



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 980 216**

⑮ Int. Cl.:

C08G 65/34 (2006.01)
C08G 65/333 (2006.01)
C08G 63/06 (2006.01)
C08J 3/12 (2006.01)
C08J 5/00 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)
C08L 67/04 (2006.01)
C08L 71/02 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2016 E 20186381 (8)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3795609**

⑮ Título: **Sistemas de administración basados en polímeros de ácido mágico catiónicos**

⑯ Prioridad:

01.07.2015 US 201562187366 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

⑮ Titular/es:

CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY (100.0%)
1200 East California Boulevard M/C 6-32 Pasadena, CA 91125, US

⑯ Inventor/es:

DAVIS, MARK E. y PAN, DOROTHY

⑯ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 980 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistemas de administración basados en polímeros de ácido mágico catiónicos

Campo técnico

La presente descripción está dirigida a sistemas de administración de nanopartículas basadas en polímeros y conjugados de polímero para administrar agentes biológicos, y a los métodos para preparar y usar dichas composiciones.

Antecedentes

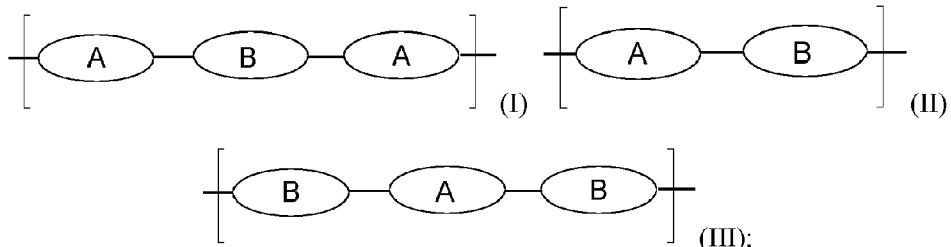
Las terapias que utilizan la interferencia de ARN (ARNi) como mecanismo de acción son muy prometedoras para el tratamiento de enfermedades humanas. Por ejemplo, el ARNip tiene características atractivas para su uso como agente terapéutico, que incluyen: (i) la capacidad de dirigirse esencialmente a cualquier gen (por lo tanto, todos las dianas son en principio tratables con fármaco), (ii) IC₅₀ (concentración requerida para una inhibición del 50%) picomolar potente de un solo dígito para la inhibición del ARNm en ARNs bien diseñados, (iii) modificaciones químicas y diseños de secuencia que pueden minimizar los efectos fuera de la diana y la estimulación inmunológica sin comprometer la potencia y la especificidad de diana, y (iv) un mecanismo de acción de ARNi catalítico, que da como resultado una inhibición prolongada del ARNip de la expresión del ARNm diana. Aunque un obstáculo importante para la traducción de ARNip en un agente terapéutico eficaz y eficiente es la administración del ácido nucleico a la diana, las terapias experimentales basadas en ARNip han alcanzado el desarrollo clínico.

Los agentes terapéuticos investigados para el tratamiento del cáncer se administran principalmente por vía sistémica y utilizan algún tipo de compuestos sintéticos (lípidos o polímeros cargados positivamente) en sus formulaciones para administrar ARNip. Algunas de estas formulaciones ahora se denominan nanopartículas (NP). CALAA-01 fue el primer agente terapéutico basado en ARNip que llegó a desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer. Esta nanopartícula dirigida contiene un polícatión a base de ciclodextrina (CDP) que se ensambla con el ARNip a través de interacciones electrostáticas entre cargas positivas en el polímero y cargas negativas en la cadena principal del ARNip. El CALAA-01 fue capaz de administrar ARNip a tumores sólidos en pacientes y liberar ARNip funcional que inhibía la diana utilizando un mecanismo de ARNi (el primer ejemplo en un humano). Si bien el CALAA-01 mostró varias propiedades positivas, uno de sus inconvenientes es que tiene un tiempo en circulación muy limitado. La rápida eliminación de CALAA-01 que se observa en animales (ratones, ratas, perros y primates no humanos) también se observa en humanos. Han et al., *Bioconjugate Chem.* 2013, 24, 669-677 describe sistemas de suministro de nanopartículas MAP-CPT dirigidas que comprenden un copolímero de ácido mágico y polietilenglicol.

Sumario

Sería ventajoso el desarrollo de un sistema polimérico para la administración de ARNip que aumente el tiempo de circulación de las nanopartículas que contienen ARNip y disminuya la cantidad de componentes que no son ARNip dentro de la formulación. La presente descripción está dirigida a sistemas de administración que superan algunos de los inconvenientes de la técnica anterior. Entre los aspectos de la presente descripción se encuentra una familia de polímeros catiónicos basados en ácido mágico (cMAP), incluidos los copolímeros dibloque y tribloque, para la administración de ARNip *in vivo*, y nanopartículas derivadas de las mismas. Estos compuestos y estructuras y sus métodos de fabricación y uso se describen más detalladamente en esta especificación.

Ciertas realizaciones de la presente descripción proporcionan polímeros que comprenden segmentos alternos cargados y no cargados que comprenden una o más de las siguientes unidades estructurales de Fórmula (I) o Fórmula (II) o Fórmula (III):



donde

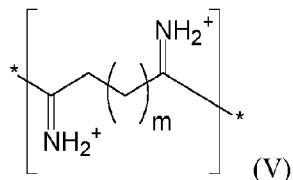
A es un segmento no cargado que comprende polialquilenglicol;

B es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un enlace polihidroxi que comprende al menos un par de dioles vecinales.

En ciertos aspectos, **A** es o comprende polietilenglicol y un grupo de enlace apropiado. En otras realizaciones, los restos de polialquilenglicol dentro de estos polímeros tienen un peso molecular promedio en número nominal en un

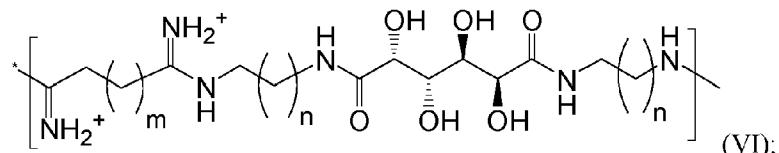
rango de aproximadamente 500 Daltonos a aproximadamente 50.000 Daltonos.

En aspectos solapados, **B** es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un polihidroxi que comprende al menos un par de dioles vecinales que comprende un enlace azúcar. En algunas realizaciones, estos enlaces polihidroxi comprenden ácido mágico. **B** puede comprender además al menos una subunidad repetida que comprende una estructura de Fórmula (V):



donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5.

En otras realizaciones, en estos polímeros, **B** puede comprender al menos una subunidad repetida que comprende cMAP, cuya estructura de subunidades se representa como Fórmula (VI):

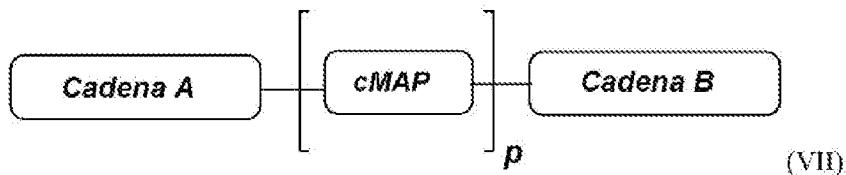


donde

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5; y

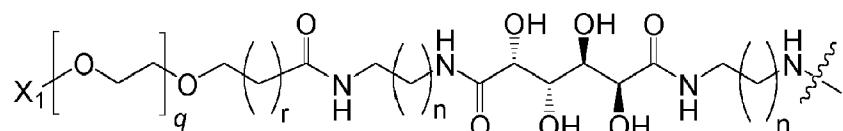
n es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4 o 5.

En algunas realizaciones específicas, los polímeros pueden describirse mediante una estructura de Fórmula (VII):

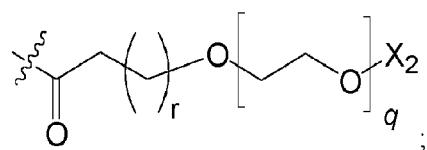


donde

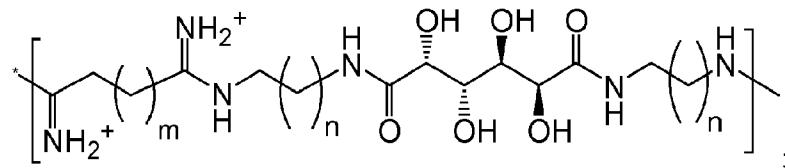
La cadena A es



La cadena B es



cMAP es



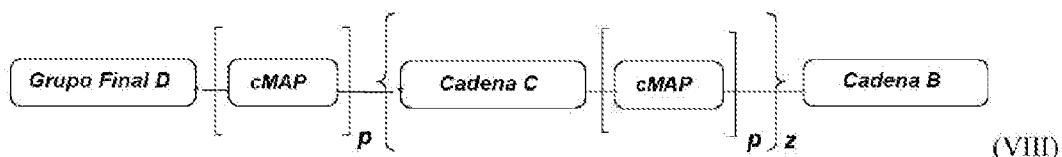
p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5;

n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y

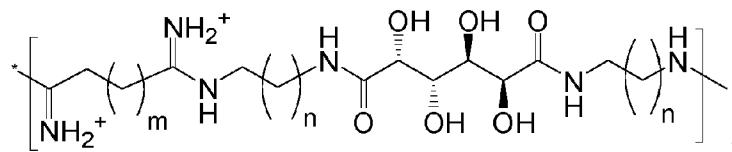
5 X₁ y X₂ son independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

