preferida el ARN no codificador es monocatenario, se prefiere que el ARN no codificador no sea ARNip. En otra realización, el ARN es un ARN codificador, es decir, un ARN que codifica una secuencia de aminoácidos. Tales moléculas de ARN también se denominan ARNm (ARN mensajero) y son moléculas de ARN monocatenarias. Los ácidos nucleicos pueden prepararse mediante metodología química y enzimática de síntesis conocida por un experto en la técnica, o mediante el uso de tecnología recombinante, o pueden aislar de fuentes naturales, o por una combinación de los mismos. Los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser monocatenarios o bicatenarios o tricatenarios. "Ácido nucleico" también se refiere a oligo- o polinucleótidos sentido y antisentido, es decir, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos específica en un ADN y/o ARN.

Preferiblemente, el término ácido nucleico en el contexto de la presente invención se refiere a ARN, más preferiblemente a ARN monocatenario, en particular a ARNm y lo más preferiblemente a ARNm modificado.

Los ARN mensajeros (ARNm) son copolímeros que se forman a partir de elementos estructurales de nucleósido fosfato principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, que como portadores intermedios llevan la información genética del ADN en el núcleo celular al citoplasma, donde se traduce en proteínas. Por lo tanto, son adecuados como alternativas para la expresión génica.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que ARNm significa cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de una proteína o fragmento de la misma o puede traducirse en una proteína o fragmento de la misma. El término "proteína" en el presente documento abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos que están unidos cada uno a través de enlaces peptídicos y también incluye péptidos y proteínas de fusión.

El ARNm contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica una proteína o fragmento de la misma cuya función en la célula o en las proximidades de la célula es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una proteína cuya falta o forma defectuosa es un desencadenante de una enfermedad o afección, cuya provisión puede moderar o prevenir una enfermedad o afección, o una proteína que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o sus proximidades. El ARNm puede contener la secuencia para la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar una proteína que actúa como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, donde esta proteína es una cuya función es necesaria para remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico o para iniciar procesos *in vivo* tales como la formación de nuevos vasos sanguíneos o tejidos. En el presente documento, se entiende que variante funcional significa un fragmento que, en la célula, puede llevar a cabo la función de la proteína cuya función en la célula es necesaria o la falta o forma defectuosa de la misma es patógena. Además, el ARNm también puede tener regiones y/o regiones no codificantes en 3' o 5' funcionales adicionales. Las regiones no codificantes en 3' y/o 5' pueden ser las regiones que flanquean de manera natural la secuencia codificante de proteínas o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. Los expertos en la técnica pueden determinar las secuencias adecuadas para esto en cada caso mediante experimentos de rutina.

En una realización preferida, el ARNm contiene una caperuza m7GpppG, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3' en particular para mejorar la traducción. El ARNm puede tener regiones adicionales que promueven la traducción.

En una realización preferida, el ARNm es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Preferiblemente, es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados como se describe en el documento WO2011/012316. Se notifica que el ARNm descrito en el mismo muestra una estabilidad aumentada y una inmunogenicidad disminuida. En una realización preferida, en un ARNm

modificado de este tipo se modifican del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanosina pueden no estar modificados. Los nucleótidos de adenosina y guanosina pueden estar no modificados o parcialmente modificados, y preferiblemente están presentes en forma no modificada. Preferiblemente del 10 al 35 % de los nucleótidos de citidina y uridina se modifican y de manera particularmente preferible el contenido de los nucleótidos de citidina modificados se encuentra en un intervalo del 7,5 al 25 % y el contenido de los nucleótidos de uridina modificados en un intervalo del 7,5 al 25 %. Se ha encontrado que, de hecho, un contenido relativamente bajo, por ejemplo, solo el 10 % cada uno, de nucleótidos de citidina y uridina modificados puede lograr las propiedades deseadas. Se prefiere particularmente que los nucleótidos de citidina modificados sean residuos de 5-metilcitidina y los nucleótidos de uridina modificados sean residuos de 2-tiouridina. Lo más preferiblemente, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de los nucleótidos de uridina modificados es del 25 %, respectivamente.

En otra realización preferida, el ARNm puede combinarse con sitios de unión a la diana, secuencias de direccionamiento y/o con sitios de unión a micro-ARN, para permitir la actividad del ARNm deseado solo en las células relevantes. En una realización preferida adicional, el ARN puede combinarse con micro-ARN o ARNhC en el sentido de 3' de la cola de poliA 3'.

Además, el término "ácido(s) nucleico(s)" puede referirse a ADN o ARN o híbridos de los mismos o cualquier modificación de los mismos que se conoce en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175, (Lorenz *et al.* 2004, Bioorg Med Chem Lett, 14, 4975-4977; Soutschek *et al.* 2004, Nature, 432, 173-178) para ejemplos de modificaciones). Tal(es) molécula(s) de ácido nucleico son monocatenarias o bicatenarias, lineales o circulares, naturales o sintéticas, y sin ninguna limitación de tamaño. Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozima o ARN interferentes pequeños (ARNip), microARN, antagonirs o ARN en horquilla cortos (ARNhc), ARNt o ARN bicatenarios largos o un constructo de ADN que codifica tales ARN o quimeroplastos (Colestrauß *et al.* 1996, Science, 273, 1386-1389), o aptámeros, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas ("CRISPR" para la escisión de ADN específica de sitio guiada por ARN) (Cong *et al.* 2013, Science, 339, 819-823), o ARN y ADN. Dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) estar en forma de plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, ADN o ARN viral, ADN de bacteriófago, ARN monocatenario (ARNm) o bicatenario codificante y no codificante y oligonucleótido(s), en la que se incluyen cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica en la cadena principal del azúcar y/o en las bases como se describió anteriormente y modificaciones en 3' o 5'. En una realización particularmente preferida, el ácido nucleico es ARN, más preferiblemente ARNm o ARNip.

El(los) ácido(s) nucleico(s) puede(n) contener una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que va a expresarse en una célula diana. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir moléculas de ácido nucleico recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

En una realización preferida, dicho ácido nucleico es un ácido nucleico terapéutica o farmacéuticamente activo que incluye todos los tipos y modificaciones de ácido nucleico enumerados anteriormente y aquellos conocidos por un experto en la técnica que pueden tener un efecto terapéutico o preventivo. En general, pueden lograrse efectos terapéuticos o preventivos mediante la interacción del ácido nucleico con moléculas celulares y orgánulos. Tal interacción sola puede activar, por ejemplo, el sistema inmunitario innato, como es el caso de ciertos oligonucleótidos CpG y secuencias diseñadas para interaccionar específicamente con receptores de tipo toll y otros extra- o intracelulares. Además, la captación o introducción de ácidos nucleicos en células puede estar destinada a conducir a la expresión de secuencias de nucleótidos tales como genes comprendidos en el ácido nucleico, puede estar destinada a la regulación por disminución, el silenciamiento o la desactivación de la expresión génica endógena como consecuencia de la presencia intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido, o puede estar destinada a la modificación de secuencias de ácido nucleico endógenas tal como reparación, escisión, inserción o intercambio de bases seleccionadas o de tramos completos de secuencias de ácido nucleico endógenas, o puede estar destinada a la interferencia con prácticamente cualquier proceso celular como consecuencia de la presencia e interacción intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido. La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos puede estar destinada a compensar o complementar la expresión génica endógena, en particular en casos en los que un gen endógeno es defectuoso o silencioso, conduciendo a un producto ausente, insuficiente o defectuoso o disfuncional de la expresión génica, como es el caso de muchas enfermedades metabólicas y hereditarias como fibrosis quística, hemofilia o distrofia muscular, por nombrar algunas. La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede pretender que el producto de la expresión interaccione o interfiera con cualquier proceso celular endógeno tal como la regulación de la expresión génica, transducción de señales y otros procesos celulares. La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede estar destinada a dar lugar a una respuesta inmunitaria en el contexto del organismo en el que reside o se hace que resida una célula transfundida o transducida. Ejemplos son la modificación genética de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas para que presenten un antígeno para fines de vacunación. Otros ejemplos son la sobreexpresión de citocinas en tumores para provocar una respuesta inmunitaria específica de tumor. Además, la sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede estar destinada a generar células modificadas genéticamente

de manera transitoria *in vivo* o *ex vivo* para terapias celulares tales como células T modificadas o células precursoras o madre u otras para medicina regenerativa.

