

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 531**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00	(2006.01) A61K 8/88	(2006.01)
A01N 1/02	(2006.01) A61Q 90/00	(2009.01)
C40B 40/10	(2006.01) A23G 9/38	(2006.01)
A23G 9/32	(2006.01) A23L 13/40	(2013.01)
A23L 3/37	(2006.01) A23L 17/00	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01) A23B 4/20	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)	
C07K 7/08	(2006.01)	
C08G 69/10	(2006.01)	
A23L 3/3526	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2016** **PCT/US2016/056852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2017** **WO17066454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2016** **E 16856195 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023** **EP 3370518**

54 Título: **Composiciones y métodos para reducir la formación de cristales de hielo**

30 Prioridad:

14.10.2015 US 201562241588 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2024

73 Titular/es:

X-THERMA, INC. (100.0%)
2600 Hilltop Drive
Richmond, California 94806, US

72 Inventor/es:

WEI, XIAOXI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 958 531 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 y métodos para reducir la formación de cristales de hielo

5 **Antecedentes de la invención**

Los agentes crioprotectores (CPA) son compuestos que, cuando están presentes en solución, pueden reducir o inhibir la formación de cristales de hielo en soluciones expuestas a temperaturas inferiores a 0 °C. Los CPA actuales incluyen moléculas pequeñas (a menudo denominadas CPA penetrantes), polímeros sintéticos y proteínas anticongelantes.

El trasplante de órganos es actualmente el mejor tratamiento para la insuficiencia orgánica en fase terminal en términos de supervivencia, calidad de vida y rentabilidad. Desafortunadamente, existe una gran brecha entre la oferta y la demanda de trasplantes de órganos, y es uno de los principales obstáculos médicos que obliga a los pacientes con enfermedades debilitantes a sufrir una baja calidad de vida durante un largo período de espera. La aparente falta de órganos se debe al considerable deterioro por la falta de un método de preservación fiable. De hecho, más del 50 % de los pulmones, páncreas y corazones siguen sin extraerse de los donantes fallecidos.

Para preservar adecuadamente los órganos, deben irrigarse con una solución de preservación para eliminar la sangre y estabilizar los órganos. Incluso una vez estabilizados en la solución de preservación, solo hay un tiempo limitado disponible para la asignación, transporte y trasplante de órganos después de su extracción del donante (-6-12 horas). Este pequeño intervalo de tiempo da como resultado que la mayoría de los órganos se destinen a pacientes locales puesto que las compatibilidades con pacientes remotos a menudo no se pueden confirmar en un tiempo limitado. Como resultado de esta escasez y a pesar de las leyes que existen en casi todos los países que prohíben la venta de los propios órganos, el comercio ilícito de órganos y la trata de personas han aumentado para abastecer la demanda.

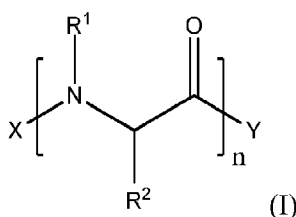
Los CPA penetrantes actuales usados en la preservación de órganos incluyen etilenglicol, 1,2-propanodiol, dimetilsulfóxido, formamida, glicerol, sacarosa, lactosa y D-manitol, generalmente entre otros. Con el fin de reducir o inhibir el crecimiento de cristales de hielo a temperaturas de preservación de los órganos, la concentración efectiva de los CPA penetrantes debe ser muy alta (a menudo se requiere $\geq 60\%$). En concentraciones tan altas, estos compuestos pueden ser tóxicos para los tejidos que intenten preservar, y la eliminación masiva de CPA al calentar antes del trasplante puede ocasionar muerte celular irreversible.

Otros CPA usados para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo incluyen polímeros sintéticos y proteínas anticongelantes. Al igual que los CPA penetrantes, cada uno de estos tiene sus inconvenientes. Los polímeros sintéticos, por ejemplo, no son capaces de penetrar la membrana celular. De esta manera, los CPA de polímero sintético solo pueden controlar la formación de hielo extracelular. Con el fin de preservar eficazmente la muestra biológica, la formación de cristales de hielo debe controlarse tanto dentro como fuera de la célula. Las proteínas anticongelantes de origen natural, tales como las aisladas de peces, plantas o insectos, son muy eficaces para prevenir la formación de hielo, pero las proteínas anticongelantes actuales que están disponibles son de baja pureza y son extremadamente caras. Adicionalmente, el uso de proteínas anticongelantes para preservar una muestra biológica introduce una fuente potencial de inmunogenicidad. Norgren, A. S., *et al.*, 2009, *Synthesis*, 3: 488-494 describen la glucoconjugación de peptoides a través de resina mediante química click. Huang, M. L., *et al.*, 2012, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 109(49): 19922-19927, describen oligómeros peptoides biomiméticos como agentes anticongelantes de doble acción.

De esta manera, existe una necesidad en la técnica de nuevos compuestos no tóxicos para reducir o inhibir eficazmente la formación de cristales de hielo a temperaturas inferiores a 0 °C y criogénicas. La presente divulgación satisface esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

50 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona un polímero peptoide según la fórmula (I):



o estereoisómero del mismo,
en donde:

cada R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido,

alqueno C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, hidroxialquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₁₈, alquiltio C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, (cicloalquil C₃₋₁₀)alquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilalquilo, y heteroarilalquilo,

en donde al menos 4 casos de R¹ son grupos hidroxialquilo C₁₋₁₈ independientemente seleccionados, y en donde cualquiera de los grupos cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está opcional e independientemente sustituido con uno o más grupos R³;

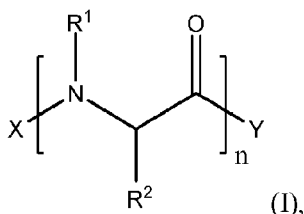
cada R² es H;

cada R³ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, oxo, tioxo, -OH, -SH, amino, alquilo C₁₋₈, hidroxialquilo C₁₋₈, alquilamino C₁₋₈ y alquiltio C₁₋₈;

X e Y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, acilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, -OH, -SH, -NH₂, carboxi, hidroxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₂₋₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, y halógeno, o

alternativamente, X e Y se toman en conjunto para formar un enlace covalente; y el subíndice n, que representa el número de monómeros en el polímero, es de entre 8 y 25.

En algunos aspectos, en el presente documento se describe un polímero peptido de fórmula (I):



un tautómero del mismo o un estereoisómero del mismo, en donde:

cada R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, hidroxialquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, (cicloalquil C₃₋₁₀)alquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilalquilo, y heteroarilalquilo;

en donde al menos un caso de R¹ es hidroxialquilo C₁₋₁₈, y en donde cualquiera de los grupos cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está opcional e independientemente sustituido con uno o más grupos R³;

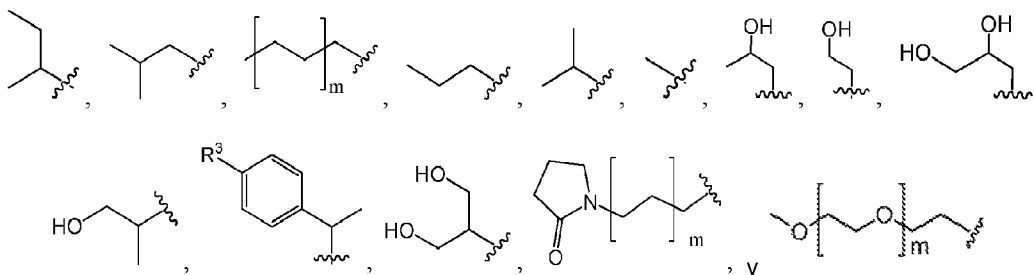
cada R² se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, hidroxialquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido y carboxialquilo opcionalmente sustituido;

cada R³ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, oxo, tioxo, -OH, -SH, amino, alquilo C₁₋₈, hidroxialquilo C₁₋₈, alquilamino C₁₋₈ y alquiltio C₁₋₈;

X e Y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, -OH, -SH, carboxi, hidroxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₂₋₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, y halógeno; o

alternativamente, X e Y se toman en conjunto para formar un enlace covalente; y el subíndice n, que representa el número de monómeros en el polímero, es de entre 2 y 50; siempre que todos los casos de R¹ no sean etilhidroxi cuando n está entre 3 y 7.

En algunas realizaciones, cada caso de R¹ en el polímero peptido se selecciona entre el grupo que consiste en:

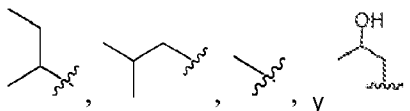


en donde:

m es entre 1 y 8; y

R³ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈, hidroxilo, tiol, nitro, amina, oxo, y tioxo.

- 5 En algunas realizaciones, cada caso de R¹ en el polímero peptoide se selecciona entre el grupo que consiste en:



- 10 En algunas realizaciones, cada caso de R¹ en el polímero peptoide es un grupo hidroxialquilo C₁₋₁₈. En algunas realizaciones, cada caso de R¹ es un grupo hidroxialquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, cada caso de R¹ es el mismo grupo hidroxialquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, cada caso de R¹ es:



- 15 Cada caso de R² es H.

- 20 En algunos aspectos, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de entre 3 y 25. En algunos aspectos, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de entre 5 y 25. En algunos aspectos, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de entre 8 y 50. En algunos aspectos, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de entre 8 y 20.

- 25 En algunas realizaciones, X e Y son H, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, -OH, -SH, carboxi, hidroxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₂₋₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, o halógeno.

En algunas realizaciones, X e Y del polímero peptoide se toman en conjunto para formar un enlace covalente.

- 30 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nsb, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nsb, o 10 monómeros Nhp.

- 35 En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp (SEQ ID NO:2), y X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb (SEQ ID NO:1), y X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp (SEQ ID NO:7), y X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb (SEQ ID NO:8), y X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp (SEQ ID NO:9), y X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈.

- 45 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nme, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nme, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nme, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nme, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nme, u 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nme.

En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 5 monómeros Nhe y 5 monómeros Nsb, o 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nbu.

- 50 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nib, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nbu, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Npr, o 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nip.

- 55 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 14, y el polímero peptoide comprende: 6 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, o 14 monómeros Nhp.

- 60 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 14, y el polímero peptoide comprende: 6 monómeros Nhp y 8 monómeros Nib, 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nib, 8 monómeros Nhp y 6 monómeros Nib, 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nib, o 14 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 16, y el polímero peptoide comprende: 5 monómeros Nhp y 11 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 9 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 12 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, o 16 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 22, y el polímero peptoide comprende: 7 monómeros Nhp y 15 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 12 monómeros Nsb, 11 monómeros Nhp y 11 monómeros Nsb, 14 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 17 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb, o 22 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, el polímero se selecciona entre el grupo de polímeros expuesto en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 o Tabla 9.

En algunas realizaciones, el polímero peptoide descrito en el presente documento forma una estructura helicoidal.

En algunas realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -40 °C. En algunas realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -200 °C (por ejemplo, -196 °C). En ciertas realizaciones, la concentración del polímero peptoide (por ejemplo, presente en una composición, formulación o producto tal como una solución crioprotectora, solución anticongelante, producto alimenticio congelado o producto de cuidado cosmético) está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 100 mM. En realizaciones particulares, la concentración del polímero peptoide está entre aproximadamente 1 y 10 mM (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un híbrido peptoide-péptido que comprende un polímero peptoide de la invención y uno o más aminoácidos, en donde los uno o más aminoácidos están situados en uno o ambos extremos del polímero peptoide. En algunas realizaciones, los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, arginina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina, y una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en isoleucina, leucina, serina, treonina, alanina, valina, arginina, y una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una solución crioprotectora que comprende un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora comprende además un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en una especie iónica, un crioprotector penetrante, un crioprotector no penetrante, un antioxidante, un compuesto estabilizador de membrana celular, una acuaporina u otro compuesto formador de canales, un alcohol, un azúcar, un derivado de azúcar, un tensioactivo no iónico, una proteína, dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), Ficoll®, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, hialuronano, formamida, un hidrogel natural o sintético, y una combinación de los mismos.

En algunos casos, la solución crioprotectora comprende además un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en propilenglicol, etilenglicol, glicerol, metanol, butilenglicol, adonitol, etanol, trimetilenglicol, dietilenglicol, óxido de polietileno, eritritol, sorbitol, xilitol, polipropilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), manitol, inositol, ditionitol, 1,2-propanodiol y una combinación de los mismos.

En algunos casos, la solución crioprotectora comprende además un azúcar que se selecciona entre el grupo que consiste en un monosacárido, un disacárido, un polisacárido y una combinación de los mismos. En algunos casos, el azúcar es un monosacárido seleccionado entre el grupo que consiste en glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, xilosa, manosa, 3-O-metil-D-glucopiranososa y una combinación de los mismos. En otros casos, el azúcar es un disacárido seleccionado entre el grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa y una combinación de los mismos. En aún otros casos, el azúcar es un polisacárido seleccionado entre el grupo que consiste en rafinosa, dextrano y una combinación de los mismos.

En otros casos, la solución crioprotectora comprende además un PEG que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 1.000 g/mol. En casos particulares, el PEG tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 200 y 400 g/mol.

En algunos casos, la solución crioprotectora comprende además una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en albúmina de suero bovino, seroalbúmina humana, gelatina y una combinación de las mismas. En otros casos, la solución crioprotectora comprende además un hidrogel natural o sintético que comprende quitosano, ácido hialurónico o una combinación de los mismos. En otros casos más, la solución crioprotectora comprende además un

tensioactivo no iónico seleccionado entre el grupo que consiste en polioxietileno lauril éter, polisorbato 80 y una combinación de los mismos.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para preservar un tejido, órgano o célula. El método comprende poner en contacto el tejido, órgano o célula con un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, una solución crioprotectora de la invención, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido modificado mediante bioingeniería. En algunas realizaciones, el tejido, órgano o célula se selecciona entre el grupo que consiste en corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, timo, córnea, células nerviosas, plaquetas de la sangre, espermatozoides, ovocitos, células embrionarias no humanas, células madre (por ejemplo, células madre pluripotentes humanas, células madre hematopoyéticas), linfocitos, granulocitos, células del sistema inmunológico, células óseas, organoides, y una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -40 °C. En algunas realizaciones, el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -200 °C (por ejemplo, -196 °C). En ciertas realizaciones, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 100 mM. En realizaciones particulares, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora está entre aproximadamente 1 y 10 mM (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM).

En otro aspecto más, en el presente documento se proporciona un método para preservar una macromolécula biológica. El método comprende poner en contacto la macromolécula biológica con un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, una solución crioprotectora de la invención, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la macromolécula biológica se selecciona entre el grupo que consiste en un ácido nucleico, un aminoácido, una proteína, una proteína aislada, un péptido, un lípido, una estructura compuesta, y una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de cuidado cosmético que comprende un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, una solución crioprotectora de la invención, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto anticongelante tal como un producto antihielo o inhibidor del hielo que comprende un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, una solución crioprotectora de la invención, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto anticongelante se usa para prevenir, inhibir o retrasar la formación de hielo en objetos que incluyen, pero sin limitaciones, aeronaves o partes de las mismas, gasoductos, ventanas, equipo eléctrico, drones, cables (por ejemplo, líneas de energía eléctrica), equipo mecánico (por ejemplo, motores de automóviles, sistemas de engranaje, sistemas de frenado, etc.) y similares.

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona un producto alimenticio congelado que comprende un polímero peptoide de la invención, un híbrido peptoide-péptido de la invención, una solución crioprotectora de la invención, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio congelado se selecciona entre el grupo que consiste en helado, yogur, marisco, fruta y productos cárnicos.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra un protocolo general para la síntesis de oligómeros peptoides usando el enfoque de "submonómero".

Las FIG. 2A y 2B muestran los resultados de un ensayo de congelación de tubo capilar que se realizó a -20 °C. La FIG. 2A ilustra el ensayo en el que los Compuestos 1 (1 eq.) y 10 (1 eq.) se disolvieron en agua MilliQ y se sometieron a temperaturas bajo cero. Se realizó una comparación con agua sola y una solución de etilenglicol (EG) (18 eq.). La FIG. 2B presenta los resultados normalizados del ensayo representado en la FIG. 2A.

Las FIG. 3A-3D muestran los datos de cristalografía de difracción de rayos X (XRD). La FIG. 3A muestra los datos

de XRD para una solución que contiene Compuesto 12 5 mM y etilenglicol (EG) al 17,5 % (v/v). La FIG. 3B muestra los datos de XRD para una solución que contiene EG al 30 % (v/v). La FIG. 3C muestra los datos de XRD para una solución que contiene EG al 17,5 % (v/v). La FIG. 3D muestra puntuaciones de anillo de hielo para varias soluciones que contienen EG, Compuesto 2 (etiquetado como "B"; SEQ ID NO:10), Compuesto 12 (etiquetado como "D"; SEQ ID NO:8), y/o Compuesto 8 (etiquetado como "E"; SEQ ID NO:9). Para cada solución diferente, se determinaron dos puntuaciones de anillo de hielo separadas.

Las FIG. 4A-4G muestran los datos de cristalografía de difracción de rayos X (XRD) para soluciones que contienen 5 mg/ml del Compuesto 10, Compuesto 12, Compuesto 8, Compuesto 13, Compuesto 11 y Compuesto 58, en comparación con un control de etilenglicol (EG). Cada solución también contenía NaCl 300 mM, HEPES 100 mM, etilenglicol al 15 % (v/v) y el pH se ajustó a 7,2. FIG. 4A: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 10 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4B: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 12 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4C: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 8 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4D: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 13 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4E: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 11 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4F: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 58 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 4G: Patrón de cristalografía de XRD de control de EG (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). Para gráficos de espectro de XRD, la intensidad se representó en un gráfico en función del ángulo (2θ grados).

Las FIG. 5A-5G muestran los datos de cristalografía de difracción de rayos X (XRD) para soluciones que contienen 1 mg/ml del Compuesto 10, Compuesto 12, Compuesto 8, Compuesto 13, Compuesto 11 y Compuesto 58, en comparación con un control de etilenglicol (EG). Cada solución también contenía NaCl 300 mM, HEPES 100 mM, etilenglicol al 17,5 % (v/v) y el pH se ajustó a 7,2. FIG. 5A: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 10 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5B: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 12 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5C: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 8 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5D: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 13 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5E: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 11 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5F: Patrón de cristalografía de XRD del Compuesto 58 (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). FIG. 5G: Patrón de cristalografía de XRD de control de EG (izquierda) y gráfico del espectro (derecha). Para gráficos de espectro de XRD, la intensidad se representó en un gráfico en función del ángulo (2θ grados).

Las FIG. 6A-6C muestran dos soluciones que se congelaron de manera instantánea, se volvieron a calentar y posteriormente se volvieron a congelar. La solución de control contenía etilenglicol (EG) al 22,5 % (v/v), mientras que la solución de prueba contenía EG al 22,5 % y 5 mg/ml (0,5 % (p/v)) del Compuesto 12. La FIG. 6A muestra que durante la rápida congelación en nitrógeno líquido, la solución que contenía el Compuesto 12 se vitrificó mientras que la solución de control se congeló completamente. La FIG. 6B muestra que durante el recalentamiento a 37 °C, la solución que contiene el Compuesto 12 se descongela (en dos segundos) mientras el control permanecía congelado. La FIG. 6C muestra que tras una noche en un congelador a -20 °C, la solución del Compuesto 12 permaneció sin congelarse, a diferencia del control.

La FIG. 7 muestra los resultados de un estudio de toxicidad celular realizado en células HEK 293 en las que el Compuesto 12 (cuadrados) o DMSO (círculos) se añadió a medios de cultivo celular. Una muestra en la que no se añadió el Compuesto 12 ni DMSO ("Medios de cultivo" (triángulos)) sirvió como control. Se realizaron diluciones en serie con el fin de analizar diferentes concentraciones de Compuesto 12 y DMSO.

La FIG. 8 muestra los resultados de un ensayo de criopreservación realizado en células HEK 293, que compara una solución que contiene etilenglicol (EG) con una solución que contiene EG y el Compuesto 12. La viabilidad celular se midió 12 horas después de la descongelación.

La FIG. 9 muestra los resultados de un ensayo de criopreservación realizado en células HEK 293, que compara una solución que contiene 5 mg/ml del Compuesto 12 más una mezcla de glicoles, disacáridos y un tampón general con soluciones que contienen VS2E o M22. La viabilidad celular se midió 16 horas después de la descongelación. Las células fueron vitrificadas con nitrógeno líquido (LN2).

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El almacenamiento de células y tejidos a bajas temperaturas mediante criopreservación es fundamental para muchos productos y aplicaciones biológicos, pero sigue siendo un problema importante que aún no ha permitido la recuperación completa satisfactoria de células, tejidos y órganos terapéuticos viables. La criopreservación normalmente se realiza con agentes crioprotectores (CPA), que son aditivos químicos fundamentales tales como dimetilsulfóxido (DMSO), albúmina de suero bovino (BSA) y otros. Los CPA se usan para mejorar la viabilidad posterior a la descongelación de los sistemas biológicos criopreservados al prevenir la nucleación y el crecimiento de cristales de hielo. Sin embargo, estos agentes presentan varios niveles de citotoxicidad en sus concentraciones eficaces y, por lo tanto, limitan el éxito de la criopreservación, de la preservación en biobancos y de la medicina regenerativa

avanzada. Esta falta de un CPA eficaz y seguro contribuye al uso generalizado de CPA tóxicos. Más allá de los productos y aplicaciones biológicos, la prevención de la formación de hielo sigue siendo un problema físico y químico para una amplia variedad de industrias y sectores tecnológicos.