Otras estructuras consideradas dentro del alcance de esta descripción incluyen aquellos polímeros descritos por una estructura de Fórmula (VIII):

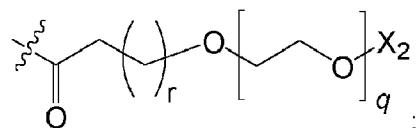


10 donde

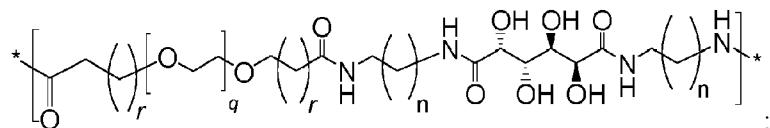
cMAP es



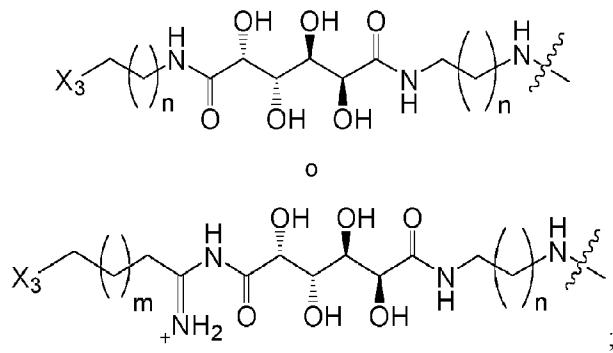
La cadena B es



15 La cadena C es



El grupo final D es:



20

p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5;

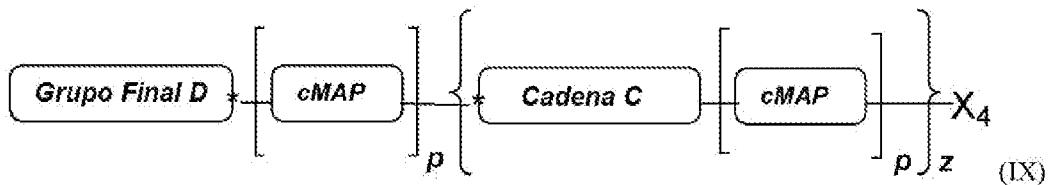
n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

25 z es igual o mayor que 1 (hasta aproximadamente 2, 4, 6, 8 o 10); y

X₂ es independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo; y

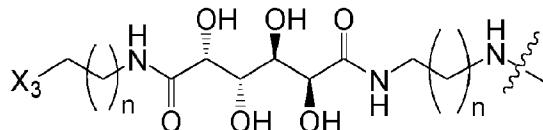
X₃ es -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

- 5 Otros polímeros adicionales pueden describirse mediante una estructura de Fórmula (IX):

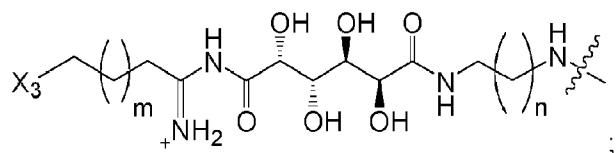


donde

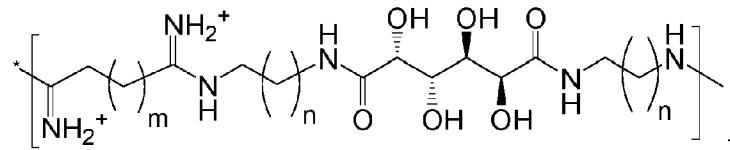
El grupo final D es:



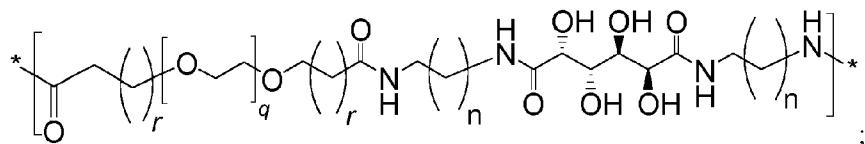
10



cMAP es



La cadena C es



15

p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 5000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5;

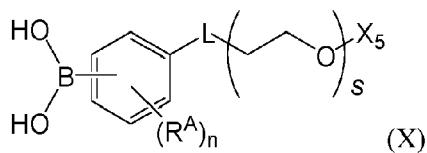
20 n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

z es igual o mayor que 1 (hasta aproximadamente 2, 4, 6, 8 o 10); y

X₃ y X₄ son independientemente en cada aparición -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

25

También se consideran dentro del alcance de la presente descripción los conjugados poliméricos que comprenden cada uno un polímero de cualquiera de las estructuras anteriores y un segundo polímero que contiene ácido borónico que comprende una estructura de Fórmula (X).



donde

el polímero y el segundo polímero que contiene ácido borónico están conectados reversiblemente entre sí mediante un enlace de condensación de borato entre los restos de ácido borónico de Fórmula (X) y al menos un par de dioles vecinales de los enlaces polihidroxí de las Fórmulas (I), (II), (III), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX), estando X_5 en el extremo distal de dicha conexión;

R^A es nitro (u otro grupo atractor de electrones);

n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 1;

s es 20-1200;

10 L es un grupo de enlace entre el anillo fenilo y el enlace de óxido de polietileno; y

X_5 es alquilo C_{1-6} , opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

La descripción también incluye una nanopartícula o una pluralidad de nanopartículas que comprenden cualquiera de los polímeros o conjugados de polímero descritos en el presente documento. Preferiblemente, las nanopartículas están monodispersas. Las nanopartículas pueden comprender además agentes biológicos encapsulados, por ejemplo, ARNip, y/o pueden conjugarse adicionalmente con uno o más ligandos dirigidos. Cuando se administra a un paciente, la biodisponibilidad del agente biológico es mejor que la misma biodisponibilidad del agente biológico cuando se administra solo.

20 En algunas realizaciones adicionales, los polímeros, conjugados de polímero y nanopartículas, que opcionalmente comprenden un agente biológico y/o ligando dirigido, se formulan en composiciones farmacéuticas.

Otras realizaciones adicionales proporcionan los métodos para preparar los polímeros de la invención.

Breve descripción de las figuras

La presente solicitud se comprende mejor cuando se lee junto con las figuras adjuntas. Adicionalmente, las figuras no están necesariamente realizadas a escala. En las figuras:

- 25 **Fig. 1:** muestra una representación esquemática de una síntesis de polímero de ácido mágico catiónico (cMAP).
- Fig. 2:** muestra una representación esquemática de una síntesis de copolímero de cMAP-PEG.
- Fig. 3:** muestra una representación esquemática de una síntesis de polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm.
- Fig. 4:** muestra una representación esquemática de una síntesis de ácido 5-nitrofenilborónico-PEGm.
- Fig. 5:** muestra la estructura de la etilendiamina de ácido mágico (ver **Tabla 1**).
- 30 **Fig. 6:** muestra la estructura del suberimidato de dimetilo (ver **Tabla 2**).
- Fig. 7:** muestra la estructura del suberimidato de dimetilo hidrolizado al éster dimetílico (ver **Tabla 2**).
- Fig. 8:** muestra la estructura del suberimidato de dimetilo con un lado hidrolizado al carboxilato (ver **Tabla 2**).
- Fig. 9:** muestra la estructura del polímero de ácido mágico catiónico (cMAP).
- 35 **Fig. 10:** muestra ejemplos de grupos terminales de cMAP. Los polímeros pueden tener grupos terminales de una amina y un metoxi (arriba), ambos de amina (medio) o ambos metoxi (abajo). También se observa una pequeña cantidad de ácido carboxílico, y se generaría a partir de la hidrólisis de un extremo del DMS.
- Fig. 11:** es un espectro de RMN de 1H (600 MHz) de cMAP que muestra resonancias del grupo metoxi y de grupos metíleno adyacentes a las funcionalidades del grupo terminal.
- 40 **Fig. 12:** muestra la relación entre el porcentaje de ARNip con relación de carga (encapsulado por cMAP, copolímero cMAP-PEG5k y polímero tribloque mPEG5k-cMAP-PEG5km) usando el ensayo RiboGreen.
- Fig. 13:** muestra el ensayo RiboGreen del copolímero cMAP-PEG que muestra la encapsulación de ARNip

mediante una relación de carga de 3 +/- para bloques de PEG de 3,4k y 5k.

Fig. 14: muestra el ensayo RiboGreen de tribloque mPEG-cMAP-PEGm que muestra la encapsulación de ARNip mediante una relación de carga de 3 +/- para bloques de PEG de 2k y 5k.

Fig. 15: muestra la dependencia del pH del ácido 5-nitrofenilborónico-PEGm que forma el éster de ácido borónico con dioles vecinales en cMAP a un pH fisiológico de alrededor de 7,4, pero que se disociará a pH ácido.

Figs. 16A y 16B: muestran representaciones esquemáticas de dos diagramas que muestran las diversas NP con ARNip formadas: cMAP (I, no estable y no inyectada), cMAP + 5-nPBA-PEGm (A), copolímero cMAP-PEG (B), copolímero cMAP-PEG + 5-nPBA-PEGm (C), tribloque mPEG-cMAP-PEGm (D) y tribloque mPEG-cMAP-PEGm + 5-nPBA-PEGm (E). (Nota: la ilustración no está representada a escala o estequiométría, y no refleja cómo se formulan las partículas; por ejemplo, en las formulaciones PEGiladas, el PEG se añade primero al polímero, antes de añadir el ARNip).