La regulación por disminución, el silenciamiento o la desactivación de la expresión génica endógena con fines terapéuticos puede lograrse, por ejemplo, mediante interferencia por ARN (iARN), con ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARNt, ARN bicatenario largo donde tal regulación por disminución puede ser específica o inespecífica de secuencia y también puede conducir a la muerte celular como es el caso cuando se introducen ARN bicatenarios largos en células. La regulación por disminución, el silenciamiento o la desactivación de la expresión génica endógena o preexistente puede ser útil en el tratamiento de enfermedades adquiridas, hereditarias o de origen espontáneo, incluyendo infecciones virales y cáncer. También puede preverse que la introducción de ácidos nucleicos en células puede ponerse en práctica como una medida preventiva para prevenir, por ejemplo, infección viral o neoplasias. La regulación por disminución, el silenciamiento o la desactivación de la expresión génica endógena puede ejercerse a nivel transcripcional y a nivel traduccional. Los expertos en la técnica conocen múltiples mecanismos e incluyen, por ejemplo, modificaciones epigenéticas, cambios en la estructura de la cromatina, unión selectiva de factores de transcripción por el ácido nucleico introducido, hibridación del ácido nucleico introducido con secuencias complementarias en ADN genómico, ARNm u otras especies de ARN mediante apareamiento de bases, incluyendo mecanismos de apareamiento de bases no convencionales tales como formación de triple hélice. De manera similar, puede lograrse la reparación génica, cambios de bases o secuencias a nivel genómico y a nivel de ARNm, incluyendo la omisión de exones. Los cambios de bases o secuencias pueden lograrse, por ejemplo, mediante escisión de ADN específico de sitio guiada por ARN, mediante mecanismos de corte y empalme que se aprovechan del corte y empalme en trans, ribozimas de corte y empalme en trans, quimeroplastos, corte y empalme e trans de ARN mediado por espliceosoma o aprovechando intrones redirigidos o de grupo II, o aprovechando la mutagénesis por inserción mediada por virus o aprovechando la inserción genómica dirigida usando sistemas de integrasas procariotas, eucariotas o virales. Como los ácidos nucleicos son los portadores de los planes de construcción de sistemas vivos y como participan en muchos procesos celulares de manera directa e indirecta, en teoría, cualquier proceso celular puede verse influido por la introducción de ácidos nucleicos en células desde el exterior. Notablemente, esta introducción puede llevarse a cabo directamente *in vivo* y *ex vivo* en cultivo celular u orgánico seguido de trasplante de órganos o células modificados de este modo en un receptor. Los complejos de la presente invención con ácidos nucleicos como agentes activos pueden ser útiles para todos los fines descritos anteriormente.

#### 30 Composición

Como se dio a conocer anteriormente, la composición según la invención comprende un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y el copolímero según la invención.

35 La invención abarca también una composición que consiste en el ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y el copolímero según la invención. Sin embargo, la composición también puede comprender componentes adicionales, por ejemplo, componentes para la formulación de lípidos y/o componentes que ejercen una función efectora durante el suministro del ácido nucleico a y dentro de una célula. Normalmente, los pesos combinados del ácido nucleico y el copolímero según la invención representan el 50 % en peso o más, preferiblemente el 70 % en peso o más, del peso total de la composición.

40 Se entenderá que las composiciones según la invención proporcionan generalmente una asociación del ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, con el copolímero y componentes adicionales opcionales, que se asocian en una entidad finita, lo suficientemente estable como para mantener la asociación de una proporción significativa de dichos componentes hasta alcanzar una diana biológica o los alrededores de una diana biológica durante una aplicación, por ejemplo, durante una ruta deseada de suministro de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm.

45 50 Debido a la presencia de los grupos amino protonables en el copolímero según la invención, este copolímero puede comprender cargas catiónicas en las unidades de repetición de fórmula (a) y/o (b), de modo que el copolímero forme un catión, normalmente un oligo- o poliacidón que contiene una pluralidad de restos catiónicos, en presencia de protones, por ejemplo, en agua o disoluciones acuosas, o en presencia de un ácido donador de protones. Por lo tanto, preferiblemente, la composición según la invención contiene o consiste en un complejo de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y un copolímero según la invención que es un copolímero catiónico. Se entenderá que un copolímero catiónico y un ácido nucleico aniónico se asocian generalmente mediante interacción electrostática en un complejo de este tipo. Sin embargo, otras interacciones atractivas también pueden participar en la estabilización del complejo, incluyendo enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes.

55 60 En las composiciones de la presente invención, el copolímero y ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, están normalmente contenidos, por ejemplo, en una razón en peso de copolímero/peso de ácido nucleico (p/p) de 0,25/1 - 50/1, preferiblemente de 0,5/1 - 30/1, más preferiblemente de 1/1 - 20/1.

65 65 Más preferiblemente, en casos en los que la composición contiene un complejo del ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y un copolímero catiónico según la invención, pueden

seleccionarse razones relativas del copolímero y el ácido nucleico, en las composiciones de la invención, considerando el grado de neutralización de carga mutua. En ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, el suministro con complejos del ácido nucleico, con un copolímero catiónico, en general, las cantidades del copolímero catiónico se mezclan con una cantidad dada del ácido nucleico, lo que conduce a al menos una neutralización de carga de las cargas negativas del ácido nucleico, preferiblemente a una sobrecompensación de las cargas negativas del ácido nucleico.

Pueden determinarse razones adecuadas entre el copolímero catiónico y el ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, mediante ensayos de retardo en gel, métodos de extinción de fluorescencia tales como el ensayo de extinción/desplazamiento de bromuro de etidio, mediante mediciones del tamaño y el potencial zeta de las partículas. Las razones útiles entre el copolímero y el ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, generalmente se caracterizan por un retardo al menos parcial, preferiblemente completo del ácido nucleico comprendido en el complejo con el copolímero catiónico cuando se somete a electroforesis en un gel de agarosa, mediante un alto grado de extinción de fluorescencia de colorantes tales como bromuro de etidio, RiboGreen o YOYO cuando se intercalan en los ácidos nucleicos o mediante la formación de (nano)partículas al mezclar el copolímero y el ácido nucleico.

Para composiciones que contienen los copolímeros catiónicos químicamente bien definidos de la presente invención, la razón N/P calculada es un factor adecuado para elegir y definir las razones relativas del copolímero y el ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm. La razón N/P designa la razón molar de los átomos de nitrógeno protonables en las unidades de repetición (a) y (b) del copolímero de la presente invención con respecto a los grupos fosfato del ácido nucleico en la composición de la presente invención. La razón N/P es un parámetro establecido para la caracterización de tales complejos de ácido nucleico con vehículos catiónicos. El lector experto entenderá que los átomos de nitrógeno en los grupos amino que unen las unidades de repetición (a) y (b) a las unidades de repetición vecinas y los grupos amino terminales se consideran átomos de nitrógeno protonables. Por otro lado, átomos de nitrógeno en enlaces amida (que generalmente no están presentes en los copolímeros de la invención), no contarán como átomos de nitrógeno protonables. Para las composiciones de la presente invención que contienen un copolímero catiónico de la invención y ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, la razón N/P puede calcularse convenientemente, por ejemplo, según la fórmula

$$\frac{N}{P} = \frac{w_p \times n}{M_{wp}} \div \frac{w_{na}}{M_{base}}$$

donde  $w_p$  es el peso del copolímero en gramos,  $n$  es el número de grupos amino protonables por unidad de repetición,  $M_{wp}$  es el peso molecular medio de las unidades de repetición (a) y (b) contenidas en el copolímero,  $w_{na}$  es el peso del ácido nucleico en gramos y  $M_{base}$  es el peso molecular promedio de un nucleótido en el ácido nucleico, por ejemplo, 346 g/mol en el caso de ARN.