- 5 La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que los polímeros de aminoácidos biomiméticos N-sustituidos (peptoides) e híbridos peptoides-péptido tienen propiedades de inhibición de cristalización en hielo. En el presente documento se proporcionan polímeros para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a temperaturas inferiores a 0 °C y criogénicas. Estos polímeros son útiles para preparar soluciones crioprotectoras. También se proporcionan en el presente documento métodos para preservar un tejido, órgano o célula usando
- 10 soluciones crioprotectoras que comprenden los polímeros peptoides descritos en el presente documento. Adicionalmente, se proporcionan productos de cuidado cosmético, antihielo y alimenticios congelados con propiedades anticongelantes que comprenden los polímeros peptoides descritos en el presente documento. Después de leer la descripción detallada, una persona con conocimientos habituales en la materia reconocerá que existen otras ventajas que se derivan de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

II. Abreviaturas y definiciones

- Las abreviaturas usadas en el presente documento son convencionales, salvo que se definan de otro modo. Las siguientes abreviaturas se usan para referirse a las unidades monoméricas del polímero peptoides: Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético), Nib (ácido 2-(isobutilamino)acético), Nbu (ácido 2-butilamino)acético), Npr (ácido 2-propilamino)acético), Nip (ácido 2-(isopropilamino)acético), Nme (ácido 2-(metilamino)acético), Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético), Nhe (ácido 2-((2-hidroxietil)amino)acético), Ndp (ácido 2-((2,3-dihidroxipropil)amino)acético), Nyp (ácido 2-((1-hidroxipropan-2-il)amino)acético), Nep (ácido 2-((1-(4-hidroxifenil)etil)amino)acético), Ndh (ácido 2-((1,3-dihidrooxipropan-2-il)amino)acético y Nop (ácido 2-((3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil)amino)acético. Las siguientes abreviaturas se usan para referirse a compuestos químicos: DMF (N,N'-dimetilformamida), DIEA (diisopropiletilamina, DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), ACN (acetronitrilo), DCM (cloruro de metileno), HFIP (alcohol hexafluoroisopropílico); Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo).

- Los términos "un/uno", "una", o "el/la", como se usan en el presente documento, no solo incluye aspectos con un miembro, sino que también incluyen aspectos con más de un miembro. Por poner un ejemplo, las formas en singular "un/uno", "una", y "el" o "la", incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el agente" incluye la referencia a uno o más agentes conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente.

- El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento para modificar un valor numérico indica un intervalo definido alrededor de ese valor. Si "X" fuera el valor, "aproximadamente X" indicaría un valor de 0,9X a 1,1X, y más preferentemente, un valor de 0,95X a 1,05X. Cualquier referencia a "aproximadamente X" indica específicamente los valores X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X y 1,05X. Por tanto, "aproximadamente X" pretende enseñar y proporcionar un soporte de descripción por escrito para una limitación de reivindicación de, p. ej., "0,98X".

- "Alquilo" se refiere a un radical alifático lineal o ramificado, saturado, que tiene el número de átomos de carbono indicado. Alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₁₋₇, C₁₋₈, C₁₋₉, C₁₋₁₀, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. Alquilo también puede referirse a grupos alquilo que tienen hasta 30 átomos de carbono, tales como, pero sin limitación, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

- "Alquenilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene al menos 2 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Alqueno puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₂, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₂₋₇, C₂₋₈, C₂₋₉, C₂₋₁₀, C₃, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄, C₄₋₅, C₄₋₆, C₅, C₅₋₆ y C₆. Los grupos alquenilo pueden tener cualquier número adecuado de dobles enlaces, incluyendo, pero sin limitaciones, 1, 2, 3, 4, 5 o más. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, vinilo (etenilo), propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, butadienilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, isopentenilo, 1,3-pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo o 1,3,5-hexatrienilo. Los grupos alquenilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

- "Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene al menos 2 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Alquinilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₂, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₂₋₇, C₂₋₈, C₂₋₉, C₂₋₁₀, C₃, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄, C₄₋₅, C₄₋₆, C₅, C₅₋₆ y C₆. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, acetileno, propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, butadienilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, isopentinilo, 1,3-pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo o 1,3,5-hexatrienilo. Los grupos alquinilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los

grupos alquilino pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Alquileno" se refiere a un radical alifático lineal o ramificado, saturado, que tiene el número de átomos de carbono indicado, y que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del grupo alquileno. Por poner un ejemplo, un alquileno de cadena lineal puede ser el radical bivalente de $-(CH_2)_n-$, donde n es cualquier número de átomos de carbono adecuados. Los grupos alquileno representativos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, isobutileno, sec-butileno, pentileno y hexileno. Los grupos alquileno pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquileno pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Alquenileno" se refiere a un grupo alquenilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquenileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del alquenileno. Los grupos alquenileno incluyen, pero no se limitan a, etenileno, propenileno, isopropenileno, butenileno, isobutenileno, sec-butenileno, pentenileno y hexenileno. Los grupos alquenileno pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquenileno pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Alquinileno" se refiere a un grupo alquilino, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquinileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del alquinileno. Los grupos alquinileno incluyen, pero no se limitan a, etinileno, propinileno, isopropinileno, butinileno, sec-butinileno, pentinileno y hexinileno. Los grupos alquinileno pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquinileno pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

"Amina" o "amino" se refiere a un grupo $-N(R)_2$ donde los grupos R pueden ser hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, entre otros. Los grupos R pueden ser iguales o diferentes. Los grupos amino pueden ser primarios (cada R es hidrógeno), secundarios (un R es hidrógeno) o terciarios (cada R es distinto de hidrógeno). Los grupos alquilo, alquenilo, alquilino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Hidroxilo" o "hidroxilo" se refiere a un grupo $-OH$. El hidroxilo puede estar en cualquier átomo de carbono adecuado.

"Tiol" se refiere a un grupo $-SH$. El grupo tiol puede estar en cualquier átomo de carbono adecuado.

"Oxo" se refiere a un grupo O de doble enlace ($=O$, $-C(O)-$). El grupo oxo puede estar en cualquier átomo de carbono adecuado.

"Tioxo" se refiere a un grupo S de doble enlace ($=S$). El grupo tioxo puede estar en cualquier átomo de carbono adecuado.

"Nitro" se refiere a un grupo $-NO_2$. El grupo nitro puede estar en cualquier átomo de carbono adecuado.

"Carboxi" se refiere a un grupo de ácido carboxílico de fórmula $-C(O)OH$ o $-CO_2H$.

"Cicloalquilo" se refiere a un conjunto de anillo monocíclico, bicíclico condensado o policíclico con puente saturado o parcialmente insaturado, que contiene de 3 a 12 átomos en el anillo, o el número de átomos indicado. Cicloalquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C_{3-6} , C_{4-6} , C_{5-6} , C_{3-8} , C_{4-8} , C_{5-8} , C_{6-8} , C_{3-9} , C_{3-10} , C_{3-11} y C_{3-12} . Los anillos cicloalquilo monocíclicos saturados incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y ciclooctilo. Los anillos cicloalquilo bicíclicos y policíclicos saturados incluyen, por ejemplo, norbornano, [2,2,2]bicyclooctano, decahidronaftaleno y adamantano. Los grupos cicloalquilo también pueden estar parcialmente insaturados, que tienen uno o más dobles o triples enlaces en el anillo. Los grupos cicloalquilo representativos que están parcialmente insaturados incluyen, pero no se limitan a, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohexadieno (isómeros 1,3 y 1,4), ciclohepteno, cicloheptadieno, cicloocteno, ciclooctadieno (isómeros 1,3, 1,4 y 1,5), norborneno y norbornadieno. Cuando el cicloalquilo es un cicloalquilo C_{3-8} monocíclico saturado, los grupos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Cuando el cicloalquilo es un cicloalquilo C_{3-6} monocíclico saturado, los grupos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquilino, halo, hidroxilo, amino, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, tiol, nitro, oxo, tioxo y ciano. Por ejemplo, los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos con alquilo C_{1-6} u oxo ($=O$), entre muchas otros.

"Heterocicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo saturado que tiene de 3 a 12 miembros de anillo y de 1 a 4 heteroátomos de N, O y S. También pueden ser útiles heteroátomos adicionales, incluyendo, pero sin limitaciones, B, Al, Si y P. Los heteroátomos también pueden estar oxidados, tales como, pero sin limitaciones, -S(O)- y -S(O)₂-. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir cualquier número de átomos en el anillo, tal como, de 3 a 6, de 4 a 6, de 5 a 6, de 3 a 8, de 4 a 8, de 5 a 8, de 6 a 8, de 3 a 9, de 3 a 10, de 3 a 11 o de 3 a 12 miembros de anillo. Cualquier número adecuado de heteroátomos puede incluirse en los grupos heterocicloalquilo, tal como 1, 2, 3 o 4, o de 1 a 2, de 1 a 3, de 1 a 4, de 2 a 3, de 2 a 4, o de 3 a 4. El grupo heterocicloalquilo puede incluir grupos, tales como aziridina, azetidina, pirrolidina, piperidina, azepano, azocano, quinuclidina, pirazolidina, imidazolidina, piperazina (isómeros 1,2, 1,3 y 1,4), oxirano, oxetano, tetrahidrofurano, oxano (tetrahidropirano), oxepano, tiirano, tietano, tiolano (tetrahidrotiofeno), tiano (tetrahidrotiopirano), oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, dioxolano, ditiolano, morfolina, tiomorfolina, dioxano o ditiano. Los grupos heterocicloalquilo también pueden condensarse a sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos para formar miembros, que incluyen, pero sin limitaciones, indolina. Los grupos heterocicloalquilo pueden estar no sustituidos o sustituidos. Los grupos heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano. Por ejemplo, los grupos heterocicloalquilo pueden estar sustituidos con alquilo C₁₋₆ u oxo (=O), entre muchas otros.

Los grupos heterocicloalquilo pueden estar unidos mediante cualquier posición en el anillo. Por ejemplo, aziridina puede ser 1- o 2-aziridina, azetidina puede ser 1- o 2-azetidina, pirrolidina puede ser 1-, 2- o 3-pirrolidina, piperidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-piperidina, pirazolidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-pirazolidina, imidazolidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-imidazolidina, piperazina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-piperazina, tetrahidrofurano puede ser 1- o 2-tetrahidrofurano, oxazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-oxazolidina, isoxazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-isoxazolidina, tiazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-tiazolidina, isotiazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-isotiazolidina, y morfolina puede ser 2-, 3- o 4-morfolina.

Cuando el heterocicloalquilo incluye de 3 a 8 miembros de anillo y de 1 a 3 heteroátomos, los miembros representativos incluyen, pero no se limitan a, pirrolidina, piperidina, tetrahidrofurano, oxano, tetrahidrotiofeno, tiano, pirazolidina, imidazolidina, piperazina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, morfolina, tiomorfolina, dioxano y ditiano. El heterocicloalquilo también puede formar un anillo que tiene de 5 a 6 miembros de anillo y de 1 a 2 heteroátomos, incluyendo los miembros representativos, pero sin limitaciones, pirrolidina, piperidina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirazolidina, imidazolidina, piperazina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina y morfolina.

"Arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático que tiene cualquier número adecuado de átomos en el anillo y cualquier número adecuado de anillos. Los grupos arilo pueden incluir cualquier número adecuado de átomos en el anillo, tal como, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos en el anillo, así como de 6 a 10, de 6 a 12 o de 6 a 14 miembros de anillo. Los grupos arilo pueden ser monocíclicos, condensados para formar grupos bicíclicos o tricíclicos, o unidos por un enlace para formar un grupo biarilo. Los grupos arilo representativos incluyen fenilo, naftilo y bifenilo. Otros grupos arilo incluyen bencilo, que tiene un grupo de unión de metileno. Algunos grupos arilo tienen de 6 a 12 miembros de anillo, tales como fenilo, naftilo o bifenilo. Otros grupos arilo tienen de 6 a 10 miembros de anillo, tales como fenilo o naftilo. Algunos otros grupos arilo tienen 6 miembros de anillo, tal como fenilo. Los grupos arilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Heteroarilo" se refiere a un conjunto de anillo monocíclico o condensado bicíclico o tricíclico que contiene de 5 a 16 átomos en el anillo, donde de 1 a 5 de los átomos en el anillo son un heteroátomo, tal como N, O o S. Los heteroátomos adicionales también pueden ser útiles, incluyendo, pero sin limitaciones, B, Al, Si y P. Los heteroátomos también pueden estar oxidados, tal como, pero sin limitaciones, -S(O)- y -S(O)₂-. Los grupos heteroarilo pueden incluir cualquier número de átomos en el anillo, tal como, de 3 a 6, de 4 a 6, de 5 a 6, de 3 a 8, de 4 a 8, de 5 a 8, de 6 a 8, de 3 a 9, de 3 a 10, de 3 a 11 o de 3 a 12 miembros de anillo. Cualquier número adecuado de heteroátomos puede estar incluido en los grupos heteroarilo, tales como 1, 2, 3, 4 o 5, o de 1 a 2, de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 3, de 2 a 4, de 2 a 5, de 3 a 4 o de 3 a 5. Los grupos heteroarilo pueden tener de 5 a 8 miembros de anillo y de 1 a 4 heteroátomos o de 5 a 8 miembros de anillo y de 1 a 3 heteroátomos o de 5 a 6 miembros de anillo y de 1 a 4 heteroátomos o de 5 a 6 miembros de anillo y de 1 a 3 heteroátomos. El grupo heteroarilo puede incluir grupos, tales como pirrol, piridina, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, pirazina, pirimidina, piridazina, triazina (isómeros 1,2,3, 1,2,4 y 1,3,5), tiofeno, furano, tiazol, isotiazol, oxazol e isoxazol. Los grupos heteroarilo también pueden estar condensados a sistemas de anillo aromático, tal como un anillo fenilo, para formar miembros que incluyen, pero sin limitaciones, benzopirroles, tales como indol e isoindol, benzopiridinas, tales como quinolina e isoquinolina, benzopirazina (quinoxalina), benzopirimidina (quinazolina), benzopiridazinas, tales como ftalazina y cinnolina, benzotiofeno y benzofurano. Otros grupos heteroarilo incluyen anillos heteroarilo unidos mediante un enlace, tales como bipiridina. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

Los grupos heteroarilo pueden estar unidos mediante cualquier posición en el anillo. Por ejemplo, pirrol incluye 1-, 2- y 3-pirrol, piridina incluye 2-, 3- y 4-piridina, imidazol incluye 1-, 2-, 4- y 5-imidazol, pirazol incluye 1-, 3-, 4- y 5-pirazol, triazol incluye 1-, 4- y 5-triazol, tetrazol incluye 1- y 5-tetrazol, pirimidina incluye 2-, 4-, 5- y 6-pirimidina, piridazina incluye 3- y 4-piridazina, 1,2,3-triazina incluye 4- y 5-triazina, 1,2,4-triazina incluye 3-, 5- y 6-triazina, 1,3,5-triazina incluye 2-triazina, tiofeno incluye 2- y 3-tiofeno, furano incluye 2- y 3-furano, tiazol incluye 2-, 4- y 5-tiazol, isotiazol incluye 3-, 4- y 5-isotiazol, oxazol incluye 2-, 4- y 5-oxazol, isoxazol incluye 3-, 4- y 5-isoxazol, indol incluye 1-, 2- y 3-indol, isoindol incluye 1- y 2-isoindol, quinolina incluye 2-, 3- y 4-quinolina, isoquinolina incluye 1-, 3- y 4-isoquinolina, quinoxalina incluye 2- y 4-quinoxalina, cinolina incluye 3- y 4-cinolina, benzotiofeno incluye 2- y 3-benzotiofeno y benzofurano incluye 2- y 3-benzofurano.

Algunos grupos heteroarilo incluyen aquellos que tienen de 5 a 10 miembros de anillo y de 1 a 3 átomos en el anillo, incluyendo N, O o S, tales como pirrol, piridina, imidazol, pirazol, triazol, pirazina, pirimidina, piridazina, triazina (isómeros 1,2,3, 1,2,4 y 1,3,5), tiofeno, furano, tiazol, isotiazol, oxazol, isoxazol, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinoxalina, ftalazina, cinolina, benzotiofeno y benzofurano. Otros grupos heteroarilo incluyen aquellos que tienen de 5 a 8 miembros de anillo y de 1 a 3 heteroátomos, tales como pirrol, piridina, imidazol, pirazol, triazol, pirazina, pirimidina, piridazina, triazina (isómeros 1,2,3, 1,2,4 y 1,3,5), tiofeno, furano, tiazol, isotiazol, oxazol e isoxazol. Algunos otros grupos heteroarilo incluyen aquellos que tienen de 9 a 12 miembros de anillo y de 1 a 3 heteroátomos, tales como indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinoxalina, ftalazina, cinolina, benzotiofeno, benzofurano y biperidina. Otros grupos heteroarilo más incluyen aquellos que tienen de 5 a 6 miembros de anillo y de 1 a 2 átomos en el anillo, incluyendo N, O o S, tales como pirrol, piridina, imidazol, pirazol, pirazina, pirimidina, piridazina, tiofeno, furano, tiazol, isotiazol, oxazol e isoxazol.

"(Cicloalquil)alquilo" se refiere a un radical que tiene un componente de alquilo y un componente de cicloalquilo, donde el componente de alquilo une el componente de cicloalquilo al punto de unión. El componente de alquilo es como se ha definido anteriormente, excepto porque el componente de alquilo es al menos divalente, un alquileo, para unirse al componente de cicloalquilo y al punto de unión. El componente de alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₁₋₆, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. El componente de cicloalquilo es como se define dentro. Los grupos (cicloalquil)alquilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, metilciclopentilo, metil-ciclobutilo, metil-ciclopentilo y metil-ciclohexilo.

"(Heterocicloalquil)alquilo" se refiere a un radical que tiene un componente de alquilo y un componente de heterocicloalquilo, donde el componente de alquilo une el componente de heterocicloalquilo al punto de unión. El componente de alquilo es como se ha definido anteriormente, excepto porque el componente de alquilo es al menos divalente, un alquileo, para unirse al componente de heterocicloalquilo y al punto de unión. El componente de alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₀₋₆, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. El componente de heterocicloalquilo es como se ha definido anteriormente. Los grupos (heterocicloalquil)alquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

"Arlalquilo" se refiere a un radical que tiene un componente de alquilo y un componente de arilo, donde el componente de alquilo une el componente de arilo al punto de unión. El componente de alquilo es como se ha definido anteriormente, excepto porque el componente de alquilo es al menos divalente, un alquileo, para unirse al componente de arilo y al punto de unión. El componente de alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₀₋₆, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. El componente de arilo es como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo y etilbencilo. Los grupos arilalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical que tiene un componente de alquilo y un componente de heteroarilo, donde el componente de alquilo une el componente de heteroarilo al punto de unión. El componente de alquilo es como se ha definido anteriormente, excepto porque el componente de alquilo es al menos divalente, un alquileo, para unirse al componente de heteroarilo y al punto de unión. El componente de alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como C₀₋₆, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. El componente de heteroarilo es como se define dentro. Los grupos heteroarilalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

"Carboxialquilo" se refiere a un grupo carboxi unido a un alquilo, como se ha descrito anteriormente, y que generalmente tiene la fórmula -alquilo C₁₋₃-C(O)OH. Cualquier cadena de alquilo adecuada es útil. Los grupos carboxialquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxí, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Acilo" se refiere a un alquilo que contiene un carbono sustituido con oxo en el punto de unión (-C(O)-alquilo C₁₋₃). Cualquier cadena de alquilo adecuada es útil. Los grupos acilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxí, amino, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano.

"Hidroxi-alquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, donde al menos uno de los átomos de hidrógeno se ha reemplazado con un grupo hidroxí. Como para el grupo alquilo, los grupos hidroxialquilo pueden tener cualquier número adecuado de átomos de carbono, tal como C₁₋₆. Los grupos hidroxialquilo a modo de ejemplo

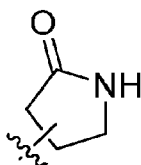
incluyen, pero no se limitan a, hidroximetilo, hidroxietilo (donde el hidroxilo está en la posición 1 o 2), hidroxipropilo (donde el hidroxilo está en la posición 1, 2 o 3), hidroxibutilo (donde el hidroxilo está en la posición 1, 2, 3 o 4), hidroxipentilo (donde el hidroxilo está en la posición 1, 2, 3, 4 o 5), hidroxihexilo (donde el hidroxilo está en la posición 1, 2, 3, 4, 5 o 6), 1,2-dihidroxietilo y similares. Los grupos hidroalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, tiol, amino, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano. Un experto en la materia apreciará que son útiles otros grupos hidroalquilo en la presente invención.

"Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo que tiene al menos un átomo de oxígeno puente. El átomo de oxígeno puente puede estar en cualquier lugar dentro de la cadena de alquilo (alquil-O-alquilo) o el átomo de oxígeno puente puede conectar el grupo alquilo al punto de unión (alquil-O-). En algunos casos, el alcoxi contiene 1, 2, 3, 4 o 5 átomos de oxígeno puente. En cuanto al grupo alquilo, los grupos alcoxi pueden tener cualquier número adecuado de átomos de carbono, tal como C₁₋₂, C₁₋₄ y C₁₋₆. Los grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, iso-propoxi, metiloxi-etiloxi-etilo (C₁-O-C₂-O-C₂-), etc. Un ejemplo de un grupo alcoxi es polietilenglicol (PEG), en donde la cadena de polietilenglicol puede incluir entre 2 y 20 monómeros de etilenglicol. Los grupos alcoxi pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, tiol, alquilamino, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano. Los grupos alcoxi pueden estar sustituidos o no sustituidos.

"Alquilamino" se refiere a un grupo alquilo como se define dentro, que tiene uno o más grupos amino. Los grupos amino pueden ser primarios, secundarios o terciarios. Los grupos alquilamino útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etilamina, propilamina, isopropilamina, etilendiamina y etanolamina. El grupo amino puede unir el alquilamino al punto de unión con el resto del compuesto, estar en cualquier posición del grupo alquilo, o unir entre sí al menos dos átomos de carbono del grupo alquilo. Los grupos alquilamino pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, tiol, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano. Un experto en la materia apreciará que son útiles otros alquilaminos en la presente invención.

"Alquiltio" se refiere a un grupo alquilo como se define dentro, que tiene uno o más grupos tiol. Los grupos alquiltio útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etiltiol, propiltiol e isopropiltiol. El grupo tiol puede unir el alquiltio al punto de unión con el resto del compuesto, estar en cualquier posición del grupo alquilo, o unir entre sí al menos dos átomos de carbono del grupo alquilo. Los grupos alquiltio pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados entre halo, hidroxilo, amino, alquilamino, alcoxi, haloalquilo, carboxi, amido, nitro, oxo, tioxo y ciano. Un experto en la materia apreciará que son útiles otros alquiltio en la presente invención.