Fig. 17: muestra datos de estabilidad de la sal de NP de ARNip de cMAP. Sin PEG, la NP cMAP-ARNip fue inestable una vez en 1X PBS, pero fue estable durante 2 días cuando se utilizó 5-nPBA-PEGm para estabilizar la NP.

Fig. 18: muestra estabilidad de la sal de NP de ARNip tribloque puro de cMAP-PEG-cMAP sin 5-nPBA-PEGm añadido, la NP de ARNip de cMAP-PEG3.4k-cMAP formulada en una relación de carga 1 +/- se añade una vez a 1X PBS, pero es estable cuando se añade a la formulación al menos un 5-nPBA-PEGm por cada dos grupos diol (0,5 PEG) en cMAP.

Fig. 19: muestra la estabilidad de la sal de NP de ARNip de tribloque puro de cMAP-PEG-cMAP. Sin 5-nPBA-PEGm añadido, la NP de ARNip de cMAP-PEG3.4k-cMAP formulada en una relación de carga de 3 +/- se añade una vez en 1X PBS, pero es estable cuando se añade a la formulación al menos un 5-nPBA-PEGm por cada dos grupos diol (0,5 PEG) en cMAP.

Fig. 20: muestra la estabilidad de la sal de NP de ARNip de tribloque puro de cMAP-PEG-cMAP. Sin 5-nPBA-PEGm añadido, la NP de ARNip de cMAP-PEG5k-cMAP formulada con una relación de carga 1 +/- se añade una vez en 1X PBS, pero es estable cuando se añade a la formulación al menos un 5-nPBA-PEGm por cada dos grupos diol (0,5 PEG) en cMAP.

Fig. 21: muestra imágenes de crioTEM de formulaciones de NP: cMAP + 5-nPBA-PEG5km (A), copolímero cMAP-PEG5k (B), Copolímero cMAP-PEG5k + 5-nPBA-PEG5km (C), mPEG5k-cMAP-PEG5km (D), y mPEG5k-cMAP-PEG5km + 5-nPBA-PEG5km (E).

Fig. 22 (A-E): muestra las distribuciones de tamaño de nanopartículas por DLS: distribución de tamaño logarítmica (lognormal) por DLS para la NP cMAP + 5-nPBA-PEGm (Fig. 22 (A)); para la NP de copolímero cMAP-PEG (Fig. 22 (B)); para la NP de copolímero cMAP-PEG + 5-nPBA-PEGm (Fig. 22 (C)); para la NP de mPEG-cMAP-PEGm (Fig. 22 (D)); y para la NP de mPEG-cMAP-PEGm + 5-nPBA-PEGm (Fig. 22 (E)).

Fig. 23 (A-E): muestra la distribución de tamaño por CrioTEM para NP de cMAP + 5-nPBA-PEGm NP (Fig. 23 (A)); para NP de copolímero cMAP-PEG (Fig. 23 (B)); para NP de copolímero cMAP-PEG + 5-nPBA-PEGm (Fig. 23 (C)); para NP de mPEG-cMAP-PEGm (Fig. 23 (D)); y para NP de mPEG-cMAP-PEGm + 5-nPBA-PEGm (Fig. 23 (E)).

Fig. 24 (A-C): muestra la PK de las NP de ARNip formuladas en comparación con ARNip solo. Fig. 24A muestra una comparación de ARNip solo con CALAA-01, el sistema CDP con AD₂-PEG para estabilización y cMAP + 5-nPBA-PEGm que muestra mayor estabilidad que CDP con AD₂-PEG y CALAA-01. Fig. 24B muestra una comparación de cMAP + 5-nPBA-PEGm con las formulaciones de copolímero y tribloque. Fig. 24C muestra una comparación de cMAP + 5-nPBA-PEGm con la formulación tribloque con el exceso de componentes filtrados. n = 3 ratones.

Fig. 25: muestra que los datos de tiempo en circulación de la NP de ARNip de mPEG-cMAP-PEGm son similares en ratones Balb/c y en ratones nude. n = 3 ratones. Fracción de Cy3-ARNip que permanece en suero en función del tiempo (hasta 60 min).

45 Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

La presente descripción está dirigida a sistemas de administración que superan algunos de los inconvenientes de la técnica anterior.

Los presentes inventores han investigado el origen del tiempo en circulación corto al que se hace referencia en otra parte de este documento y han demostrado que el CALAA-01 se desmorona en la membrana basal glomerular (GBM) del riñón. Los presentes inventores especularon que este mecanismo de eliminación puede afectar a cualquier formulación de NP que se ensamblen principalmente a través de interacciones electrostáticas entre componentes de administración catiónicos y ácidos nucleicos aniónicos. Otros sistemas de administración de ARNip que utilizan polímeros catiónicos o lípidos han mostrado tiempos en circulación cortos similares y una eliminación renal similar.

Varios de los sistemas poliméricos y liposomales actuales que se utilizan para administrar ARNip *in vivo* contienen un exceso de componentes catiónicos en sus formulaciones (las proporciones de carga positiva a negativa suelen ser superiores a 1), además de una gran cantidad de material, por ejemplo, polí(etilenglicol) (PEG), utilizado para estabilizar estéricamente las NP formadas. El exceso de componentes catiónicos puede tener efectos secundarios no deseados *in vivo*, provocando reacciones adversas como una agregación plaquetaria, una activación del complemento y reacciones inflamatorias.

Sería ventajoso el desarrollo de un sistema polimérico para el suministro de ARNip que aumente el tiempo en circulación de las nanopartículas que contienen ARNip, y que disminuya la cantidad de componentes que no son ARNip dentro de la formulación. En el presente documento se describe una familia de polímeros catiónicos basados en ácido mágico (cMAP) para la administración de ARNip *in vivo*. Este sistema de administración polimérico tiene algunas características análogas al sistema CDP, ya que este último sistema ha funcionado en humanos. El polímero catiónico desarrollado aquí utiliza un azúcar más simple, exemplificado por el ácido mágico, en lugar de la ciclodextrina, y permite una estrategia alternativa para la funcionalización de la superficie. En lugar de la funcionalización de la superficie de las nanopartículas a través de la formación de complejos de inclusión (CDP) con adamantano (AD), el cMAP contiene dioles vecinales que son sitios de unión para los ácidos borónicos que se pueden usar para PEGilar y dirigir las nanopartículas basadas en cMAP. Las nanopartículas formadas con polímeros que contienen ácido mágico para la administración de fármacos de molécula pequeña han incorporado agentes dirigidos a través de este método de ensamblaje. El cMAP básico también se hizo reaccionar adicionalmente con PEG funcionalizado en copolímeros de bloques lineales. La reacción en los grupos terminales de cMAP con un ácido carboxílico-PEG di-activado o un ácido carboxílico-PEG-metoxi (PEGm) activado conduce a dos posibles copolímeros: un copolímero de cMAP-PEG o un polímero tribloque de mPEG-cMAP-PEGm. El copolímero cMAP-PEG puede ensamblarse con ARNip para formar bucles de PEG en la superficie para estabilizar la nanopartícula, mientras que el tribloque mPEG-cMAP-PEGm puede formar una configuración de cepillo de PEG en la superficie de la nanopartícula. Este último enfoque tribloque ha sido explorado previamente con CDP y ADN plásmido (ADNp), y dicho polímero tribloque no tenía la capacidad de encapsular el ADNp. Se ha demostrado que los polímeros que encapsulan ADNp pueden no ser buenos para condensar ARNip y viceversa. En el presente documento demostramos que el polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm es capaz de formar nanopartículas que contienen ARNip (que pueden tener aproximadamente el 30% en peso de ARNip en la formulación) con tiempos en circulación incrementados en ratones. Además, las nanopartículas se pueden ensamblar fácilmente directamente en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) sin 5-nPBA-PEGm adicional para estabilizar las NP.

La presente descripción puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción tomada en relación con las Figuras y Ejemplos adjuntos, todos los cuales forman parte de esta descripción.

En la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural, y la referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un material" es una referencia a al menos uno de dichos materiales y sus equivalentes conocidos por los especialistas en la técnica, y así sucesivamente.

Cuando un valor se expresa como una aproximación mediante el uso del descriptor "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. En general, el uso del término "aproximadamente" indica aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la materia descrita, y debe interpretarse en el contexto específico en el que se usa, en base a su función. El especialista en la técnica podrá interpretar esto como una cuestión rutinaria. En algunos casos, el número de cifras significativas utilizadas para un valor particular puede ser un método no limitativo para determinar el alcance de la palabra "aproximadamente". En otros casos, las gradaciones utilizadas en una serie de valores se pueden utilizar para determinar el rango previsto disponible para el término "aproximadamente" para cada valor. Donde están presentes, todos los rangos son inclusivos y combinables. Es decir, las referencias a valores indicados en rangos incluyen todos los valores dentro de ese rango.