Específicamente para los copolímeros de la presente invención,  $n$  es 1.  $M_{wp}$  puede calcularse basándose en la razón de las unidades de repetición polimerizadas, por ejemplo, determinada mediante RMN, y sus respectivos pesos moleculares. Por ejemplo, en un copolímero ramificado que contiene unidades polimerizadas (a2) y (b2) con pesos moleculares de 42 g/mol (a2) y 56 g/mol (b2), respectivamente, en una razón molar de (a)/(b) de 0,9/1,0,  $M_{wp}$  se calcula como

$$M_{wp} = \frac{0,9 \times 42 + 1,0 \times 56}{(0,9 + 1,0)} = 49,4$$

En complejos binarios según la invención que consisten en el copolímero según la invención y el ácido nucleico, particularmente ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, para el suministro de ácido nucleico según la invención, deben usarse preferiblemente cantidades relativas del copolímero con respecto al ácido nucleico que proporcionan una razón N/P que da como resultado un potencial zeta positivo de la composición binaria final. En el contexto de la presente invención, para composiciones binarias de la presente invención, se prefieren razones N/P de 1 a 100, más preferidas son razones N/P de 3 a 60 y las más preferidas son razones N/P de 4 a 44.

La composición de la invención comprende opcionalmente otros componentes, en particular, componentes que pueden ejercer una función efectora durante el suministro de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a y dentro de una célula. Tales componentes pueden ser, pero no se limitan a, polianiones, lípidos, policationes distintos de los copolímeros de la presente invención incluyendo péptidos catiónicos, oligómeros o polímeros protectores, poloxámeros (también conocidos como pluronic), poloxaminas, ligandos de direccionamiento, agentes endosomolíticos, péptidos señal y de penetración celular, nanopartículas magnéticas y no magnéticas, inhibidores de ARNasa, colorantes fluorescentes, radioisótopos o agentes de contraste para obtención de imágenes médicas. El término "función efectora" abarca cualquier función que soporte la consecución de un efecto

biológico previsto de un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, de la composición a o en una diana biológica o en los alrededores de una diana biológica. Por ejemplo, se han formulado composiciones para el suministro de ácido nucleico para que comprendan ácidos nucleicos no codificantes o polianiones distintos de ácido nucleico como materiales de relleno (Kichler *et al.*, 2009, 2005, J Gene Med, 7, 1459-1467).

Tales materiales de relleno son adecuados para reducir la dosis de un ácido nucleico que tiene un efecto biológico previsto mientras se mantiene la extensión o el grado de ese efecto obtenido a una dosis de ácido nucleico más alta en ausencia de tal material de relleno. También se han usado polianiones distintos de ácido nucleico para obtener expresión génica *in vivo* prolongada a toxicidad reducida (Uchida *et al.* 2011, J. Control Release, 155, 296-302). Las composiciones de la presente invención también pueden comprender lípidos catiónicos, aniónicos o neutros como es el caso en lipopoliplexos (Li y Huang en "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press 1999, capítulo 13, 295-303). Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender oligo o policationes distintos de los copolímeros de la presente invención. Tales oligo- o policationes adicionales pueden ser útiles para lograr un grado deseado de compactación de un ácido nucleico o, en el caso de péptidos policationicos, pueden tener una función de señal de localización nuclear tal como se describió anteriormente (Ritter *et al.* 2003, J Mol Med, 81, 708-717). Polímeros protectores tales como poli(etilenglicol) (PEG) también pueden estar comprendidos en las composiciones de la presente invención y se usan con frecuencia para estabilizar poliplexos y lipoplexos contra la agregación y/o interacciones no deseadas en un entorno biológico (opsonización), por ejemplo, interacciones con componentes séricos, células sanguíneas o matriz extracelular. La protección también puede ser adecuada para reducir la toxicidad de las composiciones que comprenden ácidos nucleicos (Finsinger *et al.* 2000, Gene Ther, 7, 1183-1192). Polímeros protectores tales como PEG pueden acoplarse covalentemente de manera directa a los copolímeros de la presente invención. El acoplamiento puede lograrse, por ejemplo, a grupos terminales (c), o a un grupo amino de las unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) o (b3).

Se ha encontrado que derivados de polivinilo tales como PVP y poloxámeros son útiles para mejorar la transfección tras la inyección intramuscular (Mumper *et al.* 1996, Pharm Res, 13, 701-709, Lemieux *et al.* 2000, Gene Ther, 7, 986-991) y, por lo tanto, puede ser útil que estén comprendidos en las composiciones de la presente invención.

Ligandos de direccionamiento que incluyen anticuerpos comprendidos en composiciones para el suministro de ácido nucleico son útiles para la transfección preferente y mejorada de células diana (Philipp y Wagner en "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3<sup>a</sup> edición, capítulo 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009). Un ligando de direccionamiento puede ser cualquier compuesto que confiera a las composiciones de la presente invención una función de reconocimiento de diana y/o unión a la diana de una manera directa o indirecta. En términos más generales, una diana es una estructura biológica distinta a la que un ligando de direccionamiento puede unirse específicamente a través de la interacción molecular y donde tal unión conducirá finalmente a la acumulación preferente del ácido nucleico comprendido en la composición en un tejido diana y/o a o en una célula diana. De manera similar a las cadenas de PEG, pueden acoplarse ligandos de direccionamiento, por ejemplo, a grupos terminales (c), o a un grupo amino de las unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) o (b3).

Además, agentes endosomolíticos tales como péptidos endosomolíticos (Plank *et al.* 1998, Adv Drug Deliv Rev, 34, 21-35) o cualquier otro compuesto que sea adecuado para mejorar la liberación endosómica de un ácido nucleico sometido a endocitosis son componentes útiles de las composiciones de la presente invención. De manera similar, péptidos de penetración en células (en otro contexto también conocidos como dominios de transducción de proteínas) (Lindgren *et al.* 2000, Trends Pharmacol Sci, 21, 99-103) pueden ser componentes útiles de la composición de la presente invención para mediar en el suministro intracelular de un ácido nucleico. El denominado péptido TAT se encuentra dentro de esta clase y también tiene función de localización nuclear (Rudolph *et al.* 2003, J Biol Chem, 278, 11411-11418).

Las nanopartículas magnéticas que pueden estar comprendidas en las composiciones de la presente invención son útiles para el direccionamiento físico del suministro por fuerza magnética y para una mejora drástica de la eficiencia de la transferencia de ácido nucleico, un mecanismo también conocido como magnetofección (documento EP1297169; Plank *et al.* 2011, Adv Drug Deliv Rev, 63, 1300-1331). De manera similar, una composición de la presente invención también puede ser una microburbuja no magnética o magnética usada para la potenciación física y el direccionamiento del suministro de ácido nucleico a través de ultrasonidos y opcionalmente la aplicación de un campo magnético (Holzbach *et al.* 2010, J Cell Mol Med, 14, 587-599, Vlaskou *et al.* 2010, Adv Funct Mater, 20, 3881-3894). Pueden usarse ventajosamente puntos cuánticos (Zintchenko *et al.* 2009, Mol Ther, 17, 1849-1856), trazadores radiactivos y agentes de contraste para la obtención de imágenes médicas para rastrear el suministro de ácidos nucleicos y para determinar la biodistribución de composiciones para el suministro de ácidos nucleicos. En resumen, se han descrito numerosos efectores para el suministro de ácido nucleico y pueden ser componentes útiles en composiciones que comprenden ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm y un copolímero según la invención.