La expresión "línea ondulada" significa el punto de unión del sustituyente al resto de la molécula. Cuando la línea ondulada no se representa como unida específicamente a un átomo de anillo específico, el punto de unión puede ser cualquier átomo adecuado del sustituyente. Por ejemplo, la línea ondulada en la siguiente estructura:



pretende incluir, como punto de unión, cualquiera de los átomos sustituibles.

La expresión "medicina regenerativa" se refiere a una rama de la medicina que se ocupa del proceso de sustitución, ingeniería o regeneración de células, tejidos u órganos humanos para restablecer o establecer una función normal. En algunas realizaciones, la medicina regenerativa incluye cultivar tejidos y órganos en el laboratorio e implantarlos con seguridad cuando el cuerpo no puede curarse a sí mismo.

La expresión "tejido modificado por bioingeniería" se refiere a una o más células, tejidos u órganos creados sintéticamente creados con fines de medicina regenerativa. En algunas realizaciones, el tejido modificado por bioingeniería se refiere a células, tejidos u órganos que fueron desarrollados en el laboratorio. En algunas realizaciones, los tejidos modificados por bioingeniería se refieren al corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, timo, córnea, células madre (por ejemplo, células madre pluripotentes humanas, células madre hematopoyéticas), linfocitos, granulocitos, células del sistema inmunológico, células óseas, organoides, células embrionarias, ovocitos, espermatoцитos, plaquetas de la sangre, células estromales, o una combinación de los mismos obtenidos en laboratorio.

La expresión "solución crioprotectora" se refiere a una solución usada para reducir o prevenir el daño por congelación causado por la formación de cristales de hielo. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora comprende uno o más polímeros peptoides descritos en el presente documento. En otras realizaciones, la solución crioprotectora comprende uno o más polímeros peptoides y uno o más híbridos peptido-peptido descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora protege una muestra biológica del daño por congelación. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora protege una muestra no biológica de la formación de cristales de hielo. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora preserva una muestra biológica durante una cantidad de

tiempo mayor que si la muestra biológica no estuviera expuesta a temperaturas reducidas.

Los términos "vitrificar" y "vitrificación" significan la transformación de una sustancia en un vidrio (es decir, un sólido amorfo no cristalino). En el contexto del agua, vitrificación se refiere a la transformación del agua en un vidrio sin la formación de cristales de hielo, a diferencia de la congelación ordinaria, lo que resulta en la formación de cristales de hielo. La vitrificación a menudo se logra mediante un enfriamiento muy rápido y/o la introducción de agentes que suprimen la formación de cristales de hielo. Por otro lado, "desvitrificar" y "desvitrificación" se refieren al proceso de cristalización en un vidrio previamente libre de cristales (amorfo). En el contexto del hielo de agua, desvitrificación puede significar la formación de cristales de hielo a medida que el sólido amorfo previamente no cristalino experimentan una fusión.

El término "peptóide" se refiere a una poliamida de entre aproximadamente 2 y 1.000 (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 1.000, 2 y 950, 2 y 900, 2 y 850, 2 y 800, 2 y 750, 2 y 700, 2 y 650, 2 y 600, 2 y 550, 2 y 500, 2 y 450, 2 y 400, 2 y 350, 2 y 300, 2 y 250, 2 y 200, 2 y 150, 2 y 100, 2 y 90, 2 y 80, 2 y 70, 2 y 60, 2 y 50, 2 y 40, 2 y 30, 2 y 20, 2 y 10, 2 y 8, 2 y 7, 2 y 6, 2 y 5, 2 y 4, o 2 y 3) unidades que tienen sustituyentes "R¹" en los átomos de nitrógeno de amida. Opcionalmente, un segundo sustituyente "R²", independientemente seleccionado, puede estar unido al átomo de carbono que es α - al grupo carbonilo (es decir, unido al átomo de carbono α). R² puede ser, pero no se limita a, H. En casos particulares, un peptóide es un análogo sintético de un péptido en donde las cadenas laterales que de otro modo estarían unidas a los átomos de carbono α están unidas a los átomos de nitrógeno de amida. Los peptoides son polímeros sintéticos con secuencias y longitudes controladas que pueden producirse mediante síntesis orgánica automatizada en fase sólida para incluir una amplia variedad de cadenas laterales que tienen diferentes funciones químicas. Los grupos R¹ unidos a los átomos de nitrógeno de amida en los peptoides pueden incluir, pero no se limitan a, grupos H, alquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, hidroxialquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, (cicloalquil C₃₋₁₀)alquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo, en donde cualquiera de los grupos cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo están opcional e independientemente sustituido con uno o más grupos "R³". Cada grupo R³ puede seleccionarse independientemente entre grupos halógeno, oxo, tioxo, -OH, -SH, amino, alquilo C₁₋₈, hidroxialquilo C₁₋₈, alquilamino C₁₋₈, o alquiltio C₁₋₈. Asimismo, Los grupos R¹ pueden comprender la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp) o tirosina (Tyr).

La expresión "híbrido peptóide-péptido" se refiere a un oligómero que está compuesto tanto de unidades monoméricas peptoides como de alfa aminoácidos (es decir, unidades peptídicas).

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácido, o un conjunto de múltiples polímeros de residuos de aminoácido.

El término "aminoácido" incluye, aunque sin limitación, α -aminoácidos de origen naturales y sus estereoisómeros. "Estereoisómeros" de aminoácidos se refiere a isómeros de imagen especular de los aminoácidos, tales como L-aminoácidos o D-aminoácidos. Por ejemplo, un estereoisómero de un aminoácido de origen natural se refiere al isómero de imagen especular del aminoácido de origen natural (es decir, el D-aminoácido).

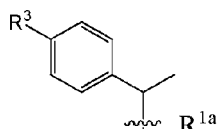
Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después (por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina). Los α -aminoácidos de origen natural incluyen, sin limitación, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), y combinaciones de los mismos. Los estereoisómeros de α -aminoácidos de origen natural incluyen, sin limitación, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), ácido D-aspártico (D-Asp), ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn), D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr) y combinaciones de los mismos.

Los aminoácidos pueden mencionarse en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Por ejemplo, un L-aminoácido puede representarse en el presente documento por su símbolo de tres letras comúnmente conocido (por ejemplo, Arg para L-arginina) o por un símbolo de aminoácido de una letra en mayúsculas (por ejemplo, R para L-arginina). Un D-aminoácido puede representarse en el presente documento por su símbolo de tres letras comúnmente conocido (por ejemplo, D-Arg para D-arginina) o por un símbolo de aminoácido de una letra en minúscula (por ejemplo, r para D-arginina).

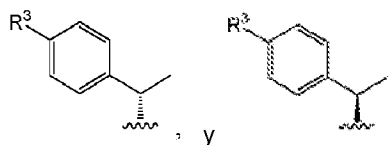
5 A. Polímeros peptoides

$$\text{X} \left[\begin{array}{c} \text{R}^1 \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{R}^2 \end{array} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \right]_n \text{Y} \quad (\text{I}).$$

En algunas realizaciones, uno o más monómeros R^1 tienen una estructura según R^{1a} :



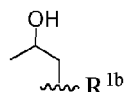
En algunas realizaciones, cada grupo R^{1a} se selecciona independientemente entre



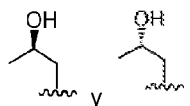
5 En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S de este monómero.

En algunas realizaciones, uno o más monómeros R^1 tienen una estructura según R^{1b} :

10



En algunas realizaciones, cada grupo R^{1b} se selecciona independientemente entre

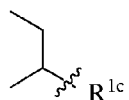


15

En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S de este monómero.

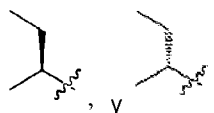
En algunas realizaciones, uno o más monómeros R^1 tienen una estructura según R^{1c} :

20



En algunas realizaciones, cada grupo R^{1c} se selecciona independientemente entre

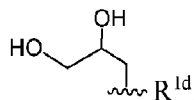
25



En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S de este monómero.

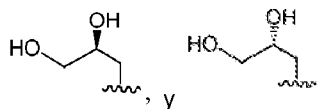
30

En algunas realizaciones, uno o más monómeros R^1 tienen una estructura según R^{1d} :



En algunas realizaciones, cada grupo R^{1d} se selecciona independientemente entre

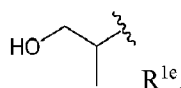
35



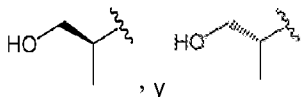
En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S de este monómero.

40

En algunas realizaciones, uno o más monómeros R^1 tienen una estructura según R^{1e} :



En algunas realizaciones, cada grupo R^1 se selecciona independientemente entre



5

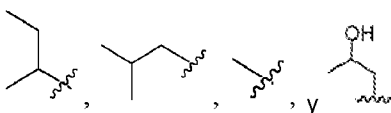
En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S de este monómero.

- 10 Siempre que cualquier monómero en el presente documento no indique estereoquímica, puede usarse cualquier estereoisómero. En algunas realizaciones, se elige una mezcla de los dos estereoisómeros. En realizaciones que comprenden una mezcla de estereoisómeros, la relación de estereoisómero R a S del monómero en el polímero peptoide puede variar de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 90:10, de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 85:15, de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 80:20, de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 75:25, de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 70:30, de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 65:35, de aproximadamente 65:35 a aproximadamente 60:40, de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 55:45, de aproximadamente 55:45 a aproximadamente 50:50, de aproximadamente 50:50 a aproximadamente 45:55, de aproximadamente 45:55 a aproximadamente 40:60, de aproximadamente 40:60 a aproximadamente 35:65, de aproximadamente 35:65 a aproximadamente 30:70, de aproximadamente 30:70 a aproximadamente 25:75, de aproximadamente 25:75 a aproximadamente 20:80, de aproximadamente 20:80 a aproximadamente 15:85, de aproximadamente 15:85 a aproximadamente 10:90 o de aproximadamente 10:90 a aproximadamente 5:95. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero R del monómero. En algunas realizaciones, solo se elige el estereoisómero S del monómero.

- 25 Siempre que se muestre una estereoquímica particular con una línea en cuña o discontinua, el monómero está sustancialmente libre de otros estereoisómeros. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 70 % de pureza. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 80 % de pureza. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 90 % de pureza. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 95 % de pureza. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 99 % de pureza. En algunas realizaciones, sustancialmente libre significa al menos un 99,9 % de pureza.

30

En algunas realizaciones, cada caso de R^1 en el polímero peptoide se selecciona entre el grupo que consiste en:



35

En algunas realizaciones, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más casos de R^1 en el polímero peptoide son grupos hidroxialquilo C_{1-18} independientemente seleccionados (por ejemplo, grupos hidroxialquilo C_{1-6} independientemente seleccionados). En algunas realizaciones, cada caso de R^1 en el polímero peptoide es un grupo hidroxialquilo C_{1-18} . En algunas realizaciones, cada caso de R^1 es un grupo hidroxialquilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, cada caso de R^1 es el mismo grupo hidroxialquilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, cada caso de R^1 es un grupo hidroxialquilo donde la longitud del alquilo en cada grupo hidroxialquilo se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo hidroxialquilo contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones hidroxil. En algunas realizaciones, cada caso de R^1 es:

40



45

En algunas realizaciones, cada caso de R^2 es H. En algunas realizaciones, al menos un R^2 es un halógeno.

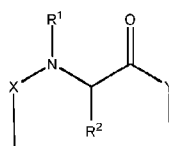
- 50 En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , es de entre 3 y 25. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , es de entre 5 y 25. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , es de entre 8 y 50. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , es de entre 8 y 25. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , es de entre 8 y 20. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n , puede estar entre de aproximadamente 10 a aproximadamente 28, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26, de aproximadamente 14 a aproximadamente 24, de aproximadamente 16 a aproximadamente 22 o de

55

aproximadamente 18 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptido, n , puede estar entre de aproximadamente 8 a aproximadamente 50, de aproximadamente 8 a aproximadamente 45, de aproximadamente 8 a aproximadamente 40, de aproximadamente 8 a aproximadamente 35, de aproximadamente 8 a aproximadamente 30, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptido, n , puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

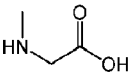
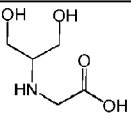
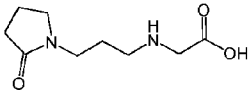
En algunas realizaciones, X e Y son H, alquilamino C_{1-8} opcionalmente sustituido, -OH, -SH, carboxi, hidroxialquilo C_{1-8} opcionalmente sustituido, alquilamino C_{1-8} opcionalmente sustituido, alquiltio C_{2-8} opcionalmente sustituido, carboxialquilo C_{1-8} opcionalmente sustituido, o halógeno.

En algunas realizaciones, X e Y del polímero peptido se toman en conjunto para formar un enlace covalente. La formación de un enlace covalente entre X e Y da como resultado una forma circularizada del polímero peptido en la que están unidos el grupo terminal NR^1 y el grupo terminal $C=O$, como se muestra a continuación.



En algunas realizaciones, el polímero peptido consiste en unidades monoméricas seleccionadas entre el grupo de monómeros expuesto en la Tabla 1. Un experto en la materia reconocerá que los límites de esta invención no se limitan a los monómeros enumerados en la Tabla 1, y que cualquier sustituyente N-sustituido útil puede usarse como monómero peptido N-sustituido. En algunas realizaciones, el sustituyente N-sustituido en el monómero peptido N-sustituido es cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp) o tirosina (Tyr).

Tabla 1	
ácido 2-(<i>sec</i>-butilamino)acético Nsb	ácido 2-((2-hidroxi)propil)amino)acético Nhp
ácido 2-(isobutilamino)acético Nib	ácido 2-((2-hidroxi)etil)amino)acético Nhe
ácido 2-(butilamino)acético Nbu	ácido 2-((2,3-dihidroxi)propil)amino)acético Ndp
ácido 2-(propilamino)acético Npr	ácido 2-((1-hidroxi)propan-2-il)amino)acético Nyp
ácido 2-(isopropilamino)acético Nip	ácido 2-((1-(4-hidroxi)fenil)etil)amino)acético Nep

 ácido 2-(metilamino)acético Nme	 ácido 2-((1,3-dihidroxiopropan-2-il)amino)acético Ndh
 ácido 2-((3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil)amino)acético Nop	

En algunas realizaciones, el polímero peptóide se selecciona entre el grupo de polímeros peptóides expuesto en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 o Tabla 9.

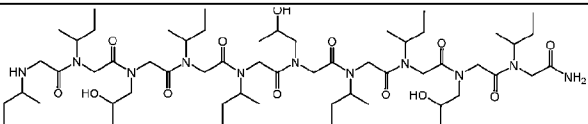
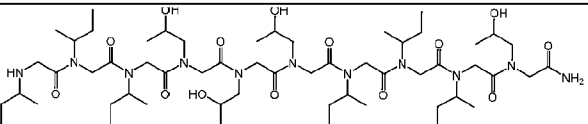
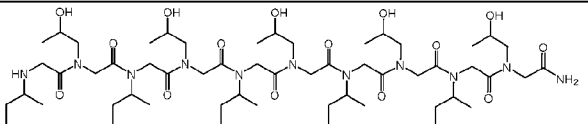
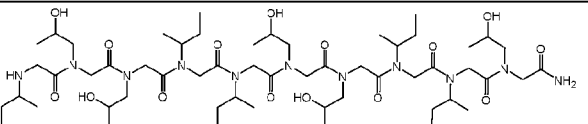
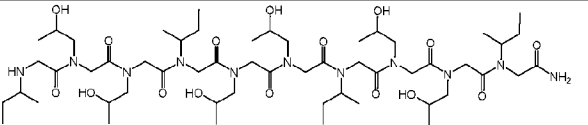
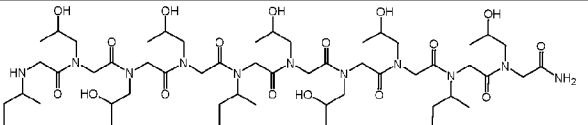
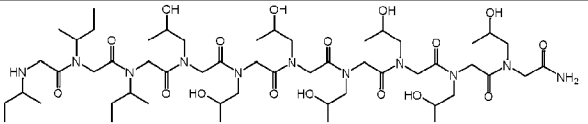
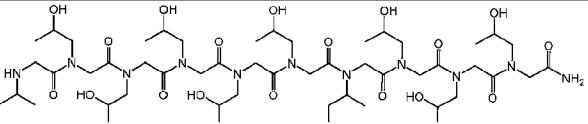
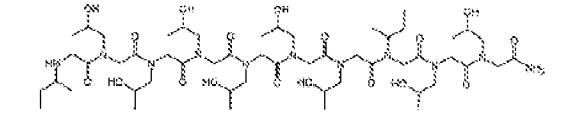
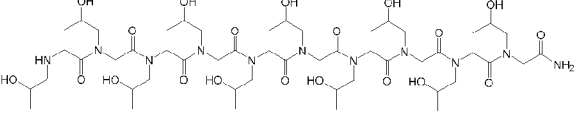
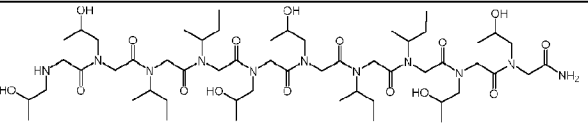
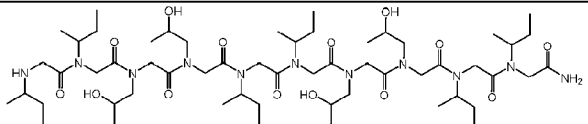
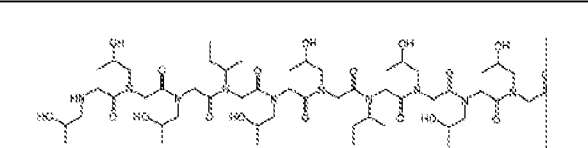
Tabla 2	
 Compuesto 1	 Compuesto 2
 Compuesto 3	 Compuesto 4
 Compuesto 5	 Compuesto 6
 Compuesto 7	 Compuesto 8
 Compuesto 9	 Compuesto 10
 Compuesto 11	 Compuesto 12
 Compuesto 13	

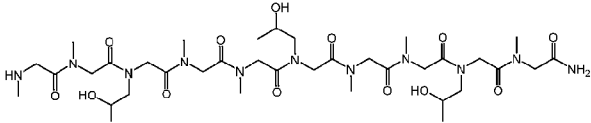
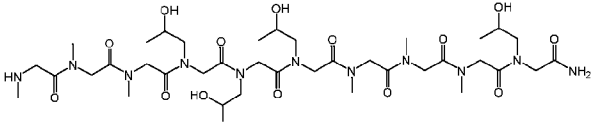
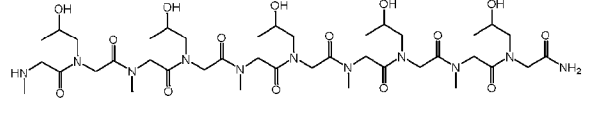
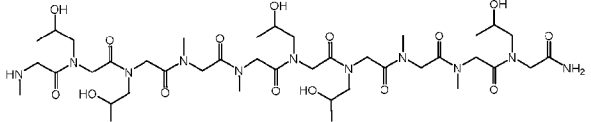
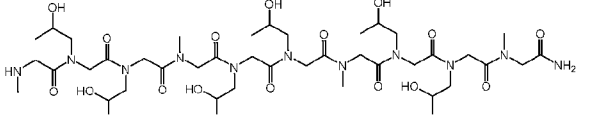
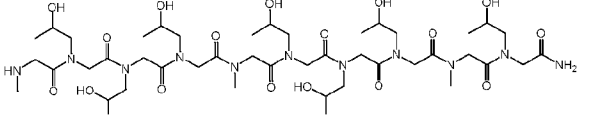
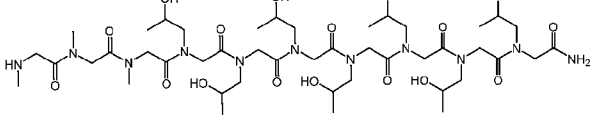
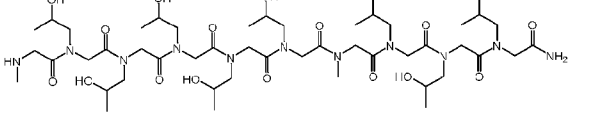
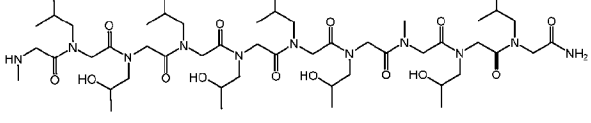
Tabla 3	
	
Compuesto 14	Compuesto 15
	
Compuesto 16	Compuesto 17
	
Compuesto 18	Compuesto 19
	
Compuesto 20	Compuesto 21
	
Compuesto 22	

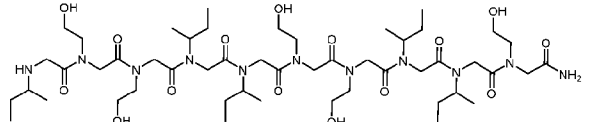
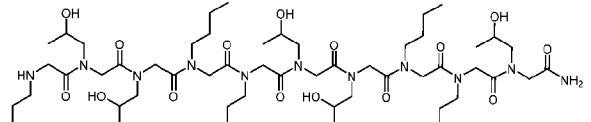
Tabla 4	
	
Compuesto 23	Compuesto 24

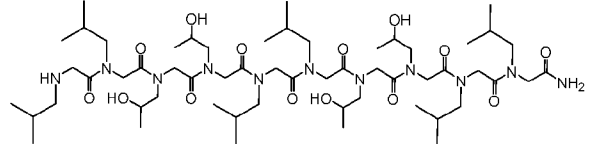
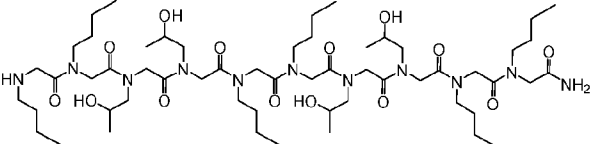
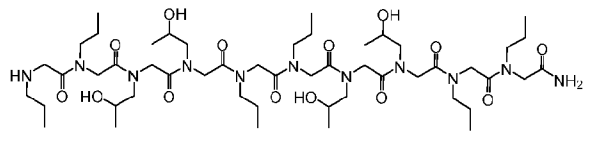
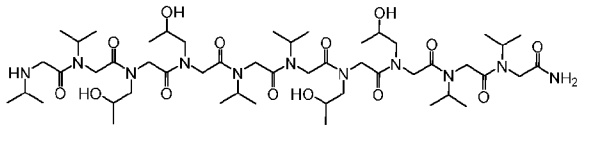
Tabla 5	
	