Debe apreciarse que ciertas características de la descripción que, para mayor claridad, se describen en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Es decir, a menos que sea obviamente incompatible o quede específicamente excluida, se considera que cada realización individual puede combinarse con cualquier otra realización, y tal combinación se considera que es otra realización. A la inversa, varias características de la descripción que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación. Finalmente, aunque una realización puede describirse como parte de una serie de etapas o como parte de una estructura más general, cada una de dichas etapas también puede considerarse una realización independiente en sí misma, combinable con otras.

Los términos transitorios "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste" pretenden connotar sus significados generalmente aceptados en el lenguaje vernáculo de las patentes; es decir, (i) "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "que se caracteriza por" es inclusivo o de final abierto y no excluye elementos o etapas de método adicionales no citadas; (ii) "consistente en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en la reivindicación; y (iii) "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados "y aquellos que no afecten materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s)" de la invención reivindicada. Las realizaciones descritas en términos de la frase "que comprende"

(o sus equivalentes), también proporcionan, como realizaciones, aquellas que se describen independientemente en términos de "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". Para aquellas realizaciones proporcionadas en términos de "que consisten esencialmente en", la característica o características básicas y novedosas es la facilidad de operación de los métodos (y los sistemas usados en tales métodos y las composiciones derivadas de los mismos)

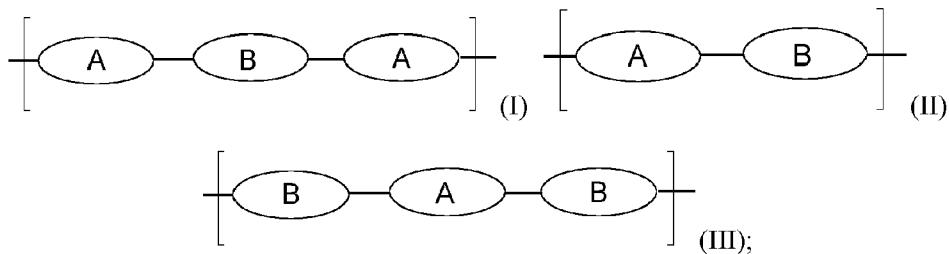
- 5 para preparar y usar los materiales inventivos, y los materiales mismos, donde los métodos y materiales son capaces de proporcionar las propiedades destacadas utilizando solo los elementos proporcionados en las reivindicaciones. Es decir, mientras que otros materiales también pueden estar presentes en las composiciones inventivas, la presencia de estos materiales adicionales no es necesaria para proporcionar los beneficios descritos de esas composiciones (es decir, los efectos pueden ser aditivos) y/o dichos materiales adicionales no comprometen el rendimiento de las 10 composiciones del producto. De manera similar, cuando también se pueden emplear etapas adicionales en los métodos, su presencia no es necesaria para lograr los efectos o beneficios descritos y/o no comprometen el efecto o beneficio declarado.

Cuando se presenta una lista, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que cada elemento individual de esa lista, y cada combinación de esa lista, es una realización separada. Por ejemplo, una lista de realizaciones 15 presentadas como "A, B o C" debe interpretarse como que incluye las realizaciones, "A", "B", "C", "A o B", "A o C", "B o C" o "A, B o C." Asimismo, un término como alquilo C₁₋₃ también incluye, como realizaciones separadas, alquilo C₁, alquilo C₂, alquilo C₃, alquilo C₁₋₂ y alquilo C₂₋₃.

A lo largo de esta especificación, las palabras deben tener su significado normal, como entenderán los especialistas 20 en la técnica relevante. Sin embargo, para evitar malentendidos, los significados de ciertos términos se definirán o aclararán específicamente.

La referencia a alcoholes, aldehídos, aminas, ácidos carboxílicos, cetonas u otros grupos funcionales reactivos de 25 manera similar también incluye sus análogos protegidos. Por ejemplo, la referencia a hidroxi o alcohol también incluye aquellos sustituyentes en los que el hidroxi está protegido por acetilo (Ac), benzoílo (Bz), bencilo (Bn, BnI), éter β -metoxietoximetílico (MEM), dimetoxitritilo, [bis-(4-metoxifenil)fenilmetil] (DMT), metoximetil éter (MOM), metoxitritilo [(4-metoxifenil)difenilmetilo, MMT], p-metoxibencil éter (PMB), metiltiometil éter, pivalóilo (Piv), tetrahidropiranilo (THP), 30 tetrahidrofurano (THF), tritilo (trifenilmetilo, Tr), éter de sililo (los más populares incluyen éteres de trimetilsililo (TMS), terc-butildimetilsililo (TBDMS), tri-isopropilsililoximetilo (TOM) y triisopropilsililo (TIPS)), éteres de etoxietilo (EE). La referencia a aminas también incluye aquellos sustituyentes en los que la amina está protegida por un BOC glicina, carbobenciloxi (Cbz), p-metoxibencilcarbonilo (Moz o MeOZ), terc-butiloxicarbonilo (BOC), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), acetilo (Ac), benzoílo (Bz), bencilo (Bn), carbamato, p-metoxibencilo (PMB), 3,4-dimetoxibencilo (DMPM), p-metoxifenilo (PMP), grupo tosilo (Ts) o grupo sulfonamida (Nosyl y Nps). La referencia al sustituyente que contiene un grupo carbonilo también incluye aquellos sustituyentes en los que el carbonilo está protegido por un grupo acetal o cetal, acilal o diatano. La referencia al sustituyente que contiene un ácido carboxílico o un grupo carboxilato también incluye aquellos sustituyentes en los que el ácido carboxílico o el grupo carboxilato está protegido por su éster metílico, éster bencílico, éster terc-butílico, un éster de fenol disustituido en 2,6 (por ejemplo, 2,6-dimetilfenol, 2,6-diisopropilfenol, 2,6-di-terc-butilfenol), un éster de sililo, un ortoéster o una oxazolina.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen polímeros que comprenden segmentos alternos cargados y no 35 cargados que comprenden una o más de las siguientes unidades estructurales de Fórmula (I) o Fórmula (II) o Fórmula (III):

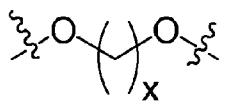


40 donde

A es un segmento no cargado que comprende polialquilenglicol;

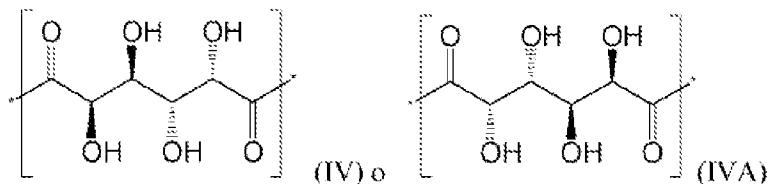
B es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un enlace polihidroxi que comprende al menos un par de dioles vecinales.

45 En los polímeros de la presente descripción, el término polialquilenglicol se refiere a cualquier polímero que contenga el enlace funcional:



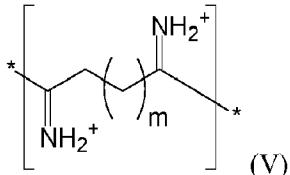
5 donde x está en un intervalo de 1 a aproximadamente 6, aunque práctica y preferiblemente es 2 o 3, preferiblemente 2 (a valores más altos de x, el polialquilenglicol muestra una mala hidrofilicidad). Por tanto, en realizaciones preferidas, A es o comprende un polietilenglicol y un grupo de enlace apropiado opcional (pero preferible), siendo el grupo de enlace necesario para unirse a los otros componentes del polímero general. Preferiblemente, en cada aparición, el polialquilenglicol, generalmente, y el polietilenglicol específicamente tienen un peso molecular promedio en número nominal (MW_n) en un intervalo de aproximadamente 500 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton. En realizaciones más específicas, los restos de polialquieno/polietilenglicol tienen valores de MW_n de aproximadamente 500 Da a 10 aproximadamente 1 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 5 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa, desde aproximadamente 30 kDa hasta aproximadamente 40 kDa, desde aproximadamente 40 kDa hasta aproximadamente 50 kDa, o cualquier combinación de dos o más de estos intervalos.

15 En algunas de estas realizaciones, B es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un enlace polihidroxi que comprende al menos un par de dioles vecinales. Se prefieren los enlaces polihidroxi azúcar o carbohidrato por su biocompatibilidad, aunque también se pueden emplear enlaces polihidroxi sintéticos quirales y aquirales (por ejemplo, ácido polihidroxi(met)acrílico). En determinadas realizaciones preferidas, el enlace polihidroxi comprende ácido mágico, en el que B comprende al menos una subunidad repetida que comprende una estructura de Fórmula (IV), presentada como (IV) o (IVA):

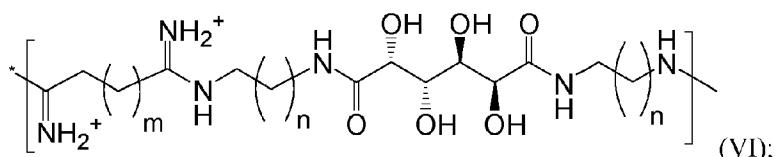


20 Estas estructuras son isómeros rotacionales entre sí y para los presentes propósitos son funcionalmente equivalentes. Tal como se usa en este documento, la representación de una de estas estructuras connota una o ambas de estas estructuras en el contexto de su uso.