Los expertos en la técnica saben bien que existe un gran grado de flexibilidad con respecto a la cantidad de sustancia de cada componente comprendido en la composición según la presente invención. Por ejemplo, se han descrito los denominados poliplexos binarios monomoleculares para ADN plasmídico, donde la composición consiste en nanopartículas formadas tras la mezcla del polication y el ADN plasmídico que comprenden exactamente una única molécula de ADN plasmídico y tantas moléculas de polication como se requieran para la neutralización de carga o la

sobrecompensación de carga (positiva con respecto a negativa) (DeRouchey *et al.* 2006, *J Phys Chem B*. 110(10):4548-54). Para PEI-ADN, complejos a razones N/P que a menudo se usan en transfecciones, se encontró por espectroscopía de correlación de fluorescencia que contienen en promedio 3,5 (+/-1) moléculas de plásmido de ADN y 30 moléculas de PEI, mientras que aproximadamente el 86 % de las moléculas de PEI usadas para preparar los complejos estaban en forma libre (Clamme *et al.* 2003, *Biophys J* 84,1960-1968). En el otro extremo, se encontró que complejos agregados de PEI y ADN plasmídico, que comprenden supuestamente un gran número (de decenas a cientos) de las moléculas componentes tuvieron un mejor rendimiento en la transfección que pequeñas nanopartículas diferenciadas de PEI-ADN (Ogris *et al.* 1998, *Gene Ther*, 5, 1425-1433; Ogris *et al.* 2001, *AAPS PharmSci*, 3, E21). Por lo tanto, la composición según la presente invención puede ser una partícula, en particular una nanopartícula que comprende unas pocas moléculas de ácidos nucleicos, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, pero también pueden ser un objeto macroscópico tal como un precipitado o un polvo seco que comprende un enorme número de moléculas de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm. En resumen, las composiciones de la presente invención se caracterizan por las razones de entrada de sus componentes antes del autoensamblaje. Las razones en p/p de entrada típicas de los componentes individuales en relación con el componente de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, están entre 1 y 50. La razón N/P es una medida adecuada de la razón de entrada para composiciones binarias que contienen el copolímero de la invención y el ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm cuando el copolímero está químicamente bien definido. Como se indicó anteriormente, se prefieren valores para la razón N/P de 1 a 100, más preferidas son razones N/P de 3 a 60, y las más preferidas son razones N/P de 4 a 44.

Si la composición de la presente invención comprende componentes adicionales, una asignación de una razón N/P puede ser ambigua. En este caso, se determinan razones de entrada adecuadas mediante experimentos que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de retardo en gel, ensayos de extinción de fluorescencia tales como el ensayo de extinción/desplazamiento de bromuro de etidio, por mediciones de tamaño de partícula y potencial zeta de las partículas y por ensayos funcionales tales como ensayos de transfección como se describe en el presente documento. En complejos ternarios que comprenden un polianión adicional o polímeros protectores, la razón de carga neta (positiva con respecto a negativa) puede ser menor de 1 y el potencial zeta puede ser neutro o negativo.

La composición de la invención puede producirse como se describe a continuación. Normalmente, el ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm con una carga negativa y los copolímeros de la presente invención preferiblemente en forma catiónica pueden autoensamblarse cuando se ponen en contacto especialmente en un disolvente adecuado. Después del proceso de autoensamblaje, la composición de la presente invención puede separarse de cualquier componente no incorporado y en la misma etapa el medio de suspensión puede reemplazarse por centrifugación o por ultrafiltración o cromatografía de exclusión molecular o diálisis o cualquier método relacionado. La estequiometría de los componentes de la composición de la presente invención, purificados o no purificados, puede determinarse mediante una variedad de métodos analíticos que incluyen métodos espectroscópicos tales como espectrometría UV/VIS o espectroscopía de correlación de fluorescencia (DeRouchey *et al.* 2006, *J Phys Chem B*. 110(10):4548-54), por fluorescencia ortogonal o marcaje con radioisótopos de los componentes individuales, mediante espectroscopía de RMN e IR o análisis cromatográfico y cuantificación tras el desensamblaje de la composición. El desensamblaje puede lograrse, por ejemplo, mediante la adición de un exceso de polianión tal como heparina como se describe en el presente documento o sulfato de condroitina o mediante la adición de dodecilsulfato de sodio.

La presente invención también se refiere a un método para producir la composición de la invención. Copolímeros según la presente invención pueden producirse y purificarse como se describe en el presente documento. Los copolímeros pueden almacenarse en disolución acuosa o en forma seca, tal como un polvo seco, en cuyo caso pueden redissolverse en medio acuoso, preferiblemente agua, antes de producir la composición. El pH de la disolución se ajusta a neutro o ligeramente ácido (hasta pH 4,5) con un ácido, preferiblemente con ácido clorhídrico o cítrico, si se requiere. En el caso del ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, estando el ácido nucleico comprendido en la composición, se prefiere que el pH se ajuste a de aproximadamente 4,5 a 5,5, preferiblemente a de aproximadamente 4,9 a 5,1, más preferiblemente a aproximadamente 5,0. Los ácidos nucleicos se producen y purifican según el estado de la técnica bien conocido por el experto en la técnica. El ácido nucleico se proporciona como disolución en medio acuoso, preferiblemente agua. Opcionalmente, o bien el copolímero o bien el ARN como ácido nucleico o ambos están químicamente unidos con moléculas efectoras tales como ligandos de direccionamiento, péptidos señal, péptidos de penetración en células, sustancias endosomolíticas o polímeros protectores. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza química de las moléculas efectoras, pueden no necesitar estar unidos por enlace químico, sino que pueden incorporarse en la composición de la presente invención por autoensamblaje basado en unión no covalente, es decir, interacción electrostática, hidrófoba o de Van-der-Waals con cualquiera de los otros componentes de la composición. Para este propósito, puede ser ventajoso ajustar la fuerza iónica, el tipo de contracción, el pH o el contenido de disolvente orgánico de soluciones de componentes individuales.

Como alternativa al procedimiento de mezclado descrito anteriormente, el ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y el componente de copolímero pueden mezclarse con un dispositivo automatizado para micromezclado tal como se describe, por ejemplo, por Hirota *et al.* (Hirota *et al.* 1999, *Biotechniques*, 27, 286-290) o Kasper *et al.* (Kasper *et al.* 2011, *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185) o por focalización

microfluídica tal como se revisa por Xuan *et al.* (Xuan *et al.* 2010, Microfluidics and nanofluidics, 9, 1-16).

La composición de la presente invención que comprende ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, entonces puede prepararse por autoensamblaje tras mezclar las disoluciones de los componentes. El autoensamblaje puede lograrse mediante mezclado a mano usando pipeteo y agitación/agitación con vórtex o usando un dispositivo automatizado para micromezclado tal como se describe, por ejemplo, por Hirota *et al.* (Hirota *et al.* 1999, Biotechniques, 27, 286-290) o Kasper *et al.* (Kasper *et al.* 2011, Eur J Pharm Biopharm, 77, 182-185) o por focalización microfluídica tal como se revisa por Xuan *et al.* (Xuan *et al.* 2010, Microfluidics and nanofluidics, 9, 1-16). Si la composición de la presente invención comprende componentes adicionales además del ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y el copolímero de la presente invención, puede requerirse mezclado secuencial. En este caso, puede añadirse cualquier componente adicional después del autoensamblaje del copolímero y el ácido nucleico, o puede añadirse a cualquiera de estos antes de mezclar. La secuencia más adecuada de las etapas de mezclado dependerá de la naturaleza química de los componentes adicionales. Por ejemplo, si el componente adicional está cargado negativamente, puede ser lo más adecuado añadirlo al componente de ácido nucleico antes de mezclarlo con el copolímero o a un complejo preformado del copolímero y el ácido nucleico, donde el copolímero de la presente invención está presente en exceso en cuanto a la razón de cargas positivas con respecto a la suma de las cargas negativas del ácido nucleico y el componente adicional aniónico. A la inversa, si el componente adicional es catiónico, puede ser lo más adecuado añadirlo al copolímero de la invención antes de mezclarlo con el ácido nucleico. O puede usarse en una estequiometría para neutralizar parcialmente las cargas negativas del ácido nucleico seguido de mezclado con la disolución del copolímero de la presente invención. En el caso de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm que comprende complejos para magnetofeccióne, se ha demostrado que la agregación coloidal inducida por sal es un medio adecuado para preparar composiciones que comprenden un ácido nucleico, un polícatión o un lípido catiónico y partículas magnéticas (documento EP1297169). En el caso especial del ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, siendo el componente un oligonucleótido catiónico, puede usarse un polianión para autoensamblar el copolímero de la presente invención con el ácido nucleico. En este caso, el copolímero de la presente invención se mezcla con el oligonucleótido catiónico seguido de mezclado con el polianión. Resultará evidente para el experto en la técnica que hay numerosas opciones de formulación disponibles para obtener la composición de la presente invención. Las concentraciones de los componentes individuales se eligen según el uso previsto de la composición de la presente invención. Parámetros relevantes son la concentración final del ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como componente de ARNm y la razón de componentes tal como se describió anteriormente. Para el suministro de ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como de ARNm en cultivo celular, generalmente se prefieren concentraciones finales de ácido nucleico de entre 1 y 100 µg/ml. Para las aplicaciones *in vivo*, las concentraciones finales de ácido nucleico a modo de ejemplo útiles pueden ser de hasta 5 mg/ml.