Compuesto 25	Compuesto 26
	
Compuesto 27	Compuesto 28

Tabla 6
Compuesto 29
Compuesto 30
Compuesto 31
Compuesto 32
Compuesto 33
Compuesto 34

Tabla 7
Compuesto 35
Compuesto 36
Compuesto 37

(continuación)

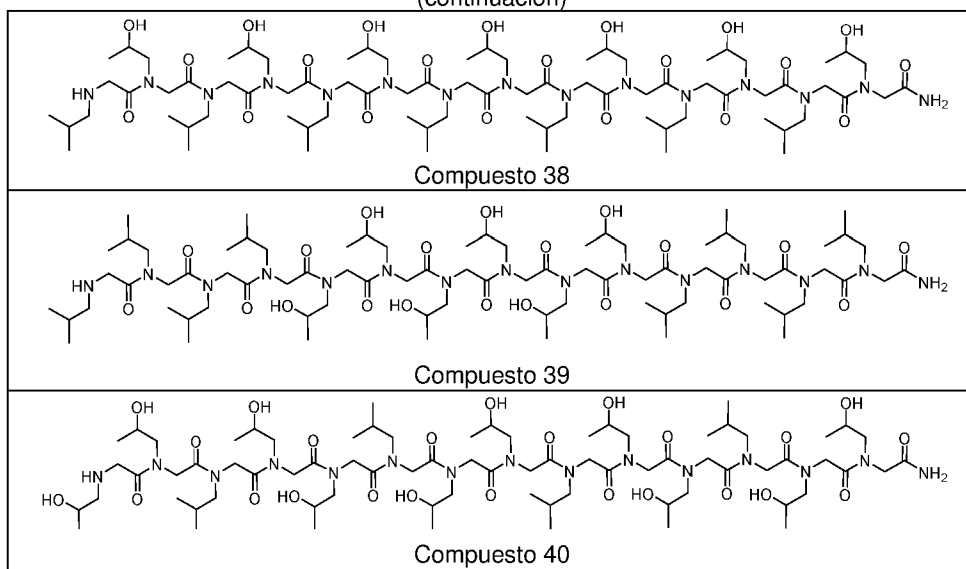
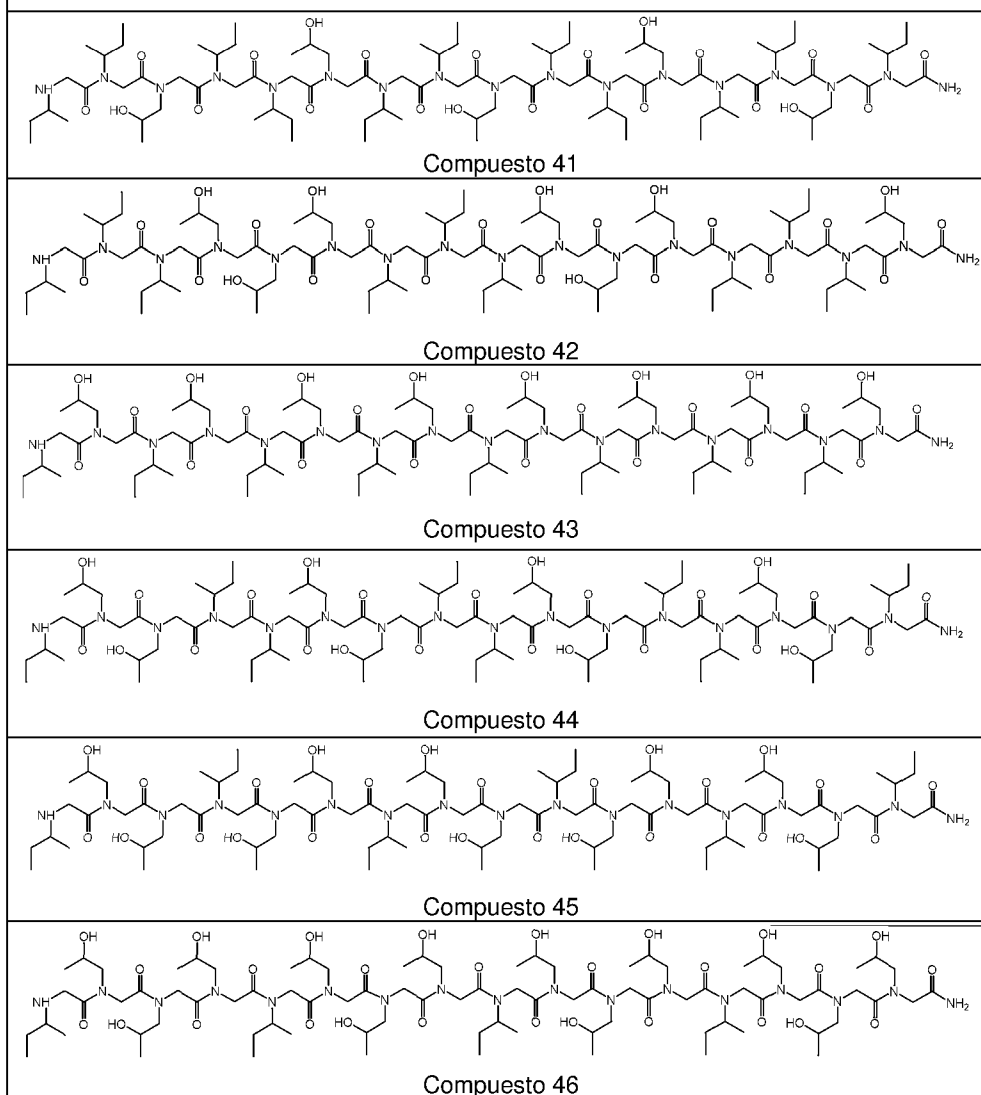


Tabla 8



(continuación)

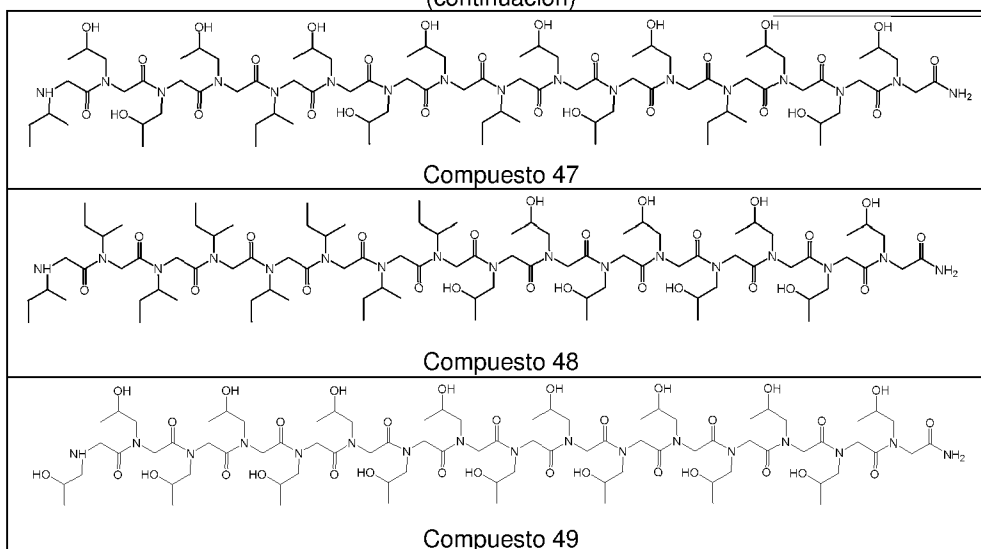
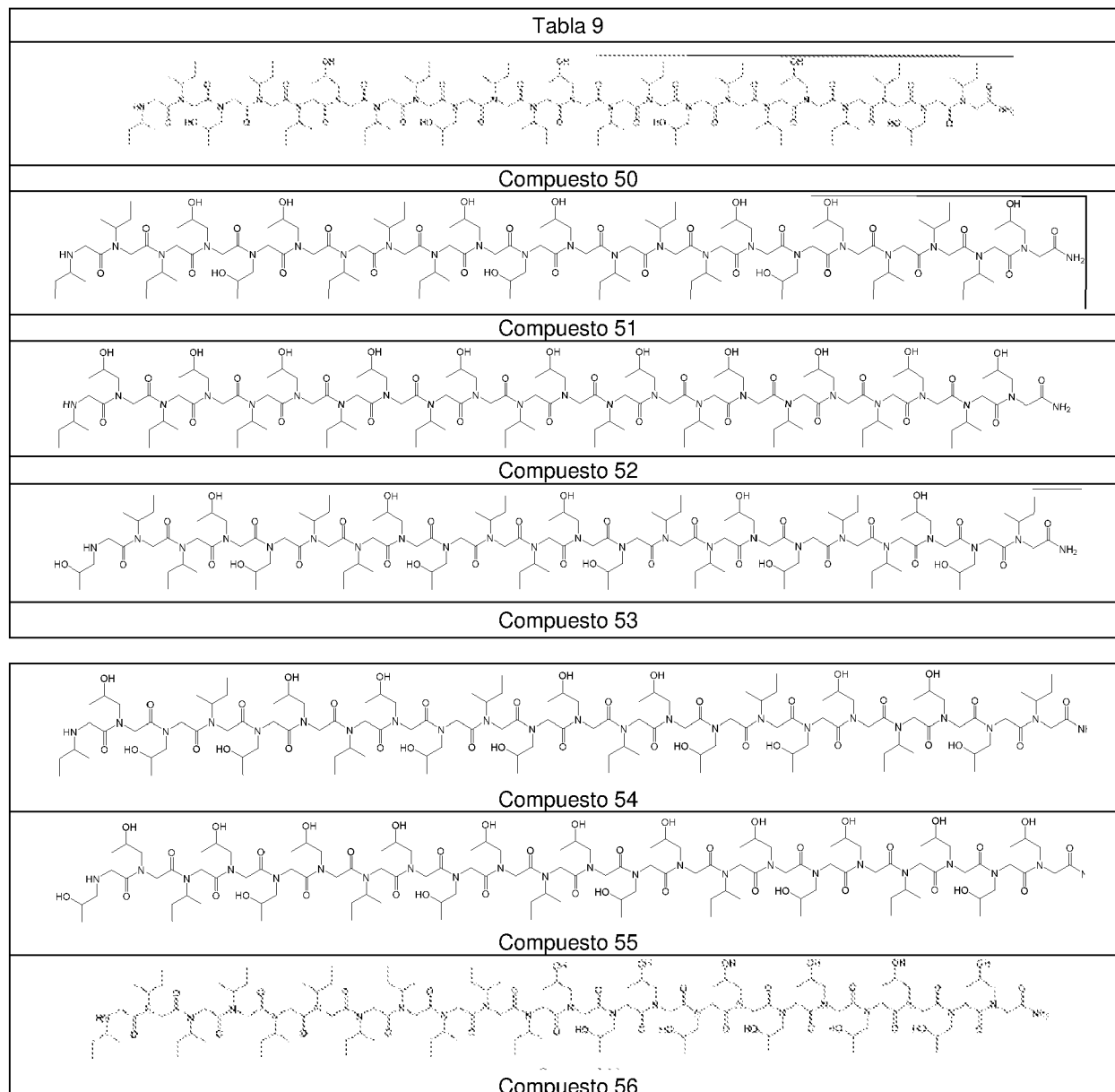
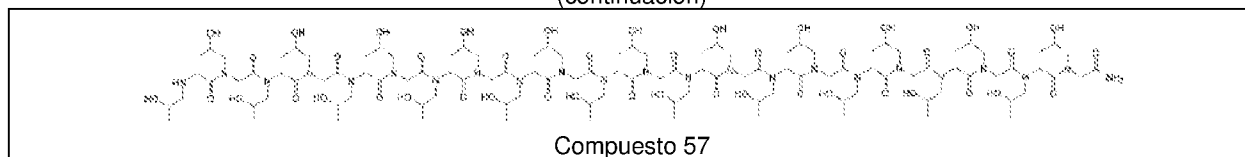


Tabla 9



(continuación)



- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Nsb, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Nsb, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nsb, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nsb, 9 monómeros Nhp y 1 monómero Nsb, o 10 monómeros Nhp.
- En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp (SEQ ID NO:2), en donde X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb (SEQ ID NO:1), en donde X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp (SEQ ID NO:7), en donde X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb (SEQ ID NO:8), en donde X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp (SEQ ID NO:9), en donde X es H o acilo C₁₋₈ e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈. En algunas realizaciones, Y es una amina secundaria o una amina terciaria.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Nme, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Nme, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Nme, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nme, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nme, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nme, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nme, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nme, y 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nme, o 9 monómeros Nhp y 1 monómero Nme.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 1 monómero Nhe y 9 monómeros Nsb, 2 monómeros Nhe y 8 monómeros Nsb, 3 monómeros Nhe y 7 monómeros Nsb, 4 monómeros Nhe y 6 monómeros Nsb, 5 monómeros Nhe y 5 monómeros Nsb, 6 monómeros Nhe y 4 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhe y 3 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhe y 2 monómeros Nsb, 9 monómeros Nhe y 1 monómeros Nsb, o 10 monómeros Nhe.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Nbu, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Nbu, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Nbu, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nbu, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nbu, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nbu, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nbu, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nbu, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nbu, o 9 monómeros Nhp y 1 monómero Nbu.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Nib, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Nib, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Nib, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nib, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nib, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nib, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nib, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nib, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nib, o 9 monómeros Nhp y 1 monómero Nib.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Npr, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Npr, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Npr, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Npr, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Npr, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Npr, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Npr, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Npr, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Npr, o 9 monómeros Nhp y 1 monómero Npr.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 10, y el polímero peptoide comprende: 10 monómeros Nip, 1 monómero Nhp y 9 monómeros Nip, 2 monómeros Nhp y 8 monómeros Nip, 3 monómeros Nhp y 7 monómeros Nip, 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nip, 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nip, 6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nip, 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nip, 8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nip, o 9 monómeros Nhp y 1 monómero Nip.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 14, y el polímero peptoide comprende: 6 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, o 14 monómeros Nhp.
- En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 14, y el polímero peptoide comprende: 6 monómeros Nhp y 8 monómeros Nib, 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nib, 8 monómeros Nhp y 6

monómeros Nib, 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nib, o 14 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 16, y el polímero peptoide comprende: 5 monómeros Nhp y 11 monómeros Nsb, 7 monómeros Nhp y 9 monómeros Nsb, 8 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb, 12 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb, o 16 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia del polímero peptoide, n, es de 22, y el polímero peptoide comprende: 7 monómeros Nhp y 15 monómeros Nsb, 10 monómeros Nhp y 12 monómeros Nsb, 11 monómeros Nhp y 11 monómeros Nsb, 14 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb, 17 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb, o 22 monómeros Nhp.

En algunas realizaciones, el polímero peptoide descrito en el presente documento forma una estructura helicoidal. En algunas realizaciones, la estructura helicoidal adopta una estructura análoga a una hélice de poliprolina. En determinados casos, el polímero peptoide forma una hélice de poliprolina I. En ciertos otros casos, el polímero peptoide forma una hélice de poliprolina II. En algunas realizaciones, se adopta una estructura helicoidal cuando el polímero peptoide comprende al menos una cadena lateral N-arilo. En algunas realizaciones, la cadena lateral N-arilo es un monómero Nep.

En algunas realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -40 °C. En ciertas realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a aproximadamente -20 °C. En ciertas otras realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -200 °C (por ejemplo, aproximadamente -196 °C).

En algunas realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -200 °C, de entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -190 °C, de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -180 °C, de entre aproximadamente -30 °C y aproximadamente -170 °C, de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -160 °C, de entre aproximadamente -50 °C y aproximadamente -150 °C, de entre aproximadamente -60 °C y aproximadamente -140 °C, de entre aproximadamente -70 °C y aproximadamente -130 °C, de entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -120 °C o de entre aproximadamente -90 °C a aproximadamente -100 °C a aproximadamente -110 °C.

En otras realizaciones, el polímero peptoide reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a o aproximadamente -10 °C, a o aproximadamente -15 °C, a o aproximadamente -25 °C, a o aproximadamente -30 °C, a o aproximadamente -35 °C, a o aproximadamente -40 °C, a o aproximadamente -45 °C, a o aproximadamente -50 °C, a o aproximadamente -55 °C, a o aproximadamente -60 °C, a o aproximadamente -65 °C, a o aproximadamente -70 °C, a o aproximadamente -75 °C, a o aproximadamente -80 °C, a o aproximadamente -85 °C, a o aproximadamente -90 °C, a o aproximadamente -95 °C, a o aproximadamente -100 °C, a o aproximadamente -105 °C, a o aproximadamente -110 °C, a o aproximadamente -115 °C, a o aproximadamente -120 °C, a o aproximadamente -125 °C, a o aproximadamente -130 °C, a o aproximadamente -135 °C, a o aproximadamente -140 °C, a o aproximadamente -145 °C, a o aproximadamente -150 °C, a o aproximadamente -155 °C, a o aproximadamente -160 °C, a o aproximadamente -165 °C, a o aproximadamente -170 °C, a o aproximadamente -175 °C, a o aproximadamente -180 °C, a o aproximadamente -185 °C, a o aproximadamente -190 °C, a o aproximadamente -195 °C, a o aproximadamente -196 °C o a o aproximadamente -200 °C.

En algunas realizaciones, la concentración del polímero peptoide (por ejemplo, presente en una composición, formulación o producto tal como una solución crioprotectora, solución anticongelante, producto alimenticio congelado o producto de cuidado cosmético) está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la concentración del polímero peptoide (por ejemplo, presente en una composición, formulación o producto tal como una solución crioprotectora, solución anticongelante, producto alimenticio congelado o producto de cuidado cosmético) está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 250 nM, entre aproximadamente 250 nM y aproximadamente 500 nM, entre aproximadamente 500 nM y aproximadamente 750 nM, entre aproximadamente 750 nM y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 5 µM, entre aproximadamente 5 µM y aproximadamente 25 µM, entre aproximadamente 25 µM y aproximadamente 50 µM, entre aproximadamente 50 µM y aproximadamente 100 µM, entre aproximadamente 100 µM y aproximadamente 250 µM, entre aproximadamente 250 µM y aproximadamente 500 µM, entre aproximadamente 500 µM y aproximadamente 750 µM, entre aproximadamente 750 µM y aproximadamente 1 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. En otras realizaciones, la concentración del polímero peptoide (por ejemplo, presente en una composición, formulación o producto tal como una solución crioprotectora, solución anticongelante, producto alimenticio congelado o producto de cuidado cosmético) es de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 1 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 10 mM o aproximadamente 100 mM. En

realizaciones particulares, la concentración del polímero peptoide es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM.

B. Híbridos peptoide-péptido

En otro aspecto, la invención proporciona un híbrido peptoide-péptido. En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende un polímero peptoide descrito en el presente documento y uno o más aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos de origen natural o variantes de los mismos. En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende entre aproximadamente 1 y 10 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos). En otras realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende entre aproximadamente 10 y 100 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos). En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende más de aproximadamente 100 aminoácidos. En otras realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende entre 2 y 50 monómeros peptoides (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 monómeros peptoides) y al menos entre aproximadamente 1 y 100 aminoácidos (por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos).

Los aminoácidos pueden ubicarse en cualquier posición dentro del polímero, incluso en los extremos N- y C-terminales y/o entre cualquiera de los monómeros peptoides. En los casos donde el híbrido peptoide-péptido comprende dos o más aminoácidos, los aminoácidos pueden ser todos contiguos, o solo una parte de ellos puede ser contigua. Como alternativa, todos los aminoácidos pueden estar separados por uno o más monómeros peptoides.

En algunas realizaciones, los aminoácidos son D-aminoácidos. En otras realizaciones, los aminoácidos son L-aminoácidos. En algunas realizaciones diferentes, el híbrido peptoide-péptido comprende una combinación de D- y L-aminoácidos. En algunas realizaciones, los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, arginina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina, y una combinación de los mismos. En algunos casos, los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en isoleucina, treonina, alanina y una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, uno o más monómeros peptoides Nsb en un polímero peptoide se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos de isoleucina para crear un híbrido peptoide-péptido. Los uno o más aminoácidos de isoleucina pueden ser D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, uno o más monómeros peptoides Nhp en un polímero peptoide se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos de treonina para crear un híbrido peptoide-péptido. Los uno o más aminoácidos de treonina pueden ser D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones diferentes, uno o más monómeros peptoides Nme en un polímero peptoide se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos de alanina para crear un híbrido peptoide-péptido. Los uno o más aminoácidos de alanina pueden ser D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende la secuencia:
Nep-Nep-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Nep-Nep-Nep-Nme-Nme (SEQ ID NO:3);
en donde los residuos de aminoácidos Xaa son aminoácidos independientemente seleccionados, tales como D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos. Como ejemplo no limitante, todos los casos de Xaa son residuos de aminoácido Arg, Ala, Val y/o Ser.

En otras realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende la secuencia:

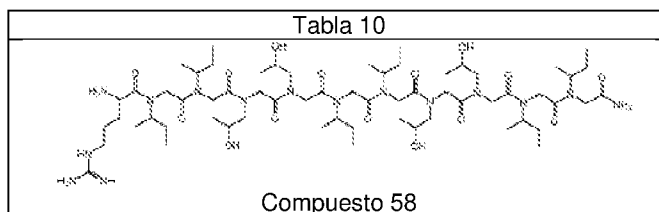
Nme-Nme-Xaa-Nme-Nme-Nme-Nme-Nhp-Nhp-Nsb-Xaa-Nme-Nme-Xaa-Nme-
Nme-Nme (SEQ ID NO:4);

en donde los residuos de aminoácidos Xaa son aminoácidos independientemente seleccionados, tales como D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos. Como ejemplo no limitante, todos los casos de Xaa son residuos de aminoácido Arg, Ala, Val y/o Ile.