En otras realizaciones, B comprende además al menos una subunidad repetida que comprende una estructura de Fórmula (V):



25 30 donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5. Dichos enlaces son grupos de enlace útiles tanto por su carácter catiónico como por su conveniencia de uso para enlazar los restos polihidroxi (por ejemplo, ácido mágico) con el polialquilenglicol. Cuando se combina con el enlace de ácido mágico descrito anteriormente, la combinación de enlaces (IV) y (V) presenta una subestructura que comprende al menos una subunidad repetida que comprende cMAP, cuya estructura de subunidad se representa como Fórmula (VI):

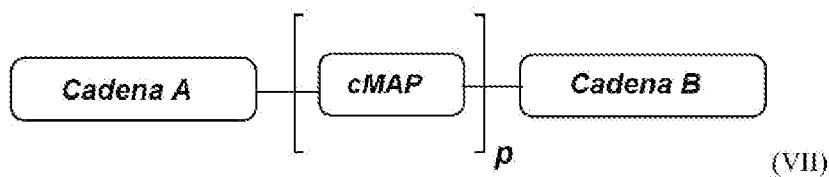


donde

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5; y

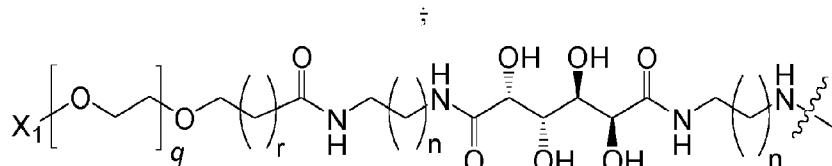
35 n es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4 o 5, preferiblemente 1. Téngase en cuenta que m y n no están necesariamente limitados a estos valores, y que también pueden considerarse valores más grandes para estas variables dentro del alcance de la presente descripción.

40 Con unidades básicas de construcción, es posible describir una gama de polímeros tribloque y di-bloque más específicos. De nuevo, las estructuras descritas a continuación se pueden preparar usando métodos descritos en los Ejemplos, usando homólogos de los reactivos descritos allí. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los polímeros de la presente descripción incluyen los descritos por una estructura de Fórmula (VII):

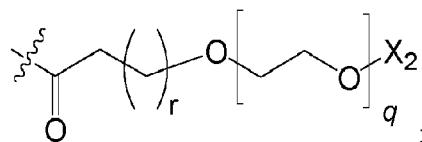


donde

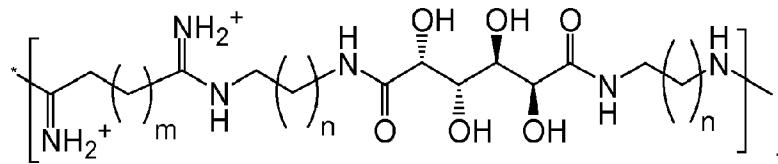
La cadena A es



5 La cadena B es



cMAP es



10 p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o incluso mayor), preferiblemente 4-6 o 5;

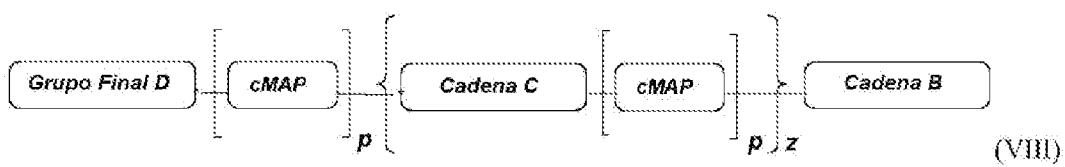
n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (o incluso más); y

X₁ y X₂ son independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

15 De nuevo, los valores de p y q pueden ser iguales o diferentes en cada caso e iguales o diferentes entre sí. Lo mismo es cierto para n y r; es decir, los valores de n y r pueden ser iguales o diferentes en cada aparición e iguales o diferentes entre sí. En ciertas realizaciones, cuando m es 5 y n es 1, los valores numéricos de p corresponden a un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que p está en un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75, de 75 a aproximadamente 100, o cualquier combinación de dos o más de estos intervalos. Los valores numéricos de q correspondientes a los rangos de MW_n citados incluyen aquellos que varían de aproximadamente 12 a aproximadamente 1200. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que q está en un rango de aproximadamente 12 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, de aproximadamente 400 a aproximadamente 800, de aproximadamente 800 a aproximadamente 1200, o cualquier combinación de dos o más de estos rangos. En realizaciones específicas, q también puede estar en un rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 500. En otros subconjuntos de esta realización, X₁ y X₂ son independientes en cada aparición -(CH₂)₁₋₄-COOH y/o -(CH₂)₁₋₄-NH₂.

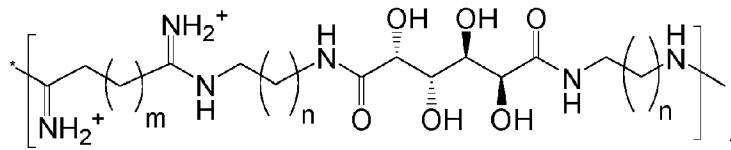
30 Dada la naturaleza de la Cadena A y la Cadena B, tales estructuras también pueden designarse como polímero tribloque PEG-cMAP-PEG.

En otras realizaciones, los polímeros de la presente descripción incluyen los descritos por una estructura de Fórmula (VIII):

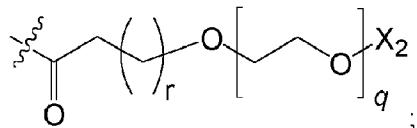


donde

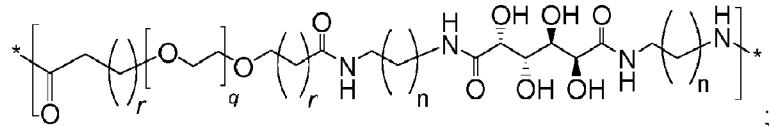
cMAP es



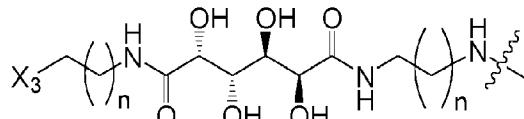
5 La cadena B es



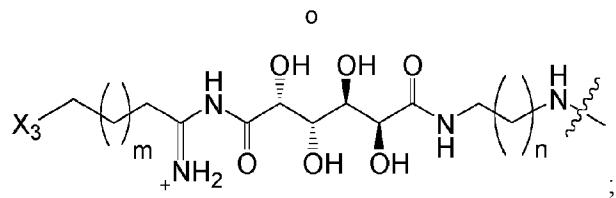
La cadena C es



El grupo final D es:



10



p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da;

15 m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5;

n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

z es igual o mayor que 1 (hasta aproximadamente 2, 4, 6, 8 o 10); y

X₂ es independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o versión protegida del mismo; y

20 X₃ es independientemente -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

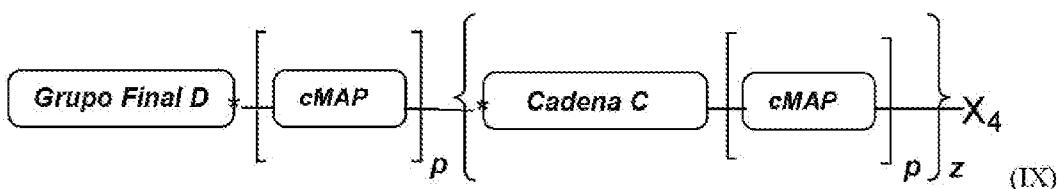
De nuevo, los valores de p y q pueden ser iguales o diferentes en cada caso e iguales o diferentes entre sí. Lo mismo es cierto para n y r; es decir, los valores de n y r pueden ser iguales o diferentes en cada aparición e iguales o diferentes entre sí. En ciertas realizaciones, cuando m es 5 y n es 1, los valores numéricos de p corresponden a un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que p está en un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50, de

aproximadamente 50 a aproximadamente 75, de 75 a aproximadamente 100, o cualquier combinación de dos o más de estos intervalos. Los valores numéricos de q correspondientes a los rangos de MW_n citados incluyen aquellos que varían de aproximadamente 12 a aproximadamente 1200. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que q está en un rango de aproximadamente 12 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, de aproximadamente 400 a aproximadamente 800, de aproximadamente 800 a aproximadamente 1200, o

- 5 cualquier combinación de dos o más de estos rangos. En realizaciones específicas, q también puede estar en un rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 500. En otros subconjuntos de esta realización, X_1 y X_2 son independientes en cada aparición $-(CH_2)_{1-4}-COOH$ y/o $-(CH_2)_{1-4}-NH_2$.

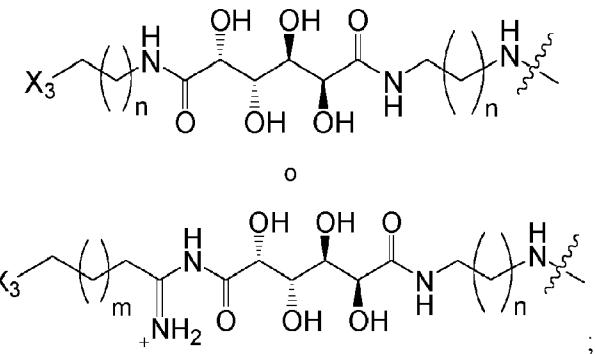
10 Dada la naturaleza de los diversos elementos de la cadena y del grupo terminal, tales estructuras también se pueden designar como un dibloque cMAP-PEG o un polímero dibloque PEG-cMAP.