La composición de la presente invención puede almacenarse en suspensión acuosa o puede secarse. Por lo tanto, en una realización preferida, la composición de la presente invención se almacena en forma seca, opcionalmente forma secada por congelación (liofilizada). En una realización más preferida, el complejo o la composición secada o liofilizada también comprende un lioprotector. Los lioprotectores son moléculas que protegen el material seco (por congelación). Tales moléculas son normalmente compuestos polihidroxílicos tales como azúcares (mono-, di- y polisacáridos), polialcoholes y sus derivados. Se sabe que la trehalosa y la sacarosa son protectores naturales para los procesos de secado. La trehalosa se produce por una variedad de plantas, hongos y animales invertebrados que permanecen en un estado de animación suspendida durante períodos de sequía (también conocida como anhidrobiosis). Azúcares tales como trehalosa, lactosa, rafinosa, sacarosa, manosa, sorbitol, manitol, xilitol, polietilenglicol, dextrinas, urea, maltodextrinas, fructanos, maltooligosacáridos, mano-oligosacáridos, cicloinulohexaosa, hidroxietilalmidón, dextranos, inulina, polivinilpirrolidona o aminoácidos tales como triptófano, glicina y fenilalanina son lioprotectores particularmente adecuados en el alcance de la presente invención. Lo más preferiblemente, se usa trehalosa en este contexto.

#### 50 Aspectos farmacéuticos

La composición de la presente invención o el copolímero de la presente invención puede usarse para suministrar un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, al tejido o al interior de una célula diana. El término "suministrar un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula" significa preferiblemente la transferencia del ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, al interior de la célula. Dicho uso puede ser *in vivo* o *in vitro*.

Las composiciones de la presente invención pueden usarse también en un método para suministrar un ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula o tejido diana que comprende la etapa de poner en contacto una composición según la invención con la célula o tejido diana. Un método de este tipo puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. El método *in vivo* no se reivindica. La puesta en contacto puede lograrse por medios y métodos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, si el método se lleva a cabo *in vitro*, la puesta en contacto puede lograrse cultivando las células en presencia de la composición en el medio de cultivo o añadiendo la composición a las células. Si el método se lleva a cabo *in vivo*, la puesta en contacto con células o tejidos puede lograrse, por ejemplo, mediante la administración de la composición a un individuo por vías de administración

conocidas por el experto en la técnica, en particular por cualquier vía de administración que se emplee habitualmente en el campo de la terapia genética. Las posibles formas de formular la composición y de administrarla a un individuo también se describen adicionalmente a continuación.

- 5 El término "*in vivo*" se refiere a cualquier aplicación que se efectúa al cuerpo de un organismo vivo en la que dicho organismo es preferiblemente multicelular, más preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. El término "*in vitro*" se refiere a cualquier aplicación que se efectúa a partes del cuerpo de un organismo vivo aisladas y fuera de dicho organismo, por ejemplo, células, tejidos y órganos, en la que dicho organismo es preferiblemente multicelular, más preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano.
- 10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición según la invención y opcionalmente un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este contexto, se entenderá que la composición según la invención como se define en el presente documento puede ser/puede usarse como una composición farmacéutica por sí sola. El término "composición farmacéutica" se refiere a una forma farmacéuticamente aceptable de la composición de la presente invención que puede administrarse a un sujeto. La composición farmacéutica es adecuada para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia (incluyendo profilaxis).
- 15 La expresión "forma farmacéuticamente aceptable" significa que la composición se formula como una composición farmacéutica, en la que dicha composición farmacéutica puede comprender además un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. En la técnica se conocen bien ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes o disoluciones estériles. Composiciones que comprenden tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden 20 administrarse al sujeto a una dosis adecuada. El régimen de dosificación lo determinará el médico encargado y los factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier sujeto dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una dosis típica de sustancias activas puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios 25 gramos. Aplicado a la terapia con ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, la dosificación del ácido nucleico para su expresión o para la inhibición de la expresión debe corresponder a este intervalo; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. En general, el régimen como administración 30 regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 0,1 µg a 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal al día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal, respectivamente. El progreso puede monitorizarse mediante evaluación periódica. Las dosificaciones variarán pero una dosificación preferida para la administración intravenosa de ácido nucleico, en particular, ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, como constituyentes de la 35 composición de la presente invención, es de aproximadamente  $10^6$  a  $10^{19}$  copias de la molécula de ácido nucleico.
- 40 40 El término "administrado" abarca cualquier método adecuado para introducir la composición en el cuerpo de un sujeto. La administración de composiciones adecuadas puede realizarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, intratecal, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal, pulmonar por inhalación o intrabronquial u oral o rectal. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en particular como una matriz activada por genes tal como se describe por Shea *et al.* (Shea *et al.* 1999, Nat Biotechnol, 17, 551-554) y en el documento EP1198489.
- 45 En principio, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse local o sistémicamente. La administración será preferentemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, aunque otras formas de administración están dentro del alcance de la invención. La administración directamente al sitio diana, por ejemplo, por catéter a un sitio en un vaso sanguíneo, también es concebible. La administración puede, por ejemplo, producirse también mediante inyección directa en un sitio diana tal como un tumor. También dentro del alcance de la invención está la administración por aerosolización o nebulización o administración oral. Preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes 50 no acuosos son propilenglicol, polielenglicol, fluorocarbonos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato, o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, y reabastecedores de electrolitos (tales como 55 los basados en dextrosa de Ringer). También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Además, la composición farmacéutica puede comprender agentes adicionales tales como interleucinas o interferones dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica.
- 60 60 65 Una composición farmacéutica según la presente invención puede usarse en un método de tratamiento (no reivindicado) que comprende administrar la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente para

hacer que el ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, contenido en dicha composición, provoque un efecto preventivo o terapéutico. Notablemente, el término “paciente” comprende animales y seres humanos.

- 5 Al administrar la composición farmacéutica de la presente invención, pueden tratarse o prevenirse enfermedades. El término “enfermedad” se refiere a cualquier afección patológica concebible que pueda tratarse, prevenirse o contra la que puede vacunarse empleando una realización de la presente invención. En una realización preferida de dicho método, dichas enfermedades pueden ser hereditarias, adquiridas, infecciosas o no infecciosas, relacionadas con la edad, cardiovasculares, metabólicas, intestinales, neoplásicas (en particular cáncer) o genéticas. Una enfermedad 10 puede basarse, por ejemplo, en irregularidades de procesos fisiológicos, procesos moleculares, reacciones bioquímicas dentro de un organismo que a su vez pueden basarse, por ejemplo, en el equipo genético de un organismo, en el comportamiento, factores sociales o ambientales tales como la exposición a productos químicos o radiación. En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratamientos como se da a conocer en la solicitud de patente WO2011/012316.
- 15 En línea con el método de tratamiento descrito anteriormente, la presente invención se refiere en otra realización al uso de la composición de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad que puede tratarse proporcionando dicho ácido nucleico, en particular ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, contenido en dicha composición, a un tejido u órgano dentro del 20 cuerpo de un paciente afectado por una enfermedad.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### Materiales:

##### Producción de ARNm de Luc modificado químicamente

- 30 Para generar un molde para la transcripción *in vitro* (IVT), se linealizó el plásmido pVAXA120-Luc mediante digestión por restricción con NotI. El molde se purificó además por precipitación con cloroformo-etanol. La calidad del molde se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa nativa. La IVT se llevó a cabo con una mezcla de IVT estándar que contenía ribonucleótidos trifosfato y ARN polimerasa de T7. Se introdujeron modificaciones usando un 25 % de 5-metil-citidina-5'-trifosfato y un 25 % de 2-tio-uridina-5'-trifosfato. Se realizó la protección de extremos usando la enzima de protección de extremos del virus de la variolovacuna, rGTP y S-adenosilmetionina (SAM) como donador de metilo para añadir una estructura caperuza-0 de 7-metilguanilato (m7GpppG) al extremo 5' del ARNm. La purificación del ARNm se realizó mediante precipitación con acetato de amonio. El ARN de Luc modificado se resuspendió en agua para inyección y se realizó el control de calidad usando medición UV, electroforesis en gel de agarosa nativa y transfección en células NIH3T3.