Aún en otras realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende la secuencia:
Nme-Nme-Xaa-Nme-Nme-Nme-Nme-Nme-Nme-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:5);
en donde los residuos de aminoácidos Xaa son aminoácidos independientemente seleccionados, tales como D-aminoácidos, L-aminoácidos, o una combinación de los mismos. Como ejemplo no limitante, todos los casos de Xaa son residuos de aminoácido Arg, Ala, Val y/o Leu.

En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende la secuencia:
Arg-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb (SEQ ID NO:6);

en donde el residuo de aminoácido Arg es un D-aminoácido o un L-aminoácido. En algunas realizaciones, el híbrido peptoide-péptido comprende la estructura expuesta en la Tabla 10.



5 C. Métodos de síntesis

En el presente documento se describe un método para sintetizar un polímero peptoide o un híbrido peptoide-péptido. Los polímeros peptoides y los híbridos peptoide-péptido de la invención pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los métodos y procedimientos generales descritos en el presente documento. Se apreciará que cuando se dan las condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, reacciones molares de los reactivos, disolventes, presiones, etc.), también pueden usarse otras condiciones de proceso a menos que se indique otra cosa. Las condiciones óptimas de reacción pueden variar con los reactivos o disolventes particulares usados, pero dichas condiciones pueden ser determinadas por un experto en la materia mediante procedimientos de optimización rutinarios.

Los polímeros peptoides y los híbridos peptoide-péptido de la invención pueden prepararse a partir de reactivos y materiales de partida conocidos o disponibles comercialmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes y reactivos se compran en fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional.

En algunos aspectos, el enfoque de submonómero (FIG. 1) se usa para la síntesis de peptoides, donde cada monómero de glicina N-sustituido se ensambla a partir de dos "submonómeros" fácilmente disponibles. La síntesis de peptoides oligoméricos se basa en la química sólida de los métodos estándar en fase sólida, análogos a la síntesis de péptidos. Cada ciclo de adición de monómero consiste en dos etapas, una etapa de acilación y una etapa de desplazamiento nucleofílico. En algunos aspectos, el ensamblaje en fase sólida elimina la necesidad de monómeros N-protectados porque no hay funcionalidades de cadena lateral reactiva que deban protegerse. Un experto en la materia reconocerá que existen muchos métodos de síntesis en fase sólida, incluyendo sintetizadores automatizados robóticos. En algunos aspectos, el sintetizador usado es el Symphony® X Multiplex Peptide Synthesizer fabricado por Protein Technologies, Inc. En algunos aspectos, el sintetizador usado es el Overture Peptide Synthesizer fabricado por Protein Technologies, Inc. En otros aspectos, los peptoides se sintetizan manualmente usando métodos de química orgánica tradicionales conocidos en la técnica. Al proporcionar los aminoácidos apropiados en lugar de monómeros peptoides en los momentos apropiados durante la síntesis, las mismas técnicas o técnicas similares a las descritas anteriormente pueden aplicarse a la síntesis de oligómeros de peptoide-péptido.

Como ejemplo no limitante, los polímeros peptoides pueden sintetizarse en 100 mg de resina de amida Rink (NovaBiochem; 0,49 mmol/g). La resina de amida Rink (100 mg) puede lavarse dos veces en 1,5 ml de DCM, seguido de hinchamiento en 1,5 ml de DMF. La etapa de hinchamiento puede realizarse dos veces. El grupo protector Fmoc puede eliminarse de la resina añadiendo un 20 % de piperidina/DMF. La mezcla puede agitarse durante 10 minutos, drenarse y repetirse el tratamiento con piperidina, seguido de lavados extensivos con DMF (cinco veces con 1,5 ml). El primer monómero puede añadirse manualmente haciendo reaccionar 37 mg de ácido bromoacético (0,27 mmol; Sigma-Aldrich) y 189 µl de DIEA (1,08 mmol; Chem Impex International) en 2 ml de DCM en una plataforma agitadora durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados extensivos con DCM (cinco veces con 2 ml) y DMF (cinco veces con 2 ml). La resina bromoacilada puede incubarse con 2 ml de submonómero de amina 1 M en DMF en una plataforma agitadora durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados extensivos con DMF (cinco veces con 2 ml). Después de la carga manual inicial de ácido bromoacético, la primera etapa de desplazamiento del submonómero y todas las etapas posteriores de bromoacetilación y desplazamiento de la amina pueden realizarse mediante un sintetizador robotizado hasta obtener la longitud de oligómero deseada. La etapa de bromoacetilación automatizada se puede realizar añadiendo 1660 µl de ácido bromoacético 1,2 M en DMF y 400 µl de DIC (Chem Impex International). La mezcla puede agitarse durante 20 min, drenarse y lavarse con DMF (tres veces con 2 ml). Seguidamente, pueden añadirse 2 ml de una solución 1 M de submonómero (2 mmol) en DMF para introducir la cadena lateral mediante desplazamiento nucleofílico del bromuro. La mezcla puede agitarse durante 20 min, drenarse, lavarse con DMF (tres veces con 2 ml) y lavarse con DCM (tres veces con 2 ml). La resina peptoide puede escindir en 2 ml de HFIP al 20 % (Alfa Aesar) en DCM (v/v) a temperatura ambiente. La escisión se puede llevar a cabo en un tubo de vidrio con agitación constante durante 30 minutos. HFIP/DCM puede evaporarse bajo una corriente de gas nitrógeno. El producto final puede disolverse en 5 ml de ACN al 50 % en HPLC grado H₂O y se filtró con un filtro con punta de jeringa fritado de acero inoxidable de 0,5 µm (Upchurch Scientific). Los oligómeros peptoides pueden analizarse en una columna de HPLC analítica en fase inversa C₁₈ a temperatura ambiente (Peeke Scientific, 5 µm, 120 Å, 2,0 x 50 mm) usando un instrumento Beckman Coulter System Gold. Se puede utilizar un gradiente lineal de 5-95 % de acetonitrilo/agua (0,1 % de TFA, Acros Organics) durante 20 minutos con un caudal de 0,7 ml/min. Con el

fin de eliminar cualquier traza de HFIP en la solución de muestra, los precursores lineales disueltos en 50 % de ACN/H₂O pueden liofilizarse durante la noche.

Los polímeros peptoides y los híbridos peptoide-péptido pueden analizarse mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI). En general, se preparan 0,5-2 ml de 1-5 μ M de polímero peptoide o híbrido peptoide-péptido a analizar en un 50 % de H₂O desionizado/50 % de HPLC grado ACN con 1 % de un ácido orgánico tal como el ácido trifluoroacético. Las muestras preparadas se ionizan mediante bombardeo con electrones, lo que hace que las moléculas se rompan en fragmentos cargados. Luego, los iones se separan según su relación masa a carga acelerando los fragmentos y exponiéndolos a un campo eléctrico o magnético. Los iones son detectados por un mecanismo capaz de detectar partículas cargadas, como un multiplicador de electrones. Los peptoides y los híbridos peptoide-péptido se identifican correlacionando masas con las masas identificadas o mediante un patrón de fragmentación característico.

D. Métodos de uso

En algunos aspectos, la presente invención proporciona una solución crioprotectora. En algunas realizaciones, la solución crioprotectora comprende un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la solución crioprotectora comprende además un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en una especie iónica, un crioprotector penetrante, un crioprotector no penetrante, un antioxidante, un compuesto estabilizador de membrana celular, una acuaporina u otro compuesto formador de canales, un alcohol, un azúcar, un derivado de azúcar, un tensioactivo no iónico, una proteína, dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), Ficoll®, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, hialuronano, formamida, un hidrogel natural o sintético, y una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, el crioprotector penetrante penetra la membrana celular y reduce la concentración de agua intracelular, reduciendo con ello la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura. En otras realizaciones particulares, el crioprotector no penetrante induce cambios en la presión osmótica coloidal y modifica las asociaciones de la membrana celular con el agua extracelular mediante interacción iónica inducida.

En algunos casos, la solución crioprotectora comprende además un alcohol que se selecciona del grupo que consiste en propilenglicol, etilenglicol, glicerol, metanol, butilenglicol, adonitol, etanol, trimetilenglicol, dietilenglicol, óxido de polietileno, eritritol, sorbitol, xilitol, polipropilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), manitol, inositol, ditioritol, 1,2-propanodiol y una combinación de los mismos.

En otros casos, la solución crioprotectora comprende además un azúcar que se selecciona entre el grupo que consiste en un monosacárido, un disacárido, un polisacárido y una combinación de los mismos. En casos particulares, el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en glucosa, 3-O-metil-D-glucopiranososa, galactosa, arabinosa, fructosa, xilosa, manosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, rafinosa, dextrano y una combinación de los mismos.

En otros casos, la solución crioprotectora comprende además PEG o una pluralidad de compuestos de PEG diferentes. En algunos otros casos, al menos uno de los compuestos de PEG tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 1.000 g/mol (por ejemplo, inferior a aproximadamente 1.000 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 g/mol). En casos particulares, al menos uno de los compuestos de PEG tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 200 y 400 g/mol (por ejemplo, aproximadamente 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 o 400 g/mol). En algunos casos, la solución crioprotectora comprende PEG o una pluralidad de compuestos de PEG seleccionados entre el grupo que consiste en PEG 200, PEG 300, PEG 400 y una combinación de los mismos.

En otros casos, la solución crioprotectora comprende además una proteína que se selecciona entre el grupo que consiste en albúmina de huevo, seroalbúmina bovina, seroalbúmina humana, gelatina y una combinación de las mismas. En aún otros casos, la solución crioprotectora comprende además un hidrogel natural o sintético, en donde el hidrogel natural o sintético comprende quitosano, ácido hialurónico o una combinación de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de diversas propiedades de la solución crioprotectora tales como concentración eficaz, viscosidad, solubilidad en agua y/o permeabilidad de la membrana pueden evaluarse usando una célula o tejido modelo que incluye, pero sin limitaciones, células madre, tejido hepático o hepatocitos, riñón, intestino, corazón, páncreas, médula ósea, organoides y otros tejidos biológicos para criopreservación.

En algunas realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -20 °C. En otras realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -40 °C. En ciertas realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a aproximadamente -20 °C. En ciertas otras realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -200 °C (por ejemplo, aproximadamente -196 °C).

En algunas realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una

temperatura de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -200 °C, de entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -190 °C, de entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -180 °C, de entre aproximadamente -30 °C y aproximadamente -170 °C, de entre aproximadamente -40 °C y aproximadamente -160 °C, de entre aproximadamente -50 °C y aproximadamente -150 °C, de entre aproximadamente -60 °C y aproximadamente -140 °C, de entre aproximadamente -70 °C y aproximadamente -130 °C, de entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -120 °C o de entre aproximadamente -90 °C a aproximadamente -100 °C a aproximadamente -110 °C.

En otras realizaciones, la solución crioprotectora reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a o aproximadamente -10 °C, a o aproximadamente -15 °C, a o aproximadamente -25 °C, a o aproximadamente -30 °C, a o aproximadamente -35 °C, a o aproximadamente -40 °C, a o aproximadamente -45 °C, a o aproximadamente -50 °C, a o aproximadamente -55 °C, a o aproximadamente -60 °C, a o aproximadamente -65 °C, a o aproximadamente -70 °C, a o aproximadamente -75 °C, a o aproximadamente -80 °C, a o aproximadamente -85 °C, a o aproximadamente -90 °C, a o aproximadamente -95 °C, a o aproximadamente -100 °C, a o aproximadamente -105 °C, a o aproximadamente -110 °C, a o aproximadamente -115 °C, a o aproximadamente -120 °C, a o aproximadamente -125 °C, a o aproximadamente -130 °C, a o aproximadamente -135 °C, a o aproximadamente -140 °C, a o aproximadamente -145 °C, a o aproximadamente -150 °C, a o aproximadamente -155 °C, a o aproximadamente -160 °C, a o aproximadamente -165 °C, a o aproximadamente -170 °C, a o aproximadamente -175 °C, a o aproximadamente -180 °C, a o aproximadamente -185 °C, a o aproximadamente -190 °C, a o aproximadamente -195 °C, a o aproximadamente -196 °C o a o aproximadamente -200 °C.

En algunas realizaciones, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 250 nM, entre aproximadamente 250 nM y aproximadamente 500 nM, entre aproximadamente 500 nM y aproximadamente 750 nM, entre aproximadamente 750 nM y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 5 µM, entre aproximadamente 5 µM y aproximadamente 25 µM, entre aproximadamente 25 µM y aproximadamente 50 µM, entre aproximadamente 50 µM y aproximadamente 100 µM, entre aproximadamente 100 µM y aproximadamente 250 µM, entre aproximadamente 250 µM y aproximadamente 500 µM, entre aproximadamente 500 µM y aproximadamente 750 µM, entre aproximadamente 750 µM y aproximadamente 1 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora es de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 1 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 10 mM o aproximadamente 100 mM. En realizaciones particulares, la concentración del polímero peptoide y/o del híbrido peptoide-péptido en la solución crioprotectora es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM.

En otros aspectos, en el presente documento se proporciona un método para preservar una muestra biológica. En realizaciones particulares, la muestra biológica posee una composición celular. En algunas realizaciones, la muestra biológica es un tejido. En otras realizaciones, la muestra biológica es un órgano. En otras realizaciones más, la muestra biológica es una célula. En realizaciones particulares, la muestra biológica comprende uno o más tejidos, órganos, células o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, una solución crioprotectora descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos. En algunos casos, cuando se usa una combinación de composiciones o soluciones, el contacto de la muestra biológica con las composiciones o soluciones puede lograrse en múltiples etapas. Como ejemplo no limitante, una muestra biológica puede ponerse en contacto primero con un polímero peptoide descrito en el presente documento, y luego, en un momento posterior, la muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución crioprotectora descrita en el presente documento.

En casos particulares, el tejido es un tejido modificado mediante bioingeniería. En algunos casos, la muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, timo, córnea, células nerviosas, plaquetas de la sangre, espermatoцитos, ovocitos, células embrionarias no humanas, células madre, células óseas y una combinación de los mismos.

La crioprotección de muestras biológicas es útil para cualquier número de fines. Los ejemplos no limitantes incluyen la preservación de organoides, preservación de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias no humana (ES), células madre pluripotentes (PSC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC)), preservación de células adultas y líneas celulares (por ejemplo, linfocitos, granulocitos, células del sistema inmunológico, células óseas), preservación de embriones no humanos, espermatozoides y ovocitos, preservación de tejidos y preservación de órganos. La preservación de tejidos, órganos y otras muestras y estructuras biológicas es especialmente útil, por ejemplo, en el campo del trasplante de órganos. Un experto en la materia conocerá fácilmente otras aplicaciones útiles de la presente invención para la crioprotección de muestras biológicas.

En otros aspectos más, en el presente documento se proporciona un método para preservar una o más

macromoléculas biológicas. Dichas macromoléculas biológicas pueden ser de origen natural o no natural. Los ejemplos no limitantes de macromoléculas biológicas que son adecuados para la crioprotección mediante composiciones y métodos de la presente invención incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN), aminoácidos, proteínas, péptidos, lípidos y estructuras compuestas (por ejemplo, liposomas). En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la macromolécula biológica con un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, una solución crioprotectora descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la macromolécula biológica es una proteína aislada. En casos particulares, la proteína aislada es una proteína proteasa. En algunos casos, cuando se usa una combinación de composiciones o soluciones, el contacto de las una o más macromoléculas biológicas con las composiciones o soluciones puede lograrse en múltiples etapas. Como ejemplo no limitante, las una o más macromoléculas biológicas pueden poner en contacto primero con un polímero peptoide descrito en el presente documento, y luego, en un momento posterior, la muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución crioprotectora descrita en el presente documento.

La crioprotección de macromoléculas biológicas usando composiciones y métodos de la presente invención es útil para diversos fines. Los ejemplos no limitantes de tales propósitos incluyen la preservación de muestras de ADN (por ejemplo, ADN genómico) y ARN, la preservación de factores de crecimiento de células madre y la preservación de anticuerpos. Otros propósitos útiles y aplicaciones apropiadas para las composiciones y métodos de la presente invención serán fácilmente conocidos por un experto en la materia.

En realizaciones particulares, la proteína aislada ha sido cristalizada. La crioprotección de cristales se ha convertido en una herramienta esencial en el repertorio de métodos cristalográficos para estudiar macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas y péptidos). En muchos casos, la crioprotección y la posterior recopilación de datos a temperatura criogénica son esenciales para obtener un conjunto de datos completo al superar el problema del daño por radiación de la línea de haz de rayos x. Por otro lado, los criométodos permiten a los cristalógrafos trabajar con cristales pequeños, y dichos métodos se han convertido en un método ideal para realizar el almacenamiento a largo plazo de los cristales sin perder la calidad de la difracción. Los crioprotectores proporcionan un medio para proteger los cristales macromoleculares de los efectos dañinos de la formación de hielo durante el proceso de crioenfriamiento. La crioprotección por lo general implica sumergir el cristal en una solución que forma un vidrio amorfo (es decir, vitrificación) mientras se enfría de manera instantánea en nitrógeno líquido. Los crioprotectores ideales para cristalografía deben ser hipereficaces (es decir, los crioprotectores consiguen un resultado eficaz a baja concentración). Los crioprotectores disponibles actualmente no son hipereficaces. Por consiguiente, si la concentración de crioprotector es demasiado baja, durante el experimento, se formará hielo cristalino, lo que provocará una interferencia de fondo. Si la concentración de crioprotector es demasiado alta, la fusión inmediata de la estructura cristalina puede deberse a la energía del haz, lo que da como resultado datos de baja calidad que afectan al análisis de estructura posterior. Por ejemplo, las soluciones crioprotectoras de última generación usadas en aplicaciones de cristalografía de rayos x requieren el uso de etilenglicol al 20 % para evitar la formación de cristales de hielo a temperaturas de almacenamiento de proteínas cristalizadas. Durante la recopilación de datos de rayos x, el etilenglicol calienta y disuelve los cristales impidiendo una mayor recopilación de datos. Para más información, véase, p. ej., Garman *et al.* J. Appl. Cryst. 30:211 (1997).

En algunas realizaciones, el polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido, o solución crioprotectora descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos, disminuye la disolución del cristal durante la recopilación de datos de rayos x. En algunas realizaciones, el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora descritos en el presente documento, o una combinación de los mismos, reduce la dispersión de fondo.

Las muestras biológicas y macromoléculas que son adecuadas para la crioprotección según las composiciones y métodos de la presente invención pueden proceder de cualquier reino biológico (por ejemplo, Animalia (incluyendo, aunque sin limitación, humanos y animales de ganado), Plantae, Fungi (incluyendo, aunque sin limitación, hongos), Protista, Archaea/Archaeabacteria y Bacteria/Eubacteria).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de cuidado cosmético. En algunas realizaciones, el producto de cuidado cosmético comprende un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, una solución de crioprotección descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto de cuidado cosmético es un producto para el cuidado de la piel. En algunas realizaciones, el producto para el cuidado de la piel se aplica tópicamente. Las formulaciones típicas de productos tópicos incluyen cremas, sueros, pomadas, pulverizadores, lociones y parches.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto anticongelante tal como un producto antihielo o de inhibición de hielo. En algunas realizaciones, el producto anticongelante comprende un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, una solución de crioprotección descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto anticongelante se usa para prevenir, inhibir o retrasar la formación de hielo en objetos que incluyen, pero sin limitaciones, equipo mecánico y eléctrico en general. En algunas realizaciones, el producto anticongelante previene, inhibe o retrasa la formación de hielo en aeronaves o partes de las mismas, drones, automóviles o partes de los

5 mismos, incluyendo motores de automóvil, sistemas de engranaje, sistemas de frenado, ventanas, sistemas de rociadores, gasoductos, o cables eléctricos, incluyendo líneas de energía eléctrica. En otros casos, el producto anticongelante actúa como inhibidor de hidrato cinético. En algunas realizaciones, el producto anticongelante comprende además etilenglicol, metanol, propilenglicol, glicerol, o combinaciones de los mismos.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto alimenticio congelado. En algunas realizaciones, el producto alimenticio congelado comprende un polímero peptoide descrito en el presente documento, un híbrido peptoide-péptido descrito en el presente documento, una solución de crioprotección descrita en el presente documento, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio congelado se selecciona entre el grupo que consiste en helado, yogur, marisco, fruta y productos cárnicos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio congelado comprende además propilenglicol.

E. Protocolos de criopreservación

15 Las composiciones y métodos descritos en el presente documento son adecuados para su uso en cualquier número de protocolos de criopreservación. Como ejemplo no limitante, las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para la criopreservación durante el sobreenfriamiento a temperaturas bajo cero elevadas (por ejemplo, de 0 °C a -20 °C). En el campo del trasplante de órganos, los órganos normalmente se enfrían en hielo (por ejemplo, a 0-4 °C), lo que limita la ventana del trasplante a aproximadamente diez horas. Mediante el uso de la perfusión mecánica *ex-vivo* con crioprotectores que contienen CPA de molécula pequeña estándar, ha sido posible conservar órganos hasta 96 horas a una temperatura de -6 °C. Si bien es deseable reducir aún más la temperatura de criopreservación por debajo de -6 °C, lo que prolongaría el posible tiempo de criopreservación, no ha sido posible hacerlo debido a que las altas concentraciones de CPA estándar necesarias para reducir aún más la temperatura provocan daños orgánicos irreversibles debido a la toxicidad relacionada con CPA. Para obtener información adicional, véase, p. ej., Uygun K, et. al. Nat. Protoc. 10(3):484-94 (2015). Emplear métodos de perfusión *ex-vivo* o contacto de otro modo con muestras biológicas (por ejemplo, órganos y tejidos) o macromoléculas con polímeros peptoides, híbridos peptoide-péptido y/o soluciones crioprotectoras descritos en el presente documento son útiles para sobreenfriamiento a temperaturas bajo cero elevadas, permitiendo la criopreservación durante períodos de tiempo más largos y a temperaturas más bajas que las actualmente factibles. Otras aplicaciones adecuadas de la presente invención para un sobreenfriamiento a temperaturas bajo cero elevadas serán fácilmente conocidas por un experto en la materia.