En otras realizaciones adicionales, los polímeros de la presente descripción incluyen los descritos por una estructura de Fórmula (IX):

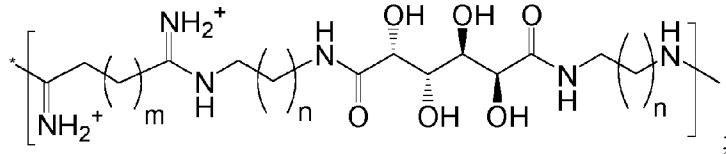


donde

- 15 El grupo final D es:

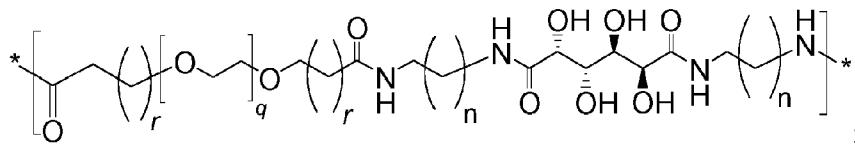


cMAP es



20

La cadena C es



p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 5000 Da;

25

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4-6 o 5;

n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

z es igual o mayor que 1 (hasta aproximadamente 2, 4, 6, 8 o 10); y

X₃ y X₄ son independientemente en cada aparición -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo),

-N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

De nuevo, los valores de p y q pueden ser iguales o diferentes en cada caso e iguales o diferentes entre sí. Lo mismo es cierto para n y r; es decir, los valores de n y r pueden ser iguales o diferentes en cada aparición e iguales o diferentes entre sí. En ciertas realizaciones, cuando m es 5 y n es 1, los valores numéricos de p corresponden a un rango de

5 aproximadamente 1 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que p está en un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75, de 75 a aproximadamente 100, o cualquier combinación de dos o más de estos intervalos. Los valores numéricos de q correspondientes a los rangos de MW_n citados incluyen aquellos que 10 varían de aproximadamente 12 a aproximadamente 1200. Las realizaciones específicas incluyen aquellas en las que 15 q está en un rango de aproximadamente 12 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, de aproximadamente 400 a aproximadamente 800, de aproximadamente 800 a aproximadamente 1200, o cualquier combinación de dos o más de estos rangos. En realizaciones específicas, q también puede estar en un rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 500.

15 15 Dada la naturaleza de los diversos elementos de la cadena y del grupo terminal, tales estructuras también pueden denominarse polímeros tribloque cMAP-PEG-cMAP.

En cada una de las estructuras presentadas, las realizaciones independientes específicas incluyen aquellas en las que m es independientemente 4, 5 o 6. En ciertas realizaciones, m es 5 en cada aparición.

20 20 En cada una de las estructuras presentadas, las realizaciones independientes específicas incluyen aquellas en las que n es 1.

En cada una de las estructuras presentadas, las realizaciones independientes específicas incluyen aquellas en las que r es independientemente 2, 3 o 4. En algunas de estas realizaciones, r es 3 en cada aparición.

25 25 En cada una de las estructuras presentadas, las realizaciones independientes específicas incluyen aquellas en las que p es suficiente para proporcionar un peso molecular promedio en número de la subunidad que comprende cMAP en un rango de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 6 kDa a aproximadamente 14 kDa, de 7 kDa a aproximadamente 13 kDa, de aproximadamente 8 kDa a aproximadamente 12 kDa, de 9 kDa a aproximadamente 11 kDa o aproximadamente 10 kDa. Cuando el fragmento cMAP tiene un MW de aproximadamente 420 Da, respectivamente, esto corresponde a valores numéricos de p en rangos de aproximadamente 12 a aproximadamente 36, de aproximadamente 14 a aproximadamente 33, de aproximadamente 17 a aproximadamente 31, de aproximadamente 19 a aproximadamente 29, de aproximadamente 22 a aproximadamente 26, o aproximadamente 24.

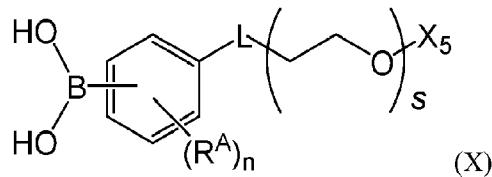
30 30 En cada una de las estructuras presentadas, las realizaciones independientes específicas incluyen aquellas en las que q es suficiente para proporcionar un peso molecular promedio en número de la subunidad que comprende PEG en un rango de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 40 kDa, de 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, o de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa. Cuando el resto de polialquilenglicol es polietilenglicol, y dado que el fragmento de etilenglicol tiene un MW de aproximadamente 44 Da, esto corresponde a valores numéricos de q en intervalos de aproximadamente 11 a aproximadamente 1200, de aproximadamente 23 a aproximadamente 910, de aproximadamente 110 a aproximadamente 680, o de aproximadamente 110 a aproximadamente 450.

40 40 Cada combinación de valores para m, n, p, q, r o z con cualquier definición apropiada de X₁, X₂, X₃, y/o X₄ aquí descrita representa una realización discreta, y cualquier combinación de estas realizaciones proporciona la definición de otra realización.

45 45 En los Ejemplos se proporcionan ejemplos de esquemas no limitantes para preparar los diversos polímeros descritos en el presente documento. Cada una de estas rutas sintéticas, así como las que usan homólogos de los reactivos específicamente descritos, se considera dentro del alcance de la presente descripción. Tal como se usa aquí, el término homólogo se refiere a un compuesto que se diferencia del ejemplo en uno o más grupos metileno. En un método, se puede preparar un polímero conectando al menos un segmento no cargado que comprende polialquilenglicol con al menos un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un enlace polihidroxi mediante el uso de al menos un grupo de enlace. En los casos en los que el segmento cargado catiónicamente es uno de los derivados de ácido mágico descritos anteriormente, este método comprende hacer reaccionar estequiométricamente dos polímeros de PEG con un polímero de ácido mágico, dos polímeros de ácido mágico con un polímero de PEG o un polímero de ácido mágico con un polímero de PEG, cada uno con grupos de enlace adecuados para formar el polímero dibloque o tribloque deseado. Tales reacciones de acoplamiento se pueden efectuar usando reacciones de condensación de ácido carboxílico/amina para formar enlaces amida tal como se describe en el presente documento.

50 50 La formación de nanopartículas de acuerdo con varias realizaciones de la presente descripción se puede analizar con técnicas y procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

Otras realizaciones adicionales de la presente descripción incluyen conjugados poliméricos de los polímeros que contienen cMAP/PEG descritos en el presente documento. Dichos conjugados poliméricos comprenden cualquiera de los polímeros que contienen cMAP/PEG y un segundo polímero que contiene ácido borónico que comprende una estructura de Fórmula (X)



donde

el polímero que contiene cMAP/PEG y el segundo polímero que contiene ácido borónico están conectados reversiblemente entre sí mediante un enlace de condensación de borato entre los restos de ácido borónico de fórmula (X) y al menos un par de dioles vecinales de enlaces polihidroxi de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII), (VIII) o (IX), estando X5 en el extremo distal de dicha conexión;

10 R^A es nitró (u otro grupo atractor de electrones);

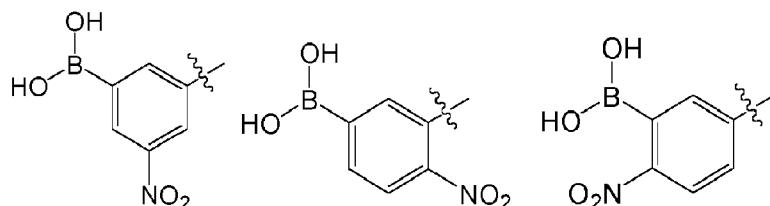
n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 1;

s es 20-1200;

L es un grupo de enlace entre el anillo de fenilo y el enlace de óxido de polietileno; y

15 X5 es alquilo C1-6, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH2, -NH(alquilo), -N(alquilo)2, o una sal o análogo protegido del mismo.

En algunas de estas realizaciones, n es 1. De estas realizaciones, las estructuras ejemplares incluyen:



20 En algunas realizaciones de los conjugados poliméricos, s está en un rango de 20 a aproximadamente 120, de aproximadamente 120 a aproximadamente 240, de aproximadamente 240 a aproximadamente 480, de aproximadamente 480 a aproximadamente 720, de aproximadamente 720 a aproximadamente 960, de aproximadamente 960 a aproximadamente 1200, o cualquier combinación de dos o más de dichos intervalos.

25 En otras realizaciones de los conjugados poliméricos, L es -(alquileno-C0-2)NH-C(=O)-(alquileno-C0-2)-, -(alquileno-C0-2)-C(=O)-NH-(alquileno-C0-2)-, -(alquileno-C0-2)-O-C(=O)-(alquileno-C0-2)- o -(alquileno-C0-2)-C(=O)-O-(alquileno-C0-2)-.

En subconjuntos de estos, L es -NH-C(=O)-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)- o -C(=O)-O-. Se pueden emplear grupos de enlace únicos o múltiples de L con cualquier polímero.