##### Polímeros y pesos moleculares medios de unidad de repetición de polímero:

Los polímeros se sintetizaron a partir de aziridina (E), azetidina (P) o una mezcla estequiométrica de aziridina (E) y azetidina (P) a razones molares de monómeros (E:P) de 1:0, 0,8:1 y 0:1. La aziridina y la azetidina se homopolimerizaron y copolimerizaron partiendo de una disolución de los monómeros en agua (concentración total de monómero(s): 50 % p/p). Las polimerizaciones se realizaron a 130 °C durante 20 - 70 h con 0,001 equivalentes de ácido sulfúrico. Los homopolímeros con una razón E:P de 1:0 y 0:1, respectivamente, se produjeron con fines comparativos.

- 50 De esta manera, se prepararon copolímeros ramificados aleatorios de unidades de repetición de etilamina (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<; “E”; peso molecular 42 g/mol) y propilamina (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<; “P”; peso molecular 56 g/mol) que reflejan la estequiometría de los monómeros. El peso molecular medio de las unidades polymerizadas se calculó según la fórmula

$$M_w = \frac{E \times 42 + P \times 56}{(E + P)}$$

- 55 Esto produce los siguientes resultados:

| E   | P | Mw medio |
|-----|---|----------|
| 1   | 0 | 42,00    |
| 0,8 | 1 | 49,78    |
| 0   | 1 | 56,00    |

**Disoluciones madre:**

Disolución madre de polímero: 0,5 mg/ml en agua para inyección

5 Disolución madre de ARNm: 0,05 mg/ml de disolución madre en agua para inyección

**Razón N/P y preparación de complejos de ARNm con polímeros**

10 La razón N/P refleja la razón molar de entrada de nitrógeno en una cantidad dada de polímero con respecto a fosfato en una cantidad dada de ARNm usada para preparar un complejo de polímero-ARNm. El peso molecular medio de un ribonucleótido monofosfato en un ARNm es de 346 g/mol.

15 Por lo tanto, el volumen de disolución madre de polímero ( $v_{polímero}$ ) de una concentración dada ( $c_{polímero}$ ) requerida para un peso dado de ARNm ( $w_{ARN}$ ) a una razón N/P deseada es el siguiente:

$$v_{polímero} = \frac{w_{ARN} \times Mw_{polímero} \times N/P}{346 \times c_{polímero}}$$

20 Por consiguiente, los volúmenes de disoluciones madre de polímero dados en la tabla a continuación se diluyeron con los volúmenes dados de agua para inyección hasta 25 µl en pocillos individuales de las filas A y E, respectivamente, de una placa de 96 pocillos.

| N/P              | 4     | 8     | 10    | 12    | 16    | 20    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| E:P = 1:0 (µl)   | 1,21  | 2,43  | 3,03  | 3,64  | 4,86  | 6,07  |
| H2O (µl)         | 23,79 | 22,57 | 21,97 | 21,36 | 20,14 | 18,93 |
| N/P              | 4     | 8     | 10    | 12    | 16    | 20    |
| E:P = 0,8:1 (µl) | 1,44  | 2,88  | 3,60  | 4,32  | 5,75  | 7,19  |
| H2O (µl)         | 23,56 | 22,12 | 21,40 | 20,68 | 19,25 | 17,81 |
| N/P              | 4     | 8     | 10    | 12    | 16    | 20    |
| E:P = 0:1 (µl)   | 1,62  | 3,24  | 4,05  | 4,86  | 6,47  | 8,09  |
| H2O (µl)         | 23,38 | 21,76 | 20,95 | 20,14 | 18,53 | 16,91 |

25 Posteriormente, se añadieron 25 µl de disolución madre de ARNm (correspondiente a 1,25 µg de ARNm) a las disoluciones de polímero para producir la razón N/P deseada. A los pocillos en las filas B a D y F a H, respectivamente, se les proporcionaron 25 µl de agua para inyección a cada uno. Después de 30 min de incubación, se transfirieron 25 µl de los complejos de la fila A o E, respectivamente, a la fila B o F, respectivamente usando una pipeta multicanal y se mezclaron. Posteriormente, se transfirieron 25 µl de la fila B a la fila C o de F a G, respectivamente, se mezclaron y de C a D o G a H, respectivamente.

**Células, transfección y ensayo de luciferasa**

30 Se cultivaron células HEK293 (DSMZ ACC305, Lot21) en DMEM, MEM, MEM incluyendo cada uno el 10 % de FBS + el 1 % de P/S. Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de 5.000 células en 100 µl de medio de cultivo celular en una placa de 96 pocillos. Se transfirieron veinte µl de cada una de las series de dilución de complejo de polímero-ARNm a las células, correspondientes a 125/62,5 ng de ARNm por pocillo. Después de 24 h de incubación, se retiraron los sobrenadantes del cultivo celular, se lavaron las células con PBS y luego se les proporcionaron 100 µl de tampón de lisis (Tris HCl 25 mM, TritonX 100 al 0,1 %, pH 7,8).

40 Ensayo de luciferasa: se cargaron 80 µl del lisado en un pocillo de una placa blanca de 96 pocillos y se usaron para la medición de la actividad de luciferasa en un instrumento Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer). Para este fin, se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa (D-luciferina 0,5 mM, coenzima A 0,3 mM, DTT 33 mM, ATP 0,5 mM, carbonato de magnesio 1 mM, sulfato de magnesio 2,7 mM, EDTA 0,1 mM, tricina 20 mM) y se determinó la quimioluminiscencia. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Resultados:**

45 El experimento muestra que el ARNm de Luc modificado químicamente complejado con copolímero (0,8/1) se expresa de manera más eficiente después de la transfección de células que o bien complejado con PEI ramificado (1/0) o bien con PPI (0/1) (figura 1). Conjuntamente, esto muestra que el objeto de la presente invención puede abordarse adecuadamente mediante el método y las preparaciones farmacéuticas según la presente invención.

**Ejemplo 2**

5      **Aplicación en aerosol *in vivo* de ARNm modificado químicamente que codifica luciferasa de luciérnaga (Luc) formulado con copolímeros a los pulmones de cerdo**

**Productos químicos**

10     Véase el ejemplo 1 anterior

**Producción de ARNm de Luc modificado químicamente**

15     Véase el ejemplo 1 anterior

**Procedimiento experimental**

20     La sedación del cerdo se inició mediante medicación previa con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido de la inserción de una vía intravenosa en la vena auricular lateral. El cerdo se anestesió mediante inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según se requiera. La anestesia se mantuvo con infusión intravenosa continua de propofol al 1 % según se requiera. Los parámetros de ventilación se hicieron coincidir con dióxido de carbono endexpiratorio y se ajustaron si era necesario. La anestesia, los parámetros respiratorios y cardiovasculares se monitorizaron de manera continua usando oximetría de pulso, capnografía, sonda de temperatura rectal y estado de reflejos. El cerdo recibió infusión de disolución electrolítica equilibrada a 10 ml/kg/h. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 80-120 min. El cerdo se sacrificó con inyección en bolo de pentobarbital 100 mg/kg de peso corporal a través de la vena lateral de la oreja después de completarse la aplicación de aerosol (nebulizador de malla Aeroneb). Se extirparon los pulmones y se cortaron muestras de tejido de aproximadamente 1 cm de grosor de diversas regiones pulmonares seguido de incubación en medio de cultivo celular durante 24 horas a 37 °C (5 % de dióxido de carbono) en una incubadora. Para la medición de la actividad de luciferasa, se incubaron muestras de tejido en un baño de medio que comprendía sustrato de D-luciferina en PBS (100 µg/ml) a 37 °C durante 30 min y se sometieron a obtención de imágenes bioluminiscentes de luciferasa *ex vivo* (IVIS 100, Xenogen, Alameda, EE. UU.).