35 Como otro ejemplo no limitante, las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para la criopreservación durante los protocolos de congelación (por ejemplo, de -20 °C a -196 °C). Los protocolos de congelación normalmente se realizan a una velocidad controlada (a veces denominada congelación lenta) durante al menos parte de la reducción de temperatura. Por ejemplo, una muestra biológica o macromolécula puede ponerse en contacto con un polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido y/o solución crioprotectora descritos en el presente documento, y la temperatura puede reducirse a una velocidad controlada (por ejemplo, disminuirse a una velocidad de 1 °C por minuto) hasta alcanzar la temperatura deseada. Como alternativa, la temperatura puede reducirse a una velocidad controlada hasta alcanzar la temperatura deseada (por ejemplo, entre -80 °C y -180 °C), y luego la muestra o macromolécula puede congelarse de manera instantánea (por ejemplo, sumergiendo la muestra o macromolécula en nitrógeno líquido o colocar la muestra o macromolécula encima del nitrógeno líquido). El polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido o solución crioprotectora puede ponerse en contacto con la muestra o macromolécula que se criopreserva en cualquier momento durante el protocolo, siempre que sea antes de la formación de cristales de hielo que dañan la muestra o macromolécula que se preserva.

50 Como otro ejemplo no limitante adicional, las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para protocolos de congelación criogénica (por ejemplo, -90 °C a -196 °C). Por ejemplo, una muestra biológica o macromolécula puede ponerse en contacto con un polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido, o solución crioprotectora descrito en el presente documento, luego sumergirse en nitrógeno líquido o en una corriente de vapor de nitrógeno líquido con el fin de congelar rápidamente la muestra sin la formación de cristales de hielo. No existe una estructura reticular de hielo y, por lo tanto, el agua dentro de la muestra o macromolécula está en un estado amorfo o similar al vidrio. Por consiguiente, no se forma hielo dañino.

55 Un experto en la materia apreciará fácilmente que las concentraciones y composiciones de los polímeros peptoides, híbridos peptoide-péptido y soluciones crioprotectoras descritos en el presente documento se puedan modificar dependiendo de la muestra biológica y/o macromolécula particular que se criopreserva y el protocolo de criopreservación particular que se emplea.

60 F. Métodos de detección

En el presente documento se describen métodos para identificar selectivamente polímeros peptoides, híbridos peptoide-péptido y/o soluciones crioprotectoras para la actividad.

65 En un aspecto, el polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido, y/o solución crioprotectora para reducir el punto de congelación del agua usando un microscopio de luz polarizada para detectar la formación de cristales de hielo. La

microscopía de luz polarizada es una técnica de microscopía óptica que usa luz polarizada como fuente de luz. El contraste de la imagen surge de la interacción de la luz polarizada en un plano con una especie birrefringente (o doblemente refractiva) para producir dos componentes de onda individuales, cada uno de los cuales está polarizado en planos mutuamente perpendiculares. Las velocidades de estos componentes, que se denominan frentes de onda ordinarios y extraordinarios, son diferentes y varían con la dirección de propagación a través del espécimen. Después de salir del espécimen, los componentes de la luz se desfazan, pero se recombinan con interferencias constructivas y destructivas cuando pasan por el analizador. Esta interferencia crea un contraste detectable en la muestra. La formación de cristales de hielo se detecta fácilmente mediante esta técnica porque los cristales de hielo son especies birrefringentes. En un experimento estándar, las muestras que comprenden el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido y/o la solución crioprotectora se enfrían a una temperatura deseada durante un período de tiempo deseado. Una o más muestras, a la temperatura deseada, se colocan bajo el microscopio de luz polarizada y se inspeccionan visualmente para determinar la formación de cristales de hielo.

En un aspecto, el polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido y/o solución crioprotectora se identifican de manera selectiva para reducir el punto de congelación de una solución acuosa usando calorimetría diferencial de barrido para cuantificar la actividad de histéresis térmica. La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor necesaria para aumentar la temperatura de una muestra y la de referencia se mide en función de la temperatura. Cuando se produce una transformación física, como la transición de fase, será necesario que fluya más o menos calor a la muestra que la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. La diferencia de temperatura entre la transición de fase de la referencia y la muestra informa sobre la capacidad de la muestra para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a temperaturas inferiores a 0 °C. En un experimento estándar, una muestra que comprende el polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido y/o solución crioprotectora se compara con una referencia que carece del polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido y/o solución crioprotectora.

G. Ensayos de viabilidad celular para evaluar la actividad

En el presente documento se describen ensayos de viabilidad celular para evaluar la capacidad del polímero peptoide, híbrido peptoide-péptido y/o solución crioprotectora para mantener la viabilidad celular a temperaturas reducidas.

En algunos aspectos, la viabilidad celular se evalúa usando el protocolo de ensayo de viabilidad celular alamarBlue® proporcionado por Thermo Fisher Scientific, Inc. Brevemente, alamarAzul® es el nombre comercial de resazurina (10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona), que es un compuesto permeable a las células no tóxico de color azul y prácticamente no fluorescente. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. Las células viables convierten de manera continua la resazurina en resorufina, aumentando la fluorescencia y el color generales de los medios que rodean las células. Las células no viables no convierten la resazurina en resorufina, por tanto, la fluorescencia y el color generales de los medios que rodean a las células son una indicación de la cantidad relativa de células viables en la muestra. En un experimento estándar, las células y el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido y/o la solución crioprotectora se mezclan en cualquier recipiente adecuado. Seguidamente la mezcla se enfría a la temperatura inferior a 0 °C deseada y se mantiene durante la cantidad de tiempo deseada. Las células se devuelven luego a temperatura ambiente y se añade el reactivo alamarBlue®, se incuba y se mide siguiendo el protocolo Thermo Fisher. Normalmente, la lectura directa de la viabilidad celular se determina midiendo la fluorescencia relativa de las muestras en las longitudes de onda $\lambda_{Ex} \sim 560 \text{ nm}$ / $\lambda_{Em} \sim 590 \text{ nm}$.

En algunos aspectos, la viabilidad celular se evalúa usando el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD®, para células de mamíferos proporcionado por Thermo Fisher Scientific, Inc. Este kit usa dos moléculas indicadoras: calceína AM y homodóímero-1 de etidio (EthD-1). Las células vivas se distinguen por la presencia de actividad esterasa intracelular ubicua, determinada por la conversión enzimática de la calceína AM permeable a las células prácticamente no fluorescente en la calceína intensamente fluorescente. El colorante polianiónico calceína se retiene bien dentro de las células vivas, produciendo una intensa fluorescencia verde uniforme en células vivas ($\lambda_{Ex} \sim 495 \text{ nm}$ / $\lambda_{Em} \sim 515 \text{ nm}$). En cambio, EthD-1 entra en las células con membranas dañadas y experimenta un aumento de fluorescencia de 40 veces al unirse a los ácidos nucleicos, produciendo así una fluorescencia roja brillante en las células muertas ($\lambda_{Ex} \sim 495 \text{ nm}$ / $\lambda_{Em} \sim 635 \text{ nm}$). De forma notable, EthD-1 está excluido por la membrana plasmática intacta de las células vivas, por lo que la determinación de células vivas y muertas es fácilmente distinguible. La calceína y EthD-1 se pueden observar simultáneamente con un filtro de paso largo de fluoresceína convencional. Como alternativa, la fluorescencia de estos colorantes también puede observarse por separado; la calceína puede observarse con un filtro de paso de banda de fluoresceína estándar y el EthD-1 puede observarse con filtros para yoduro de propidio o colorante rojo Texas®. En un experimento estándar, las células y el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido y/o la solución crioprotectora se mezclan en cualquier recipiente adecuado. Luego, la mezcla se enfría a la temperatura deseada por debajo de 0 °C, se mantiene a esa temperatura durante el tiempo deseado y luego vuelve a la temperatura ambiente. Las etapas posteriores que implican la adición de los reactivos de calceína AM y EthD-1 y la medición de los resultados del ensayo se realizan como se describe en el protocolo de Thermo Fisher. Normalmente, la lectura directa de la viabilidad celular se determina midiendo la fluorescencia relativa en las longitudes de onda indicadas anteriormente para ambos reactivos.

En algunos aspectos, la viabilidad celular se evalúa usando el ensayo MTT. El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico de viabilidad y proliferación celular que se basa en la reducción de tetrazolio amarillo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán insoluble, que tiene un color morado. La reducción del colorante de tetrazolio depende de las enzimas oxidorreductasa dependientes de NAD(P)H, ubicadas principalmente en el compartimento citosólico de las células metabólicamente activas. El ensayo de MTT está disponible, por ejemplo, en ATCC (www.atcc.org) o Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). En un experimento estándar, las células y el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido y/o la solución crioprotectora se mezclan en cualquier recipiente adecuado. Seguidamente la mezcla se enfría a la temperatura inferior a 0 °C deseada y se mantiene durante la cantidad de tiempo deseada. Las células se devuelven luego a temperatura ambiente y se añade el reactivo MTT, se incuba y se mide siguiendo el protocolo ATCC o Sigma-Aldrich. Normalmente, la absorbancia del colorante convertido se mide a una longitud de onda de 570 nm con sustracción de fondo a 630-690 nm.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Inhibición mediada por peptoides de la formación de cristales de hielo.

Este ejemplo ilustra las propiedades de inhibición de los cristales de hielo de los polímeros peptoides N-sustituídos y de los híbridos peptoide-péptido a temperaturas inferiores a 0 °C.

Ensayos de tubo capilar

En este experimento, se prepararon cuatro muestras con base acuosa en tubos capilares que contenían agua purificada MilliQ. Una muestra contenía solo agua y otra muestra contenía etilenglicol (EG) 160 mM. Las otras dos muestras contenían cada una un polímero peptoide a 9 mM. Una de las muestras de polímero peptoide contenía el polímero peptoide llamado "Compuesto 1", mientras que la otra muestra contenía el polímero peptoide llamado "Compuesto 10". Las secuencias de los polímeros peptoides son las siguientes:

Compuesto 1: Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb (SEQ ID NO:1);

Compuesto 10: Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp (SEQ ID NO:2).

Las estructuras químicas de estos compuestos se proporcionan en la Tabla 2.

Después de la preparación de la muestra, todas las muestras se enfriaron lentamente y se incubaron a -20 °C en una placa enfriada Peltier. Después de una hora, las muestras se extrajeron y se fotografiaron inmediatamente usando una cámara digital conectada a un microscopio estereó con zoom 180x (FIG. 2A). Las muestras de agua y EG mostraron una importante formación de cristales de hielo, aunque la muestra de EG mostró menos formación de hielo que la muestra de solo agua. Por el contrario, ninguna de las muestras que contenían los compuestos de polímero peptoide presentó una formación significativa de cristales de hielo. Los datos normalizados se presentan en la FIG. 2B. Como observación, la muestra de EG, que contenía una concentración de CPA que era aproximadamente 18 veces mayor que las concentraciones de la muestra de peptoide, todavía presentaron una formación de hielo significativa, mientras que las muestras de peptoides no lo hicieron.

Ensayos de difracción de rayos x cristalográficos

Con el fin de aumentar el rendimiento del análisis de la biblioteca, se usó una técnica cristalográfica de difracción de rayos x (DRX) para evaluar la formación de cristales de hielo. Para estos experimentos, se evaluaron los compuestos denominados "Compuesto 2", "Compuesto 8", "Compuesto 10", "Compuesto 11", "Compuesto 12", "Compuesto 13", y "Compuesto 58". Los compuestos 2, 8, 10, 11, 12 y 13 son polímeros peptoides, cuyas estructuras se proporcionan en la Tabla 2. El Compuesto 58 es un híbrido peptoide-péptido, cuya estructura se proporciona en la Tabla 10. El Compuesto 58 es similar al Compuesto 12, excepto que se ha añadido un aminoácido de arginina al extremo N-terminal.

Para estos experimentos, se usaron concentraciones de EG entre 15 % y 30 % (v/v). Normalmente, EG, DMSO y otros crioprotectores se usan durante el análisis de muestras XRD en concentraciones del 35-40 % (v/v) para vitrificar soluciones y evitar interferencias de difracción de cristales de hielo. Se usaron concentraciones de 1 y 5 mg/ml de los compuestos peptoide y peptoide-péptido. Las FIG. 3A, 3B y 3C ilustran datos de XRD ilustrativos en condiciones de vitrificación completa, vitrificación parcial con presencia de hielo cúbico y congelación (cristales de hielo cúbicos), respectivamente. Los datos de XRD para los Compuestos 8, 10, 11, 12, 13 y 58 se proporcionan en las FIG. 4A-4G y las FIG. 5A-5G. La FIG. 3D proporciona puntuaciones de anillos de hielo para una variedad de concentraciones de EG y dos concentraciones de los Compuestos 2, 8 y 12.

Varias mezclas de los conjuntos de muestras de solución de ensayo mostraron un fuerte efecto antihielo. La FIG. 3D

muestra los resultados experimentales de algunas soluciones de polímeros peptoides en comparación con EG. "Anillo de hielo 1" y "Anillo de hielo 2" se refieren a puntuaciones de formación de hielo, que varían entre 0 (sin formación de hielo) y 15 (formación de hielo grande). Los Compuestos 2, 12 y 8 y otros redujeron significativamente las concentraciones necesarias de EG al tiempo que previnieron la formación de hielo.

La muestra que contenía el Compuesto 12 en una concentración de 5 mg/ml (0,5 % (p/v)) y EG en una concentración del 17,5 % (v/v) en agua estaba libre de hielo después de la congelación instantánea. Se constató que esta mezcla en particular eliminaba por completo toda la formación de hielo en múltiples ensayos de congelación instantánea en una corriente de vapor de nitrógeno líquido (FIG. 3A) y superó ampliamente a una solución estándar de 30 % de EG (FIG. 3B). En las figuras, los puntos negros y los anillos representan cristales de hielo. En comparación con EG con la misma concentración molar, este efecto antihielo es 500 veces más potente y, sin quedar ligados a teoría particular alguna, sugiere un mecanismo no coligativo para antihielo, que es el mecanismo usado por las proteínas anticongelantes naturales.

Ensayos de mayor volumen

Con el fin de evaluar la utilidad de las composiciones de la presente invención a escalas mayores, se realizaron experimentos usando volúmenes de solución similares a los volúmenes usados para la preservación estándar de óvulos y células madre. Para estos experimentos, dos muestras, una que contenía 22,5 % de EG y tampón solamente, y otra que contenía 22,5 % de EG y 5 mg/ml (0,5 % p/v) del Compuesto 12 y tampón, se congelaron de manera instantánea en nitrógeno líquido. Como se muestra en la FIG. 6A, la solución del Compuesto 12 mostró una vitrificación completa sin formación de hielo inmediatamente después de su eliminación del nitrógeno líquido, mientras que la solución de control se había congelado claramente, produciendo una masa de cristales de hielo blancos. El recalentamiento de las soluciones en un baño de agua a 37 °C produjo un resultado inesperado y beneficioso. La solución del Compuesto 12 pasó por alto la desvitrificación en menos de 2 segundos tras el recalentamiento (FIG. 6B, derecha), mientras que se observaron trozos de hielo flotando en la muestra de control (FIG. 6B, izquierda) después de 20 segundos. Se observó condensación en cada uno de los tubos porque los tubos todavía estaban muy por debajo de la temperatura ambiente. Este resultado muestra que el Compuesto 12 actúa como un descongelante activo durante la descongelación.

Asimismo, después de dejar las muestras de 100 µl en un congelador a -20 °C durante la noche, se constató que la solución del Compuesto 12 no se había congelado (FIG. 6C, derecha). Este resultado muestra que las composiciones de la presente invención proporcionan la capacidad de preservar muestras a temperaturas inferiores a 0 °C durante largos períodos de tiempo sin formación de hielo. Asimismo, estos experimentos muestran que se pueden alcanzar condiciones sin hielo mediante criopreservación hipotérmica o mediante el método de sobreenfriamiento, a -20 °C, así como cerca de la vitrificación a -80 °C mediante la incorporación de compuestos de la presente invención para reducir significativamente la concentración crítica de CPA penetrantes y mitigar la toxicidad de la criopreservación.

Como se muestra aquí, se constató que una formulación del Compuesto 12 previene la formación de hielo durante la vitrificación en volúmenes inferiores a mililitros. De hecho, las soluciones pudieron permanecer completamente descongeladas a -20 °C y también pudieron vitrificarse cuando se congelaron instantáneamente a -196 °C. Actualmente, las técnicas estándar de preservación de óvulos humanos para la fertilización *in vitro* se limitan a volúmenes de solución de menos de 5 µl (a menudo de 0,5 a 2,5 µl) mientras se usan concentraciones de crioprotectores del 50 % o superiores. Por tanto, El Compuesto 12 pudo prevenir la formación de hielo en un volumen práctico, con muchísimo menos crioprotector, lo que lo hace útil, por ejemplo, para preservar ovocitos humanos para fertilización *in vitro*.

Ejemplo 2. Cribado de citotoxicidad y criopreservación.

Este ejemplo muestra que las composiciones de la presente invención tienen poca o ninguna toxicidad celular y pueden lograr una criopreservación superior en comparación con los compuestos existentes, al tiempo que reducen la cantidad necesaria de CPA y, por tanto, reducen la toxicidad asociada a CPA.

Ensayos de citotoxicidad

Con el fin de demostrar la seguridad de las composiciones crioprotectoras de la presente invención, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad basado en células de alto rendimiento usando la línea celular HEK 293, que es una línea de células madre resistente y robusta cultivada a partir de células de riñón embrionario humano en cultivo de tejidos.

Se usó una estación de trabajo robótica Tecan Genesis para preparar soluciones en placas de 96 y 384 pocillos. Las soluciones contenían medios de cultivo, tampones, una composición crioprotectora de la presente invención (Compuesto 12) o DMSO. Las soluciones se ajustaron al pH deseado. Se realizaron diluciones en serie para obtener soluciones que contenían diversas concentraciones de Compuesto 12 y DMSO. Los experimentos de control se realizaron usando únicamente medios de cultivo.

Para estos experimentos, las células se sembraron a baja densidad (es decir, 10 % de confluencia), se expusieron a

soluciones que contenían el Compuesto 12 o DMSO, y se colocaron en una incubadora a 37 °C. Se dejó que las células crecieran hasta que las células de control que se trataron solo con vehículo vacío alcanzaran una confluencia del 70 % (normalmente, entre 3 y 5 días). La evaluación de la citotoxicidad del compuesto se realizó mediante ensayo de MTT.

Como se puede ver en la FIG. 7, la toxicidad del Compuesto 12 no se desvió significativamente de la de los medios de cultivo solos cuando se analizó mediante ensayo de MTT. Por otro lado, el DMSO no permitió la supervivencia en caliente durante un período prolongado de tiempo a ninguna concentración superior al 0,5 % (v/v). De forma notable, el Compuesto 12 no mostró toxicidad en las concentraciones en las que puede prevenir la formación de hielo en una muestra no biológica (0,5 % w/v) y tampoco mostró toxicidad significativa en concentraciones cuatro veces mayores que esta concentración.

Estos resultados muestran que las composiciones de la presente invención fueron eficaces para prevenir la formación de hielo incluso en concentraciones en las que la toxicidad del DMSO reducía significativamente la supervivencia celular.

Ensayos de criopreservación

Los ensayos iniciales de criopreservación se realizaron usando soluciones muy simples, con y sin la adición del Compuesto 12, con el fin de minimizar factores de confusión externos. Para este primer conjunto de experimentos, se prepararon dos soluciones de muestra. La primera solución de muestra contenía tampón simple y etilenglicol (EG) en una concentración del 22,5 % (v/v), y la segunda solución de muestra contenía un tampón simple, EG (22,5 % (v/v)), y 5 mg/ml (0,5 % (w/v)) del Compuesto 12.

Las células HEK 293 se cultivaron hasta un 70 % de confluencia, luego se trataron con tripsina para eliminar las proteínas de adhesión y producir células flotantes libres. Las células se contaron usando un hemocitómetro y las concentraciones de las células de la muestra se ajustaron a concentraciones finales de 10.000 células por microlitro. Luego, las células se comprimieron en gránulos apretados mediante centrifugación y posteriormente cada muestra se mezcló con 20 µl de una de las soluciones de muestra. Seguidamente las muestras se congelaron de manera instantánea mediante inmersión en nitrógeno líquido, seguido de recalentamiento en un baño de agua a 37 °C. Después del proceso de congelación-descongelación, las células se suspendieron en un volumen de 400x de medios de cultivo para su recuperación. La muestra de control positivo se trató con medio de cultivo a 37 °C y no se sometió al proceso de congelación-descongelación. La muestra de control negativo se trató con medios de cultivo solamente durante el proceso de congelación-descongelación. Tras la recuperación, las células se tiñeron con calceína AM durante 30 minutos y se midió la viabilidad celular usando un lector de placas de fluorescencia.

Como se muestra en la FIG. 8, la adición del Compuesto 12 mejoró enormemente la supervivencia celular y demostró la capacidad de este compuesto para criopreservar células. Se observó que la muestra que contenía el Compuesto 12 logró una vitrificación completa sin formación de hielo durante el proceso de congelación. Además, el proceso de desvitrificación se evitó mucho más rápidamente en comparación con la muestra que carecía del Compuesto 12.

Se realizó una segunda serie de experimentos para evaluar el potencial de criopreservación de una formulación que contenía 5 mg/ml del Compuesto 12 más una mezcla de glicoles, disacáridos y un tampón general. La supervivencia posdescongelación tras la vitrificación en nitrógeno líquido se evaluó como se ha descrito anteriormente. Como se puede ver en la FIG. 9, la formulación logró cerca del 100 % (es decir, 98 %) de supervivencia de las células después de la descongelación, que fue similar al grupo de control que no se expuso al tratamiento de congelación. Las morfologías celulares y las señales de fluorescencia parecían idénticas a las de los controles no congelados, lo que indicó que se produjo poco daño a las células durante el experimento.