30 Hasta este punto, la descripción se ha descrito en términos de polímeros o conjugados poliméricos, pero los elementos importantes de la descripción incluyen nanopartículas derivadas de estos polímeros o conjugados poliméricos, y las definiciones proporcionadas para estos polímeros y conjugados poliméricos son igualmente útiles para describir las nanopartículas asociadas. Estas nanopartículas tienden a ser sustancialmente similares y, dependiendo del tamaño de los diversos fragmentos de cMAP o PEG, y/o de las longitudes de las cadenas asociadas con el polímero que contiene ácido borónico, tienen dimensiones de sección transversal (es decir, diámetros) en un rango de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 300 nm. Las realizaciones específicas también pueden describir que estas nanopartículas tienen diámetros en un rango de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 40 nm a 35 diámetros en un rango de aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 120 nm a aproximadamente 180 nm, desde aproximadamente 180 nm hasta aproximadamente 240 nm, desde aproximadamente 240 nm hasta aproximadamente 300 nm, o una combinación de dos o más de estos intervalos.

40 Asimismo, también se debe considerar que la referencia a una sola nanopartícula incluye realizaciones separadas que abarcan una población o pluralidad de nanopartículas. En ciertas realizaciones, la pluralidad de nanopartículas está sustancialmente monodispersa, con realizaciones independientes siempre que la desviación estándar en la dimensión de la sección transversal entre las nanopartículas sea menor del 20%, 30%, 40%, 50% o 60%, con respecto a la media, medida por microscopía electrónica de crio-transmisión (crio-TEM). Los tamaños y distribuciones de partículas pueden definirse mediante varios métodos, incluido el análisis de fotomicrografía crio-TEM. En este método, se analiza un

número predeterminado de partículas (más de 100) en micrografías electrónicas de crio-transmisión representativas (normalmente derivadas de más de 3 muestras líquidas seleccionadas al azar que se han congelado en etano líquido) midiendo los diámetros medios de las partículas, contando partículas dentro de un gradiente de fracción de tamaño predeterminado y correlacionando estadísticamente esos números. Véanse también los Ejemplos para obtener información adicional.

Estas nanopartículas (que comprenden uno o más de los polímeros o conjugados poliméricos de la invención) son especialmente atractivas por su capacidad para transportar "carga" biológica y, en determinadas realizaciones, estas nanopartículas comprenden además un agente biológico encapsulado. Estos agentes biológicos pueden estar unidos covalentemente o contenidos de otro modo dentro o por la nanopartícula. En determinadas realizaciones, un agente biológico es un polinucleótido o un agente terapéutico de molécula pequeña. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, productos farmacéuticos de molécula pequeña, antibióticos, esteroides,

polinucleótidos (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNip, ARNh, miARN, oligonucleótidos antisentido, virus y polinucleótidos químicos), plásmidos, péptidos, fragmentos de péptidos, moléculas pequeñas (por ejemplo, doxorrubicina), agentes quelantes (por ejemplo, deferoxamina (DESFERAL), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)),

productos naturales (por ejemplo, taxol, anfotericina) y otras macromoléculas biológicamente activas tales como, por ejemplo, proteínas y enzimas. Véase también la Patente de EE.UU. nº 6,048,736 que enumera los agentes activos (agentes terapéuticos) que pueden usarse como agentes terapéuticos con las nanopartículas descritas en el presente documento. Los agentes terapéuticos de molécula pequeña no solo pueden ser el agente terapéutico dentro de la

partícula compuesta sino que, en una realización adicional, pueden unirse covalentemente a un polímero del compuesto. En varias realizaciones, el enlace covalente es reversible (por ejemplo, a través de una forma de profármaco o enlace biodegradable tal como un disulfuro) y proporciona otra forma de administrar el agente terapéutico. En varias realizaciones, los agentes terapéuticos que se pueden administrar con las nanopartículas aquí

descritas incluyen agentes quimioterapéuticos tales como epotilonas, fármacos basados en camptotecina, taxol o un ácido nucleico como un plásmido, ARNip, ARNh, miARN, oligonucleótidos antisentido, aptámeros o su combinación, y fármacos adicionales que pueden ser identificados por un especialista tras leer la presente descripción.

En determinadas realizaciones preferidas, el agente biológico es un polinucleótido que es una molécula de ARN. En algunas de estas realizaciones, la molécula de ARN es una molécula de ARNip.

Sin pretender ceñirse a la exactitud de ninguna teoría en particular, parece que cuando se dispersan en medios acuosos, las nanopartículas se organizan presentando los enlaces hidrófilos hacia el entorno acuoso y manteniendo las especies catiónicas en una cavidad interna (ver, por ejemplo, las Figuras 16A y 16B). La masa cargada negativamente, incluidos los ácidos nucleicos, se asocia con las cargas positivas en las estructuras de cMAP, en algunos casos ayudando en el autoensamblaje de las nanopartículas.

Cuando las nanopartículas comprenden enlaces poliméricos que contienen ácido (nitro)borónico funcionalizado, las nanopartículas se pueden conjugar además con uno o más ligandos dirigidos. En tales casos, la conjugación se produce a través de un enlace de condensación entre el extremo distal del polímero que contiene ácido borónico y el ligando dirigido. En algunas realizaciones, este ligando dirigido comprende cualquiera de un anticuerpo, transferrina, un ligando para un receptor celular o una proteína receptora celular, un aptámero o un fragmento de un anticuerpo, transferrina, un ligando para un receptor celular o un proteína receptora celular. En realizaciones específicas, un solo tipo de ligando dirigido se conjuga con cada polímero o nanopartícula o poblaciones de nanopartículas. En otras

realizaciones, se conjugan múltiples tipos de ligandos dirigidos a cada polímero o nanopartícula o dentro de una población de nanopartículas. En otras realizaciones adicionales, una única entidad molecular del ligando dirigido se conjuga con cada nanopartícula individual. La capacidad de conjugar entidades moleculares individuales con nanopartículas individuales se describe en la Patente de EE.UU. nº 9,468,681. En otras realizaciones, se conjugan múltiples moléculas del ligando dirigido con cada nanopartícula individual.

Tal como se ha sugerido anteriormente, en ciertas realizaciones, los polímeros, polímeros conjugados y/o nanopartículas pueden existir como dispersiones en medios acuosos, conteniendo opcionalmente dichos medios acuosos también tampones, tensioactivos u otros modificadores. La presente descripción también contempla composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes biológicamente activos y cualquiera de los polímeros o conjugados poliméricos o nanopartículas, o la pluralidad de nanopartículas, descritas en el presente documento y un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "vehículo", tal como se usa en este documento, indica cualquiera de los diversos medios que actúan normalmente como disolventes, portadores, aglutinantes, excipientes o diluyentes para una nanopartícula comprendida en la composición como ingrediente activo.

El término "excipiente" tal como se usa en este documento indica una sustancia inactiva usada como vehículo para los ingredientes activos de un medicamento. Los excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas aquí descritas incluyen cualquier sustancia que mejore la capacidad del cuerpo de un individuo para absorber la nanopartícula. Los excipientes adecuados también incluyen cualquier sustancia que pueda usarse para aumentar las formulaciones con nanopartículas para permitir una dosificación conveniente y precisa. Además de su uso en la cantidad de dosis unitaria, los excipientes se pueden usar en el proceso de fabricación para ayudar en la manipulación de las nanopartículas. Dependiendo de la vía de administración y de la forma de medicación, se pueden usar diferentes excipientes. Los

ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, antiadherentes, aglutinantes, desintegrantes de revestimientos, rellenos, aromas (tales como edulcorantes) y colorantes, deslizantes, lubricantes, conservantes, sorbentes.

El término "diluyente", tal como se usa en este documento, indica un agente diluyente que se emite para diluir o transportar un ingrediente activo de una composición. Los diluyentes adecuados incluyen cualquier sustancia que pueda disminuir la viscosidad de una preparación medicinal.

La persona especialista en la técnica puede identificar detalles adicionales relacionados con la identificación del agente vehículo o del agente auxiliar adecuado de las composiciones, y en general con la fabricación y el envasado del kit, tras la lectura de la presente descripción.

Las composiciones que comprenden los agentes biológicamente activos y los polímeros, conjugados de polímeros y/o nanopartículas de la presente descripción, incluidas las composiciones farmacéuticas de los mismos, son útiles para tratar a pacientes que necesitan tratamiento, en particular debido a la biodisponibilidad mejorada originada por los polímeros, conjugados de polímeros y/o nanopartículas de la invención. El grado de mejora de la biodisponibilidad de dichas composiciones, en relación con la administración del mismo agente o agentes biológicamente activos, ya sea por sí mismo o con cMAP por sí mismo, fue sorprendentemente alto. Véanse los ejemplos.

15 Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se ha realizado un esfuerzo para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados C, la presión es igual o cercana a la atmosférica. Cualquier referencia al peso molecular, a menos que se indique lo contrario, pretende hacer referencia al peso molecular medio en número.