**Preparación de poliplexos de copolímero-ARNm**

35     Se formaron poliplexos usando una bomba de jeringa de dos canales (KDS-210-CE, KD Scientific). Se diluyeron ARNm y copolímero (0,8/1, 1/0, 0/1 o PEI de 25 kDa) cada uno en 12,0 ml de agua doblemente destilada dando como resultado una concentración de 500 µg/ml de ARNm (concentración de copolímero o PEI ramificado de 25 kDa correspondiente a una razón N/P de 10). Ambas disoluciones se cargaron en una jeringa separada de 20 ml usando la función de extracción de la bomba de jeringa a una velocidad de 5 ml/min. Para mezclar ambas muestras, las dos jeringas se conectaron a través de un tubo (Safeflex Extension Set, B. Braun) a una pieza en t. El mezclado se realizó usando la función de infusión de la bomba de jeringa a una velocidad de 40 ml/min. Los complejos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso. Se observó en el transcurso de la presente invención que es específicamente ventajoso usar solo agua sin ningún tampón para la formación de complejos porque, de otro modo, las nanopartículas pueden agregarse o ser ineficaces en los pulmones de los ratones (Rudolph *et al.*, J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501).

**Resultados:**

50     El experimento muestra que ARNm de Luc modificado químicamente complejado con copolímero (0,8/1) se expresa de manera más eficiente en las células pulmonares de un cerdo tras la administración por aerosol pulmonar que complejado con PEI de 25 kDa (1/0) o PPI (0/1) (figura 2). Conjuntamente, esto muestra que el objeto de la presente invención puede abordarse adecuadamente mediante el método y las preparaciones farmacéuticas según la presente invención.

**Ejemplo 3**

55     **Aplicación *in vivo* de ARNm modificado químicamente que codifica luciferasa de luciérnaga (Luc) formulado con copolímeros a los pulmones de ratones**

**Productos químicos**

60     Véase el ejemplo 1 anterior

**Producción de ARNm de Luc modificado químicamente**

65     Véase el ejemplo 1 anterior

### **Procedimiento experimental**

Se prepararon poliplexos de un copolímero ramificado 0,8/1 (unidades de etilamina/propilamina) ("br-Homo") y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga, y de polietilenimina ramificada ("br-PEI") y el ARNm y se aplicaron o bien como un líquido intratraqueal ( $n = 3$ ), (25 µg de ARNm en un volumen de 100 µl) o bien como una pulverización intratraqueal (12,5 µg de ARNm en un volumen de 50 µl) usando un dispositivo Microsprayer de alta presión (PennCentury, EE. UU.). Todos los experimentos fueron aprobados por las autoridades locales (Regierung von Oberbayern) y se realizaron según la ley alemana de bienestar animal. Se anestesiaron ratones Balb/c adultos hembra en una cámara de inhalación de isoflurano. Posteriormente, las formulaciones de prueba se aplicaron directamente en la tráquea usando una fuente de luz personalizada y una pequeña espátula animal. Los animales se recuperaron de la anestesia en minutos. Después de 6 horas, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de fentanilo/midazolam/međetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicó D-luciferina (1,5 mg diluidos en 50 µl de PBS) en las fosas nasales de los animales anestesiados y, por lo tanto, se inhalaron en las vías respiratorias más profundas. La obtención de imágenes de bioluminiscencia se realizó usando un sistema de obtención de imágenes IVIS Lumina XR (Perkin Elmer, EE. UU.). Los resultados se muestran en la figura 3.

### **Descripción de las figuras**

Figura 1

Se formaron poliplexos usando copolímero 0,8/1, 1/0 o 0/1 (unidades de etilamina/propilamina) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a las razones N/P indicadas. Después de 24 h, se lisaron células HEK293 transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (125 o 62,5 ng) y se analizaron para determinar la actividad de luciferasa.

Figura 2

Se formaron poliplexos usando copolímero 0,8/1, 1/0 o 0/1 (unidades de etilamina/propilamina), PEI (y PEI ramificado disponible comercialmente, 25 kDa, Sigma-Aldrich) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a una razón N/P de 10. Veinticuatro horas después de la administración de aerosol en cerdos, se extirparon los pulmones y se analizó la actividad de luciferasa de luciérnaga mediante obtención de imágenes bioluminiscentes en cortes de tejido pulmonar.

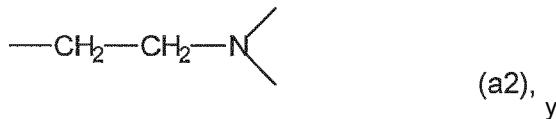
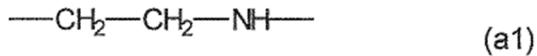
Figura 3

Se aplicaron poliplexos de un copolímero ramificado 0,8/1 (unidades de etilamina/propilamina) ("br-Homo") y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga, y de polietilenimina ramificada ("br-PEI") y el ARNm a ratones como un líquido intratraqueal y como una pulverización intratraqueal. La figura muestra los resultados de las pruebas de obtención de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de obtención de imágenes IVIS Lumina XR (Perkin Elmer, EE. UU.).

## REIVINDICACIONES

1. Un copolímero estadístico que comprende una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (a1) y (a2):

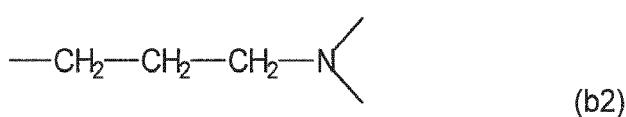
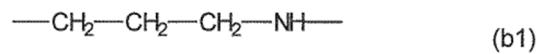
5



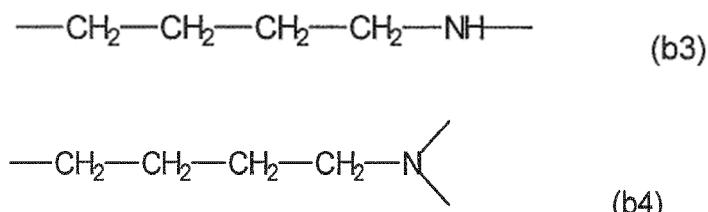
10

una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes fórmulas (b1) a (b4):

15



20



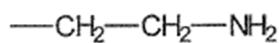
en el que la razón molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y

25

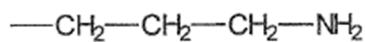
en el que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) contenidas en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

2. El copolímero según la reivindicación 1, que es un copolímero ramificado o dendrítico que comprende uno o más tipos de unidades de repetición seleccionadas de unidades de repetición (a2), (b2) y (b4).
3. El copolímero según la reivindicación 1, que es un copolímero lineal que comprende unidades de repetición (a1) y (b1).
- 35 4. El copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las unidades de repetición (a) y (b) representan el 80 % en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero.
5. El copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las unidades de repetición (a) seleccionadas de (a1) y (a2) y las unidades de repetición (b) seleccionadas de (b1) y (b2) representan el 80 % en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero.
- 40 6. El copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los grupos terminales del copolímero comprenden uno o más tipos de grupos (c) seleccionados independientemente de grupos de las fórmulas (c1) a (c3):

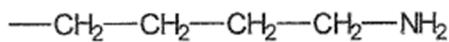
45



(c1)