Como parte del segundo conjunto de experimentos, se comparó el potencial de criopreservación de la formulación con dos reactivos de criopreservación conocidos. VS2E es una solución libre de DMSO y libre suero que contiene polímeros no definidos químicamente (véase, p. ej., Nishigaki *et al.* Int. J. Dev. Biol. 55:3015-311 (2011)), y M22 es una solución de vitrificación de órganos disponible en 21st Century Medicine. La FIG. 9 muestra que la formulación que contiene el Compuesto 12 logró una criopreservación superior, ya que la supervivencia celular fue del 72 % y del 51 % para VS2E y M22, respectivamente. Cabe señalar que para la muestra M22, la fluorescencia de fondo puede haber sesgado este resultado, ya que un recuento de células vivas en la imagen sugirió que mucho menos del 51 % de las células habían sobrevivido.

Las composiciones de la presente invención fueron muy eficaces para prevenir la formación de hielo en soluciones que contienen etilenglicol significativamente reducido. En particular, concentraciones bajas de las composiciones (por ejemplo, 0,5 % (w/v)) fueron suficientes para bloquear el crecimiento de hielo durante la vitrificación y para mantener las soluciones en un estado líquido, libre de hielo en la escala de 20 µl, que es una escala que es útil para la preservación de varios tipos de células.

Resumiendo, estos resultados muestran que las composiciones de la presente invención pueden lograr una criopreservación superior y reducir la cantidad necesaria de CPA, reduciendo con ello la toxicidad celular asociada

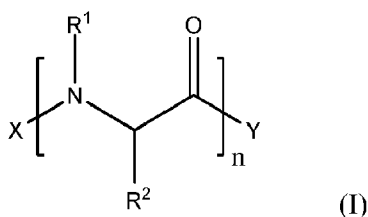
con los CPA. Las propiedades superiores de las composiciones de la presente invención son especialmente útiles para el tratamiento de líneas celulares particularmente sensibles y/o cuando las células necesitan ser cultivadas durante periodos de tiempo más prolongados.

5 VI. Listado informal de secuencias

SEQ ID NO:	Secuencia	Notas
1	Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nsb	Compuesto 1
2	Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp	Compuesto 10
3	Nep-Nep-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Nep-Nep-Nep-Nep-Nme-Nme	Híbrido peptoide-péptido
4	Nmc-Nmc-Xaa-Nmc-Nmc-Nmc-Nmc-Nhp-Nhp-Nsb-Xaa-Nme-Nme-Xaa-Nme-Nme-Nme	Híbrido peptoide-péptido
5	Nme-Nme-Xaa-Nme-Nme-Nme-Nme-Nme-Nme-Nme-Xaa-Xaa	Híbrido peptoide-péptido
6	Arg-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb	Híbrido peptoide-péptido (Compuesto 58)
7	Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp	Compuesto 6
8	Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb	Compuesto 12
9	Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp	Compuesto 8
10	Nsb-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nsb-Nhp	Compuesto 2

REIVINDICACIONES

1. Un polímero peptoide según la fórmula (I):



o estereoisómero del mismo,
en donde:

cada R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₈, alqueno C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₈ opcionalmente sustituido, hidroxialquilo C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₁₋₁₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, (cicloalquil C₃₋₁₀)alquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilalquilo, y heteroarilalquilo,

en donde al menos 4 casos de R¹ son grupos hidroxialquilo C₁₋₁₈ independientemente seleccionados, y en donde cualquiera de los grupos cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está opcional e independientemente sustituido con uno o más grupos R³;

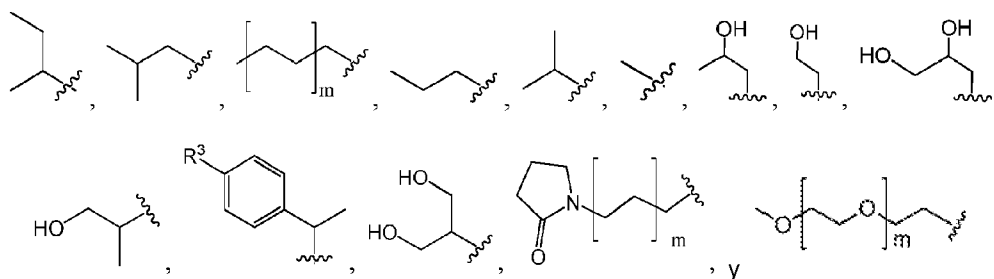
cada R² es H;

cada R³ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, oxo, tioxo, -OH, -SH, amino, alquilo C₁₋₈, hidroxialquilo C₁₋₈, alquilamino C₁₋₈ y alquiltio C₁₋₈;

X e Y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, acilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, -OH, -SH, -NH₂, carboxi, hidroxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquilamino C₁₋₈ opcionalmente sustituido, alquiltio C₂₋₈ opcionalmente sustituido, carboxialquilo C₁₋₈ opcionalmente sustituido, y halógeno, o

alternativamente, X e Y se toman en conjunto para formar un enlace covalente; y el subíndice n, que representa el número de monómeros en el polímero, es de entre 8 y 25.

2. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde cada R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en

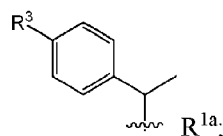


en donde:

m es entre 1 y 8; y

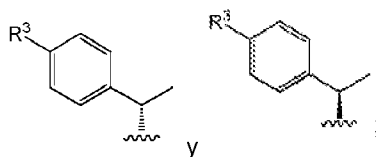
R³ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈, halógeno, hidroxilo, tiol, nitro, amina, oxo y tioxo; opcionalmente en donde:

(a) uno o más R¹ tienen una estructura según R^{1a}:

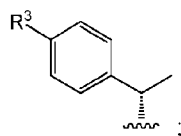


opcionalmente en donde:

(i) cada grupo R^{1a} se selecciona independientemente entre:

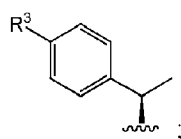


(ii) cada grupo R^{1a} es:



5

o
(iii) cada grupo R^{1a} es:

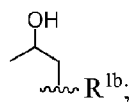


10

o

(b) uno o más R^1 tienen una estructura según R^{1b} :

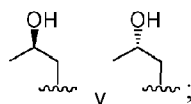
15



opcionalmente en donde:

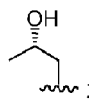
20

(i) cada grupo R^{1b} se selecciona independientemente entre:



(ii) cada grupo R^{1b} es:

25



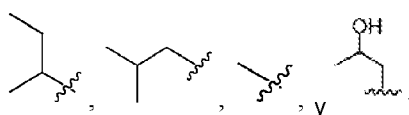
o
(iii) cada grupo R^{1b} es:

30



3. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde cada R^1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en

35



4. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde cada caso de R^1 es un grupo hidroxialquilo C_{1-6} seleccionado

40

independientemente,

opcionalmente en donde cada caso de R¹ es el mismo grupo hidroxialquilo C₁₋₆,
opcionalmente en donde cada caso de R¹ es

5



5. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde:

- 10 (a) n está entre 10 y 25;
(b) n está entre 8 y 20;
(c) X se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈ y acilo C₁₋₈; e Y se selecciona del grupo que consiste en -OH y amino; o
(d) X e Y se toman en conjunto para formar un enlace covalente.

15

6. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde n es 10 y el polímero peptoide comprende:

- 4 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 6 monómeros Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético);
o
20 5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb; o
6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb; o
7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nsb; o
8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nsb; o
10 monómeros Nhp;

25

opcionalmente en donde:

- (a) el polímero peptoide tiene la secuencia Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp; X es H o acilo C₁₋₈; e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈;
30 (b) el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp; X es H o acilo C₁₋₈; e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈;
(c) el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb-Nhp-Nhp-Nsb-Nsb; X es H o acilo C₁₋₈; e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈; o
(d) el polímero peptoide tiene la secuencia Nsb-Nhp-Nhp-Nhp-Nhp-Nsb-Nhp-Nhp-Nhp; X es H o acilo C₁₋₈; e Y es -OH o -NH₂ o alquilo C₁₋₈.

35

7. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde:

- (a) n es 10 y el polímero peptoide comprende:
40 4 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 6 monómeros Nme (ácido 2-(metilamino)acético);
o
5 monómeros Nhp y 5 monómeros Nme; o
6 monómeros Nhp y 4 monómeros Nme; o
45 7 monómeros Nhp y 3 monómeros Nme; o
8 monómeros Nhp y 2 monómeros Nme;

(b) n es 10 y el polímero peptoide comprende:

- 50 5 monómeros Nhe (ácido 2-((2-hidroxietil)amino)acético) y 5 monómeros Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético);
o
5 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 5 monómeros Nbu (ácido 2-butilamino)acético);
opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 4;

55 (c) n es 10 y el polímero peptoide comprende:

- 4 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 6 monómeros Nib (ácido 2-(isobutilamino)acético); o
4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nbu (ácido 2-butilamino)acético); o
60 4 monómeros Nhp y 6 monómeros Npr (ácido 2-propilamino)acético); o
4 monómeros Nhp y 6 monómeros Nip (ácido 2-(isopropilamino)acético);
opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 5;

(d) n es 14 y el polímero peptoide comprende:

6 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 8 monómeros Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético); o
 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nsb; o
 8 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb; o
 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb; o
 14 monómeros Nhp;
 opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 6;

(e) n es 14 y el polímero peptoide comprende:

6 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 8 monómeros Nib (ácido 2-(isobutilamino)acético); o
 7 monómeros Nhp y 7 monómeros Nib; o
 8 monómeros Nhp y 6 monómeros Nib; o
 10 monómeros Nhp y 4 monómeros Nib; o
 14 monómeros Nhp;
 opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 7;

(f) n es 16 y el polímero peptoide comprende:

5 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 11 monómeros Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético); o
 7 monómeros Nhp y 9 monómeros Nsb; o
 8 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb; o
 10 monómeros Nhp y 6 monómeros Nsb; o
 12 monómeros Nhp y 4 monómeros Nsb; o
 16 monómeros Nhp;
 opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 8; o

(g) n es 22 y el polímero peptoide comprende:

7 monómeros Nhp (ácido 2-((2-hidroxipropil)amino)acético) y 15 monómeros Nsb (ácido 2-(sec-butilamino)acético); o
 10 monómeros Nhp y 12 monómeros Nsb; o
 11 monómeros Nhp y 11 monómeros Nsb; o
 14 monómeros Nhp y 8 monómeros Nsb; o
 17 monómeros Nhp y 5 monómeros Nsb; o
 22 monómeros Nhp;
 opcionalmente en donde el polímero peptoide tiene una secuencia expuesta en la Tabla 9.

8. El polímero peptoide de la reivindicación 1, en donde el polímero peptoide:

- (a) forma una estructura helicoidal;
- (b) reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura entre 0 °C y -20 °C;
- (c) reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura entre -20 °C y -40 °C;
- (d) reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a -20 °C; o
- (e) reduce o inhibe la formación de cristales de hielo a una temperatura entre -40 °C y -200 °C.

9. Un híbrido peptoide-péptido que comprende un polímero peptoide de la reivindicación 1 y uno o más aminoácidos, en donde uno o más aminoácidos están situados en uno o ambos extremos del polímero peptoide; opcionalmente en donde:

- (a) los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, arginina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina y una combinación de los mismos; o
- (b) los uno o más aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en isoleucina, leucina, serina, treonina, alanina, valina, arginina, y una combinación de los mismos.

10. Una solución crioprotectora que comprende un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, o una combinación de los mismos; opcionalmente que comprende además un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en una especie iónica, un crioprotector penetrante, un crioprotector no penetrante, un antioxidante, un compuesto estabilizador de membrana celular, una acuaporina u otro compuesto formador de canales, un alcohol, un azúcar, un derivado de azúcar, un tensioactivo no iónico, una proteína, dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), Ficoll®, polivinilpirrolidona, alcohol

polivinílico, hialuronano, formamida, un hidrogel natural o sintético y una combinación de los mismos; opcionalmente en donde:

- 5 (a) el alcohol se selecciona entre el grupo que consiste en propilenglicol, etilenglicol, glicerol, metanol, butilenglicol, adonitol, etanol, trimetilenglicol, dietilenglicol, óxido de polietileno, eritritol, sorbitol, xilitol, polipropilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), manitol, inositol, ditioritol, 1,2-propanodiol y una combinación de los mismos;
- (b) el azúcar es un monosacárido, opcionalmente en donde el monosacárido se selecciona entre el grupo que consiste en glucosa, 3-O-metil-D-glucopiranososa, galactosa, arabinosa, fructosa, xilosa, manosa y una combinación de los mismos;
- 10 (c) el azúcar es un disacárido, opcionalmente en donde el disacárido se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa y una combinación de los mismos;
- (d) el azúcar es un polisacárido, opcionalmente en donde el polisacárido se selecciona entre el grupo que consiste en rafinosa, dextrano y una combinación de los mismos;
- (e) el PEG tiene un peso molecular promedio inferior a 1.000 g/mol;
- 15 (f) el PEG tiene un peso molecular promedio entre 200-400 g/mol;
- (g) la proteína se selecciona entre el grupo que consiste en albúmina de huevo, seroalbúmina bovina, seroalbúmina humana, gelatina y una combinación de las mismas;
- (h) el hidrogel natural o sintético comprende quitosano, ácido hialurónico, o una combinación de los mismos; o
- 20 (i) el tensioactivo no iónico se selecciona entre el grupo que consiste en polioxietileno lauril éter, polisorbato 80 y una combinación de los mismos.

11. Un método para preservar un tejido, órgano o célula, comprendiendo el método poner en contacto el tejido, órgano o célula con un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, una solución crioprotectora de la reivindicación 10, o una combinación de los mismos; opcionalmente en donde:

- 25 (a) el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre 0 °C y -20 °C;
- (b) el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre -20 °C y -40 °C;
- 30 (c) el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a -20 °C;
- (d) el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, la solución crioprotectora, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la formación de cristales de hielo a una temperatura de entre -40 °C y -200 °C;
- 35 (e) el tejido es un tejido modificado mediante bioingeniería;
- (f) el polímero peptoide, el híbrido peptoide-péptido, o una combinación de los mismos, está presente en una cantidad entre 100 nM y 100 mM; o
- 40 (g) el tejido, órgano o célula se selecciona entre el grupo que consiste en corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, timo, córnea, células nerviosas, plaquetas de la sangre, espermatozoides, ovocitos, células embrionarias no humanas, células madre, células madre pluripotentes humanas, células madre hematopoyéticas, linfocitos, granulocitos, células del sistema inmunológico, células óseas, organoides, y una combinación de los mismos.

- 45 12. Un método para preservar una macromolécula biológica, comprendiendo el método poner en contacto la macromolécula biológica con un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, una solución crioprotectora de la reivindicación 10, o una combinación de los mismos;
- opcionalmente en donde la macromolécula biológica se selecciona entre el grupo que consiste en un ácido nucleico, un aminoácido, una proteína, una proteína aislada, un péptido, un lípido, una estructura compuesta, y una combinación de los mismos.
- 50

13. Un producto de cuidado cosmético que comprende un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, una solución crioprotectora de la reivindicación 10, o una combinación de los mismos.

- 55 14. Un producto anticongelante que comprende un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, una solución crioprotectora de la reivindicación 10, o una combinación de los mismos;

opcionalmente en donde el producto anticongelante es un producto antihielo o de inhibición de hielo usado para prevenir, inhibir o retrasar la formación de hielo en un objeto;

- 60 opcionalmente en donde el objeto se selecciona entre el grupo que consiste en una aeronave o una parte de la misma, un gasoducto, una ventana, equipo eléctrico, un dron, un cable, una línea de energía eléctrica, equipamiento mecánico, un motor de automóvil, un sistema de engranaje y un sistema de frenado.

- 65 15. Un producto alimenticio congelado que comprende un polímero peptoide de la reivindicación 1, un híbrido peptoide-péptido de la reivindicación 9, una solución crioprotectora de la reivindicación 10, o una combinación de los mismos; opcionalmente en donde el producto alimenticio congelado se selecciona entre el grupo que consiste en helado, yogur,

marisco, fruta y productos cárnicos.

FIG. 1

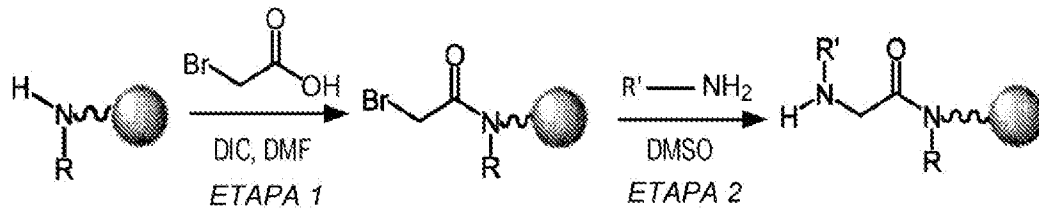


FIG. 2A

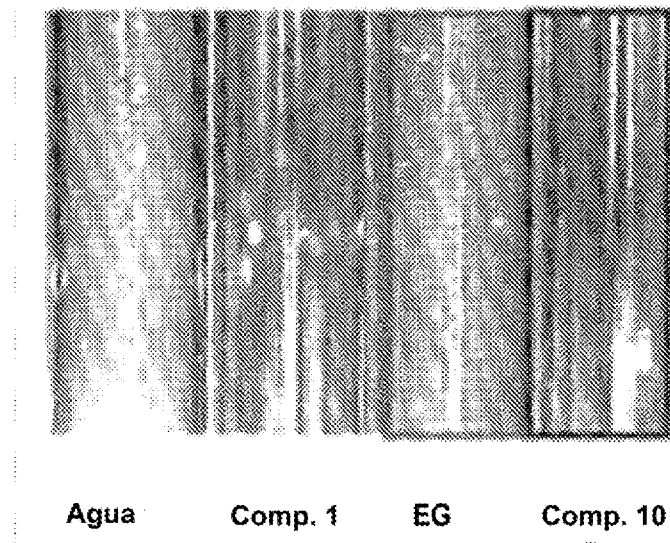


FIG. 2B

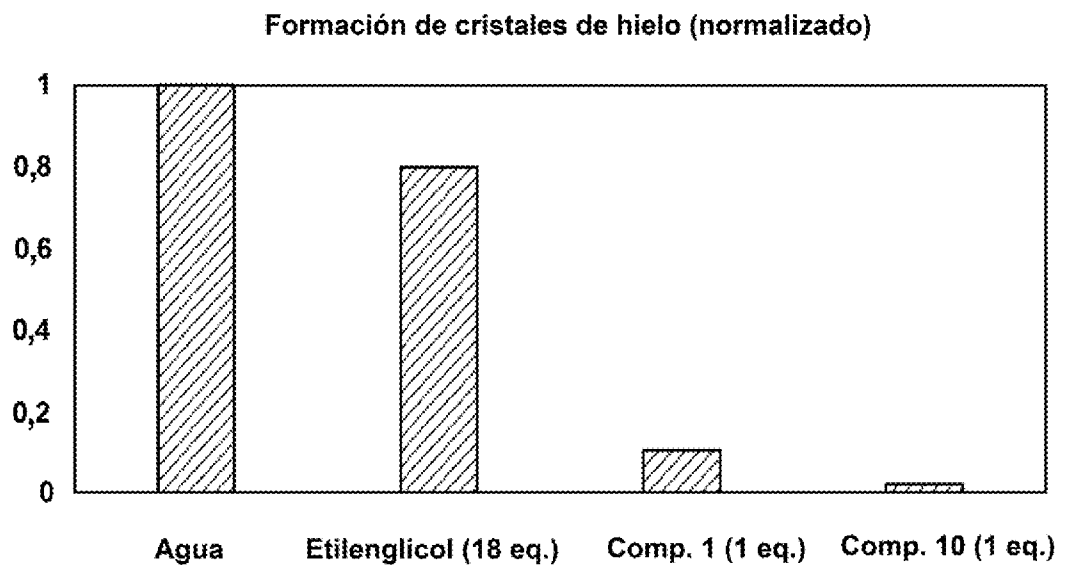


FIG. 3D

(d) difracción de rayos x de la formación de hielo

FIG. 3A

Vitrificación completa

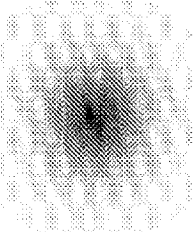


FIG. 3B

Vitrificación parcial con presencia de hielo cúbico

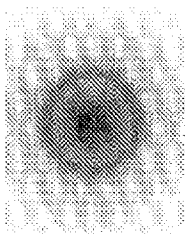
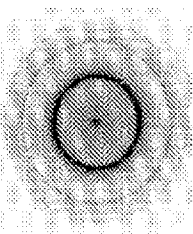
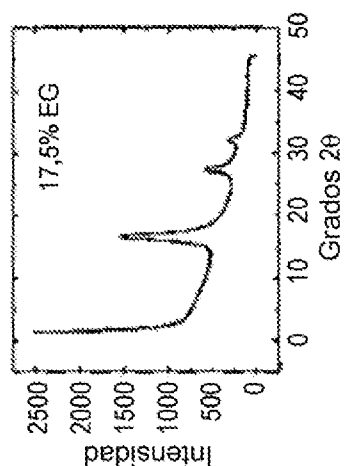
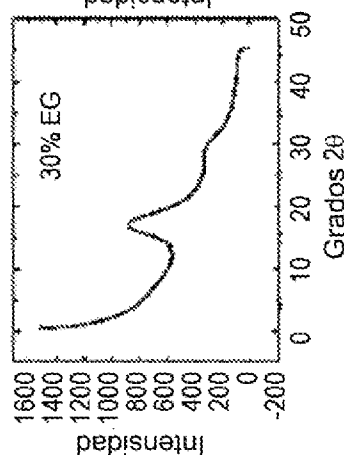
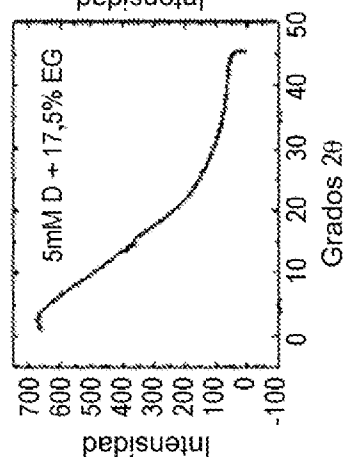


FIG. 3C

Congelado: cristales de hielo cúbicos



Solución	Anillo de hielo 1	Anillo de hielo 2
EG 15%	7	8
EG 17,5%	7	8
EG 20%	7	8
EG 22,5%	7	5
EG 25% (estándar)	5	5
EG 30% (estándar)	3	2
B (1 mg/ml)	4	1
B (5 mg/ml) EG 12,5%	6	5
D (1 mg/ml)	4	5
D (5 mg/ml) EG 17,5%	0	0
E (10 mg/ml)	3	2
E (5 mg/ml) EG 17,5%	1	0



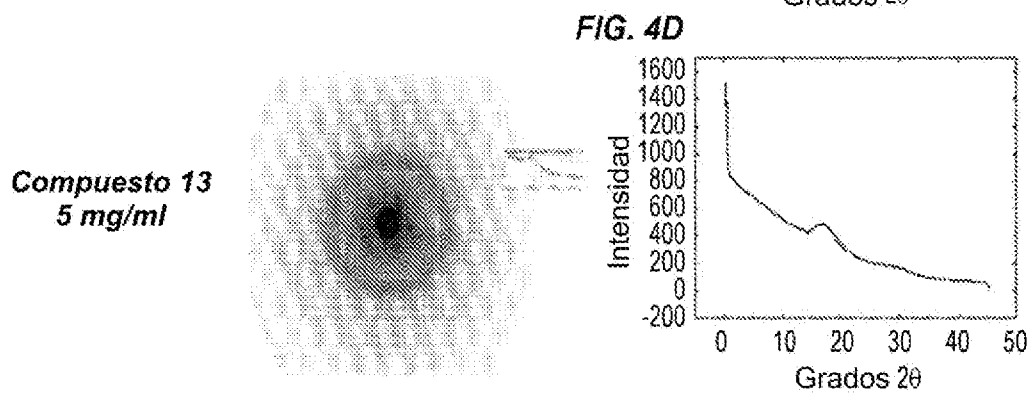
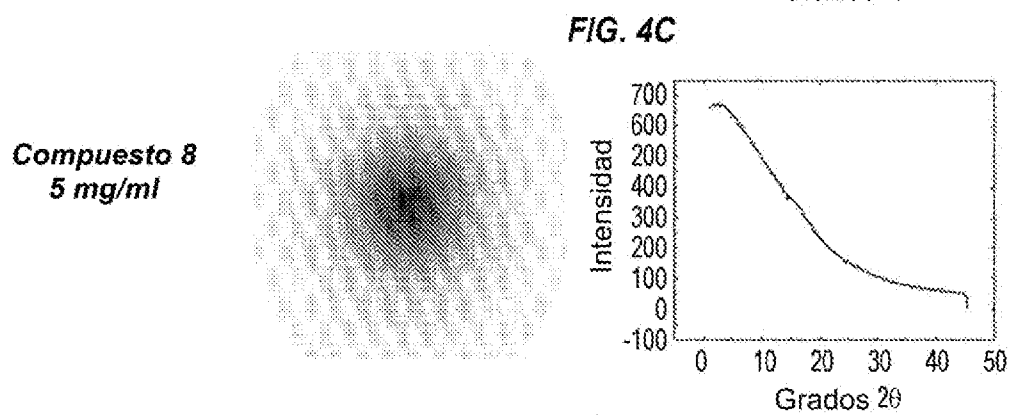
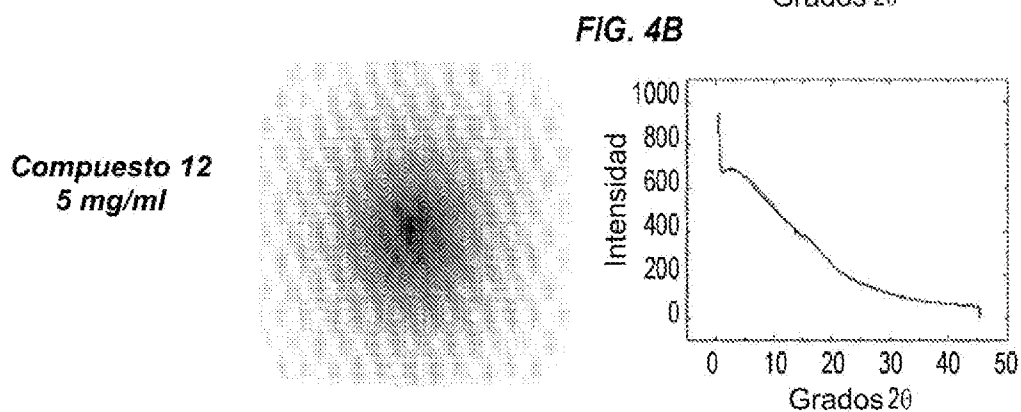
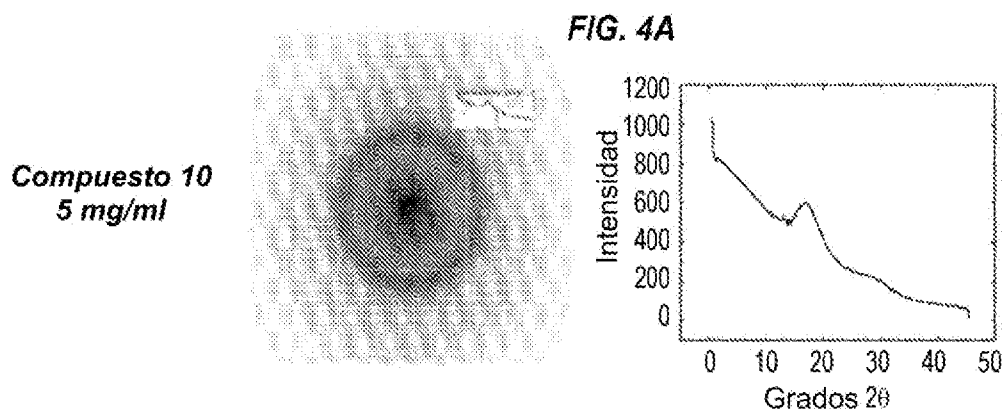


FIG. 4E

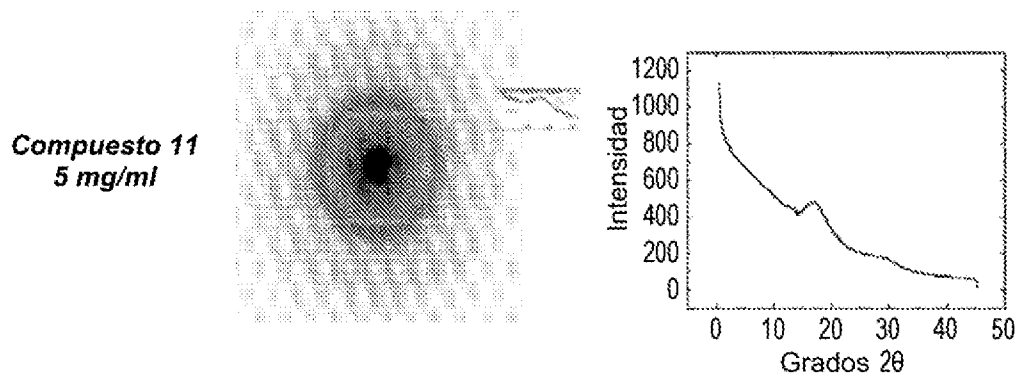


FIG. 4F

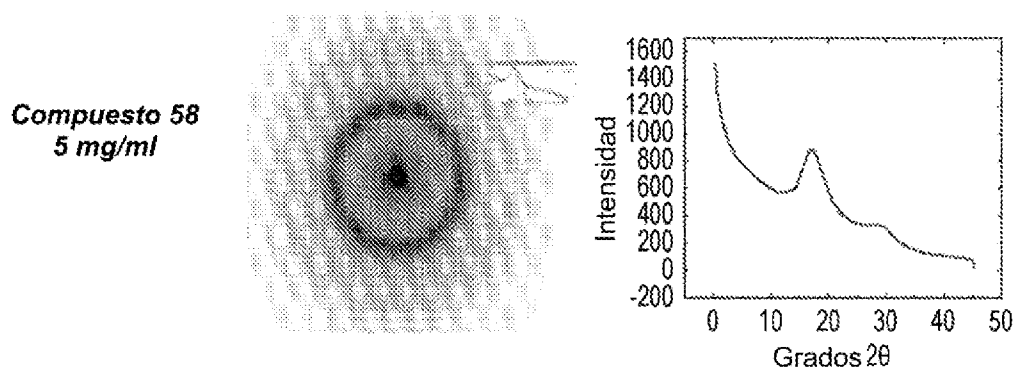


FIG. 4G

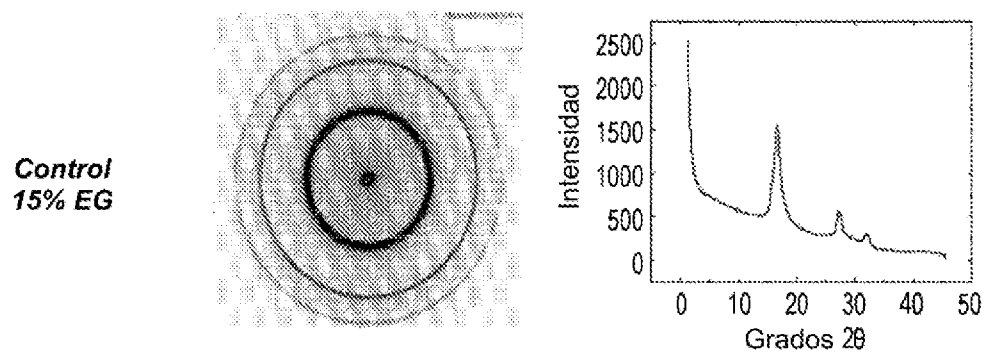


FIG. 5A

Compuesto 10
1 mg/ml

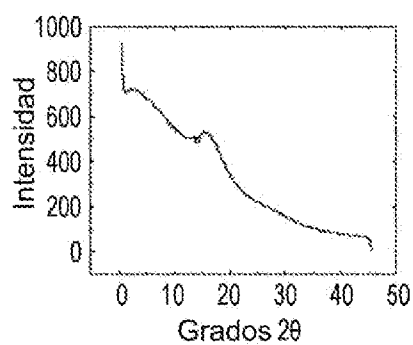
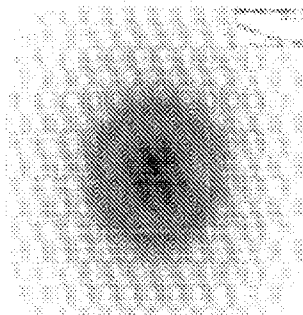


FIG. 5B

Compuesto 12
1 mg/ml

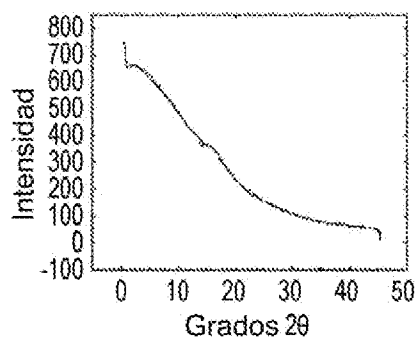
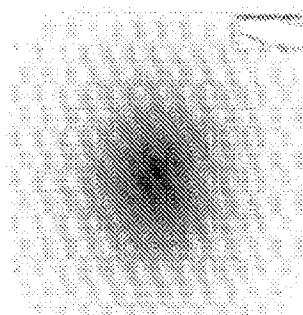


FIG. 5C

Compuesto 8
1 mg/ml

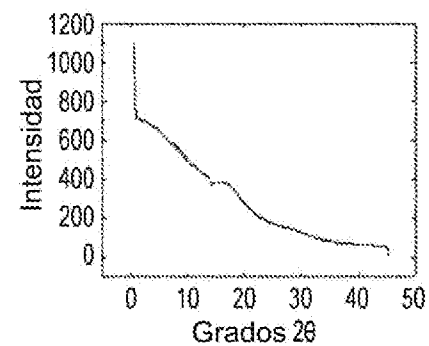
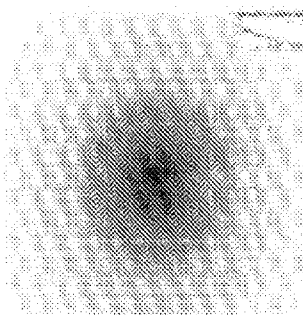


FIG. 5D

Compuesto 13
1 mg/ml

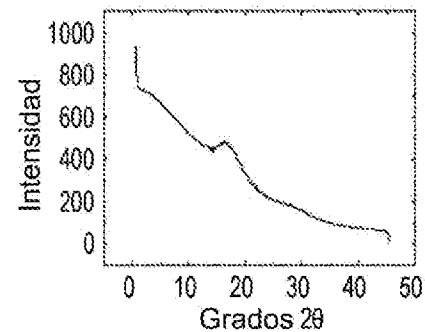
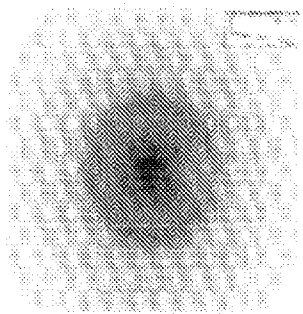


FIG. 5E

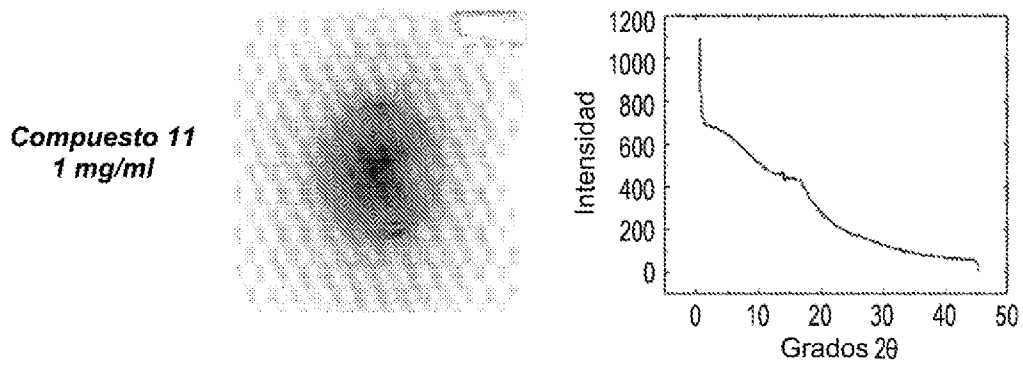


FIG. 5F

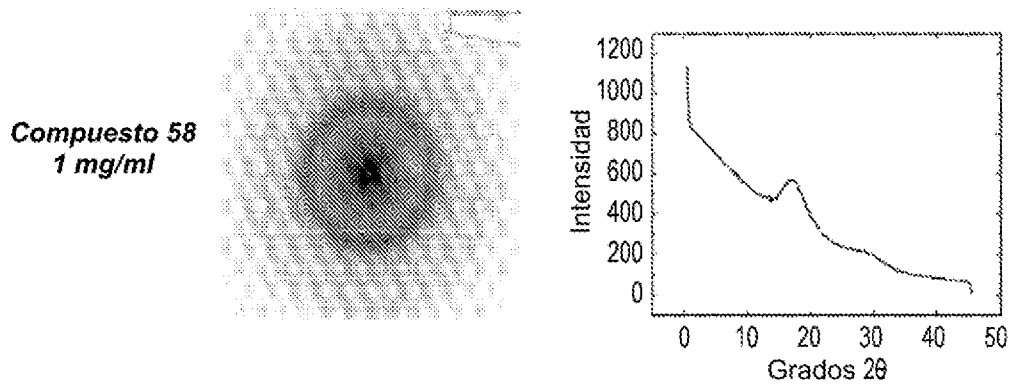


FIG. 5G

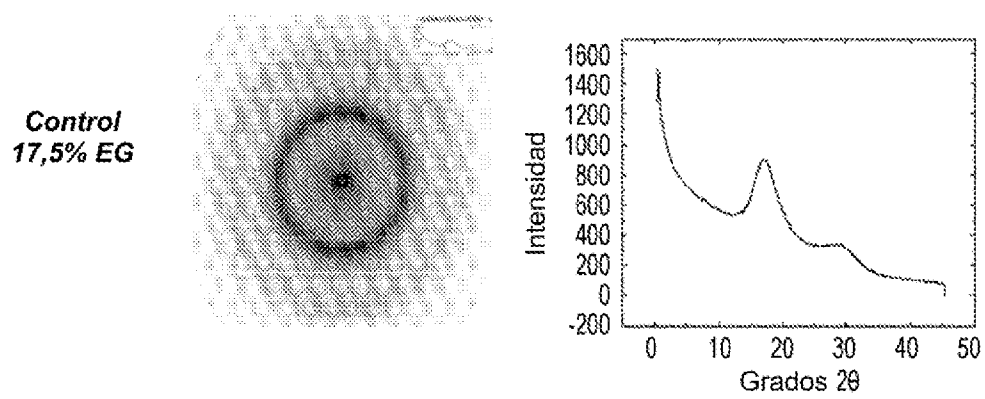


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

Control Compuesto 12 Control Compuesto 12 Control Compuesto 12

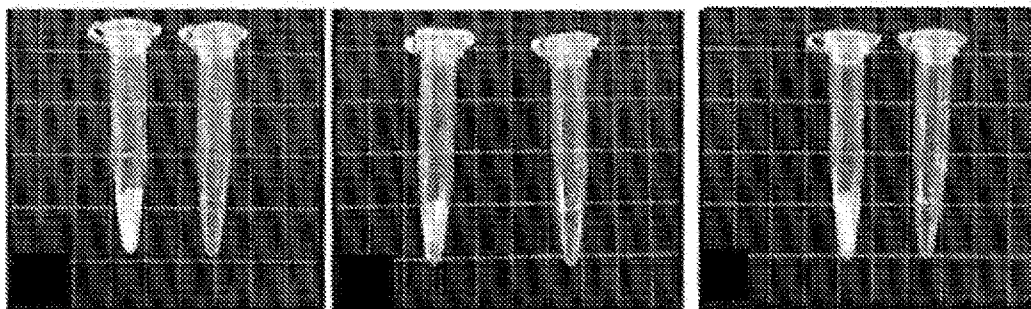


FIG. 7

Datos de toxicidad a 37 ° C (HEK 293)

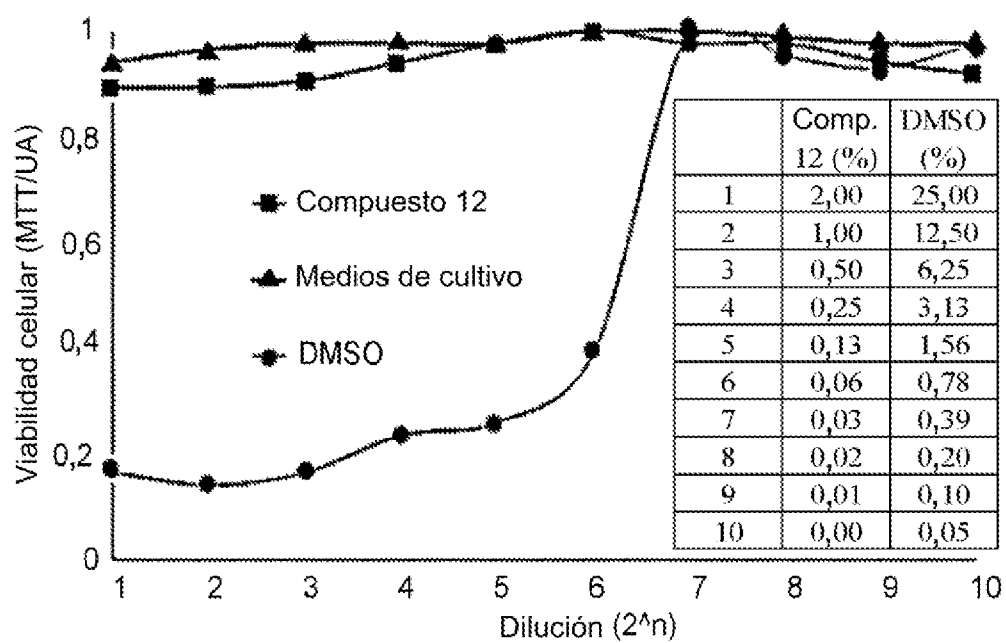


FIG. 8

Viabilidad celular 12 horas después de la descongelación en HEK 293 (normalizado)

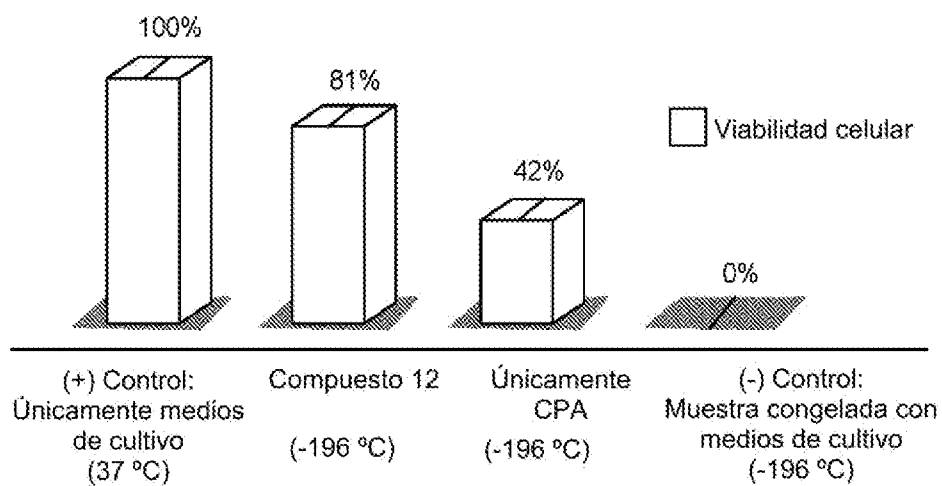


FIG. 9

Viabilidad celular 16 horas después de la descongelación en HEK 293 (normalizado) tras la vitrificación en LN2