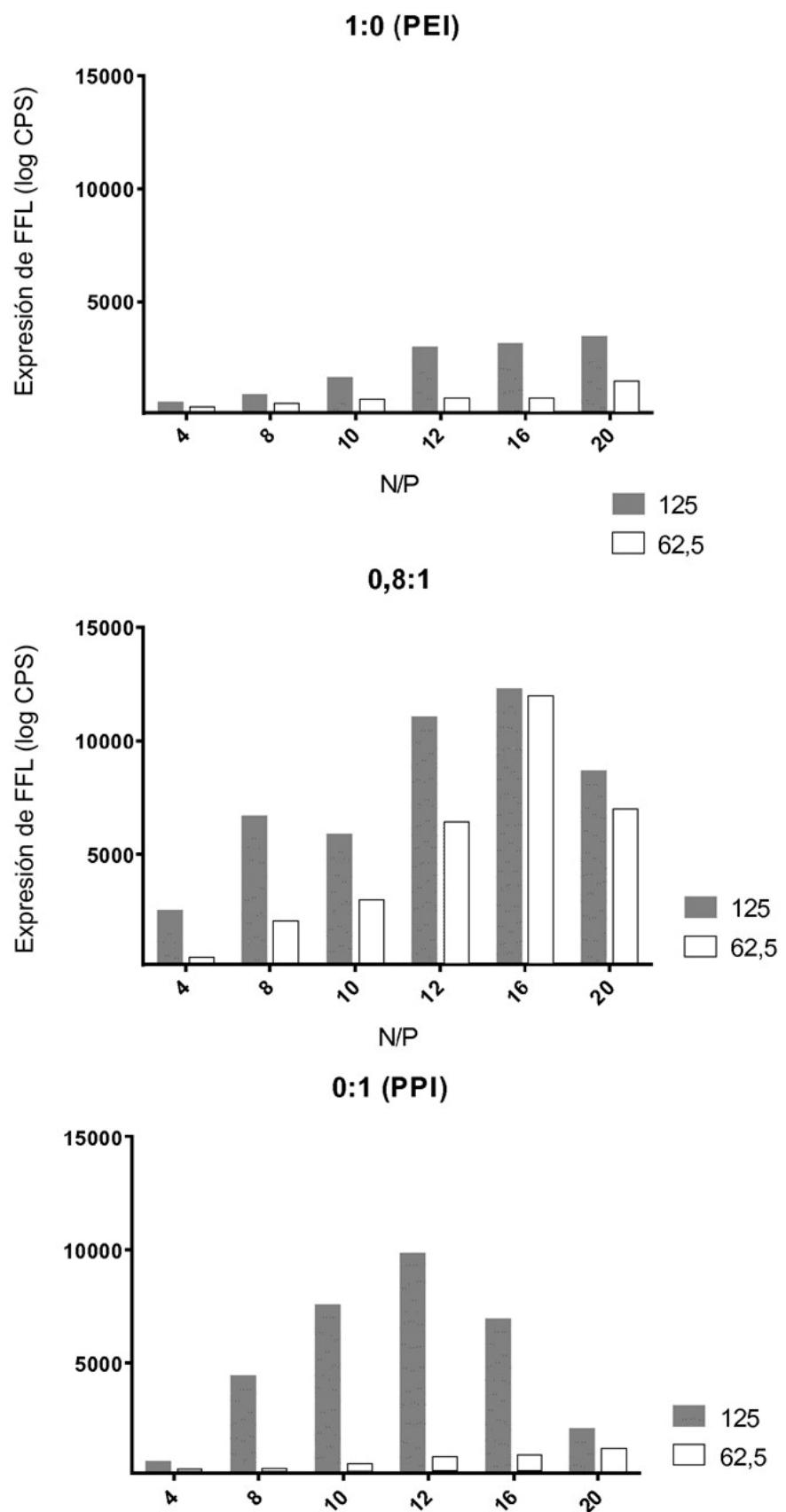
(c2)



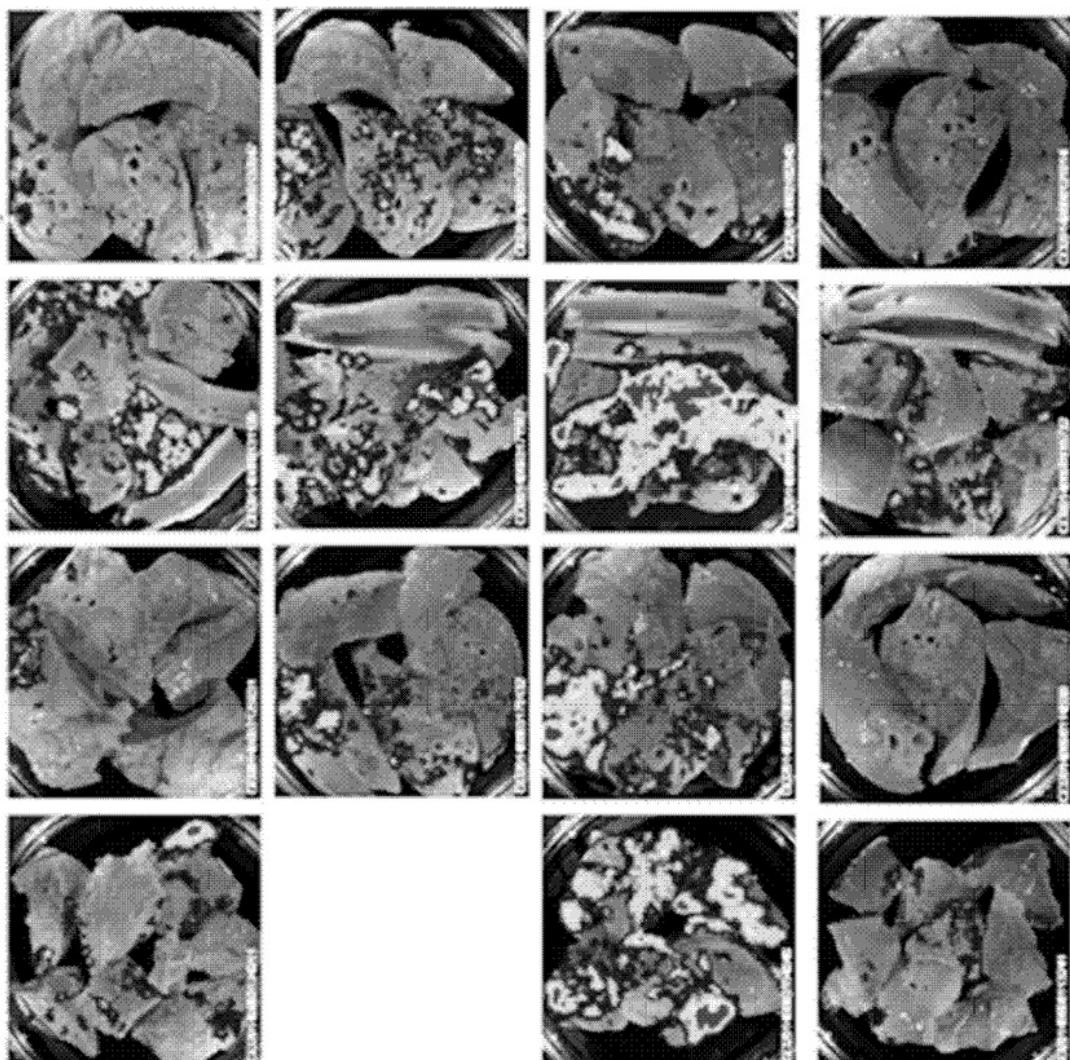
(c3).

7. El copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la razón molar de las unidades de repetición (a) con respecto a las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,8/1,0 a 1,0/0,8.
- 5 8. El copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que puede obtenerse polimerizando una mezcla de monómeros que comprende aziridina, azetidina y opcionalmente pirrolidina.
- 10 9. Una composición que comprende un ácido nucleico y un copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. La composición según la reivindicación 9, en la que el ácido nucleico es ARNm.
- 15 11. La composición según la reivindicación 9 o 10, en la que el copolímero es un copolímero catiónico, y en la que el copolímero catiónico forma un complejo con el ácido nucleico.
- 20 12. Una composición farmacéutica que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, y opcionalmente un diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable adicional.
- 20 13. Un copolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en terapia suministrando un ácido nucleico a una célula.
- 25 14. Un método *in vitro* para suministrar un ácido nucleico a una célula o tejido diana que comprende la etapa de poner en contacto una composición o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 con la célula o tejido diana.
- 30 15. Un método para la producción del copolímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la etapa de polimerizar una mezcla de monómeros que comprende aziridina, azetidina y opcionalmente pirrolidina.

Figura 1



**Figura 2**



brPEI

1:0 (PEI)

0,8:1

0:1 (PPI)

Figura 3