Resumen de resultados experimentales

Se sintetizó un nuevo polímero catiónico que posee unidades repetidas basadas en ácido múcido y suberimidato de dimetilo y se denominó cMAP. La modificación adicional de cMAP en un polímero tribloque con mPEG flanqueando cMAP, mPEG-cMAP-PEGm, dio como resultado un polímero bien definido con un peso molecular de aprox. 20 kDa. Este polímero tribloque fue capaz de encapsular completamente ARNip a relaciones de carga de 2 +/- o superiores. Las NP estables compuestas por este polímero tribloque y ARNip se pueden formular directamente en PBS con diámetros de aprox. 30 nm (tanto por DLS como por CrioTEM), y con una carga superficial ligeramente positiva de aprox. 0,4 mV tanto en tampón fosfato 10 mM pH 7,4 como en KCl 1 mM pH 5,5. Tras la inyección en ratones, estas NP formadas con el polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm mostraron una circulación prolongada en comparación con las NP formuladas con cMAP y copolímero cMAP-PEG, quedando un 5-10% de la formulación en circulación después de 1 hora. El tiempo en circulación permaneció igual cuando se eliminó de la formulación una porción del exceso de polímero tribloque. La ausencia de cualquier polímero catiónico en exceso es ventajosa para minimizar cualquier efecto adverso que estas entidades provoquen *in vivo*.

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

Se adquirieron ácido múcido y cloruro de oxalilo de Sigma-Aldrich, N-boc-etilendiamina de AK Scientific, suberimidato de dimetilo de Thermo Fisher Scientific o Sigma-Aldrich y ácido 3-carboxil-5-nitrofenil borónico de Alfa-Aesar. Los reactivos de polietilenglicol se adquirieron de Jenkem Technology USA o Laysan Bio, Inc. El suberimidato de dimetilo, el monómero cargado con el que se polimerizó la etilendiamina del ácido múcido, se utilizó tal cual se adquirió de Thermo Scientific o Sigma-Aldrich. Con el fin de asignar picos en los espectros de protones y carbono de cMAP, se adquirieron los espectros de RMN del suberimidato de dimetilo. Los espectros de RMN de protón y de carbono de DMS fueron más complejos de lo esperado, lo que sugiere que había algo de hidrólisis en una botella recién abierta. Véase la Tabla 2.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se adquirieron en instrumentos Varian de 300 MHz, 500 MHz o 600 MHz a 25 grados Celsius, sin giro, a 500 o 600 MHz. Para la mayoría de los espectros de protón ¹H, se utilizó un tiempo de retardo de 1-1,5 s; para la integración cuantitativa del polímero, se utilizó un retardo de 25 s. Los espectros de carbono ¹³C se adquirieron a 500 MHz con la configuración predeterminada. Se adquirieron espectros de coherencia cuántica única heteronuclear de ¹H-¹³C (HSQC), de espectroscopía de correlación ¹H-¹H (COSY), y de espectroscopía de correlación de enlaces múltiples heteronucleares de ¹H-¹³C (HMBC) utilizando los valores predeterminados de VNMRJ3.0 HSQCAD, COSY y HMBC. Además, se adquirieron espectros de espectroscopía ordenada por difusión (DOSY) utilizando el método de eco estimulado por pares de pulsos bipolares con compensación de convección (Dbppste_cc) en VNMRJ3.0 con una longitud de gradiente de difusión de 4,0 ms y un retardo de difusión de 100,0 ms para los polímeros sintetizados.

Se adquirieron las masas de ionización por electropulverización de moléculas pequeñas utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones Finnigan LCQ. Los espectros de masas por tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) para polímeros se adquirieron en un Voyager DE-PRO de Applied Biosystems utilizando una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico de 10 mg/mL.

Ejemplo 2. Síntesis de los polímeros que contienen ácido mágico.

Ejemplo 2.1. Síntesis de polímero de ácido mágico catiónico (cMAP) (Fig. 1). Se añadió metanol (360 mL) a ácido mágico (15 g, 71 mmol, 1 equiv.) en un matraz de fondo redondo de 500 mL que contenía una barra de agitación. Se añadió ácido sulfúrico concentrado (1,2 mL, 22,5 mmol, 0,3 equiv.) A esta suspensión, que luego se agitó durante la noche y se calentó a reflujo a 85°C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un embudo Buchner usando papel de filtro Whatman del nº 5. El sólido se lavó con 600 mL de metanol y luego se devolvió al matraz de fondo redondo de 500 mL. Se añadieron 240 mL de metanol y 1,5 mL de trietilamina y el sólido se recristalizó a reflujo a 85°C durante 1 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un embudo Buchner y se lavó con 600 mL de metanol. El sólido se secó al vacío a 75°C durante la noche para producir éster dimetílico de ácido mágico (13,72 g, rendimiento del 80%), un sólido blanco. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 4,91 (d, 2H), 4,80 (q, 2H), 4,29 (d, 2H), 3,76 (q, 2H), 3,62 (s, 6H).

Se añadió metanol (220 mL) a éster dimetílico de ácido mágico (13,72 g, 57,6 mmol, 1 equiv.) en un matraz de fondo redondo de 500 mL que contiene una barra de agitación. Se añadió trietilamina (20,9 mL, 150 mmol, 2,6 equiv.) Y la mezcla se agitó y se calentó a reflujo a 85°C durante 30 min, tiempo durante el cual se formó una suspensión amarilla. Se añadió a la suspensión N-boc-etilendiamina (23,7 mL, 150 mmol, 2,6 equiv.) en metanol (55 mL) y se reanudó la agitación y el reflujo a 85°C durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un embudo Buchner usando papel de filtro Whatman del nº 5. El sólido se lavó con metanol (750 mL) y se recristalizó con metanol (350 mL) a 85°C durante 1,5 h. La mezcla se enfrió de nuevo a temperatura ambiente, se filtró a través de un embudo Buchner y se lavó con metanol (750 mL). El sólido se secó a vacío a 75°C durante la noche para producir etilendiamina de ácido mágico protegida con N-boc (19,27 g, 68% de rendimiento), un sólido blanco. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 7,71 (t, 2H), 6,81 (t, 2H), 5,13 (d, 2H), 4,35 (q, 2H), 4,10 (d, 2H), 3,77 (q, 2H), 3,13 (m, 4H), 2,97 (m, 4H), 1,36 (s, 18H). ESI 495,1 [M+H] $^+$, 517,4 [M+Na] $^+$.

Se colocó etilendiamina de ácido mágico protegida con N-boc (19,2 g) en un matraz de fondo redondo de 500 mL con una barra de agitación en un baño de agua. Se añadió al matraz metanol (260 mL), seguido de ácido clorhídrico concentrado 12 N (65 mL) para preparar HCl 3 N en metanol. El matraz de reacción se selló con un septum y se ventiló con una aguja. El baño de agua se ajustó a 25°C y la suspensión se agitó durante 6-8 h. La reacción se controló mediante cromatografía en capa fina (TLC) con una fase móvil de metanol al 1% en CH_2Cl_2 y las manchas se visualizaron en un tanque de yodo. La finalización de la reacción también fue confirmada mediante ESI. La suspensión se filtró a través de una frita de vidrio de grano fino y se lavó con metanol (750 mL) hasta que el filtrado se acercó a un pH neutro. El sólido se secó a vacío a 80°C durante la noche para producir etilendiamina de ácido mágico (12,96 g, 91% de rendimiento) como un sólido blanco. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 7,97-7,83 (m, 8H), 5,30 (d, 2H), 4,55 (d, 2H), 4,16 (d, 2H), 3,82 (m, 2H), 2,85 (m, 4H). RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6): 174,79, 71,39, 70,98, 39,25, 36,76. ESI 295,1 [M+H] $^+$, 588,93 [2M+H] $^+$.

Se añadió etilendiamina de ácido mágico (100 mg, 0,3 mmol, 1 equiv.) a un vial de vidrio de 4 mL con una barra de agitación. Se añadió al vial una disolución de carbonato de sodio 0,5 M en agua nanopure (1 mL) y la disolución se agitó durante 5 min. A continuación, se añadió a la mezcla suberimidato de dimetilo (DMS) (74,4 mg, 0,3 mmol, 1 equiv.) y la reacción se agitó durante 16 h durante la noche a 25°C. La reacción se diluyó con agua nanopure (10 mL) y se añadió HCl 1 N gota a gota para ajustar el pH a 4. La disolución resultante se dializó con un filtro giratorio Amicon Ultra 3 kD de 15 mL contra agua nanopure hasta que el pH del filtrado fue neutro. La disolución de polímero se concentró a 3-4 mL, se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,2 μm en un vial de vidrio de 20 mL previamente pesado y se liofilizó hasta sequedad para proporcionar polímero de ácido mágico catiónico (29,2 mg, rendimiento del 16%) como un sólido blanco, que se almacenó en atmósfera de argón a -20°C. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,59-8,74, 7,92, 5,40, 4,53, 4,16, 3,82, 3,55, 3,26, 2,86-2,00, 1,60, 1,28. RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): 174,61, 168,12, 71,19, 70,96, 51,67, 42,09, 36,71, 32,48, 27,84, 26,65.

Ejemplo 2.2. Síntesis de copolímero cMAP-PEG (Fig. 2). Los materiales de partida se equilibraron a temperatura ambiente durante 1 h después de sacarlos del congelador a -20°C. Se pesaron cMAP (50 mg, 0,009 mmol, 2 equiv.) y di-SPA-PEG-3,5 kD (éster de ácido succinimidil propiónico, 15,7 mg, 0,0046 mmol, 1 equiv.) en un matraz de 10 mL secado en horno con barra de agitación. El matraz se tapó con un septum, los dos sólidos se secaron a vacío durante 1 hora y luego el matraz se llenó con argón. Se añadió DMSO anhídrido (2 mL) usando una aguja y una jeringa para disolver los dos sólidos blancos y la disolución se agitó durante 24 h. Se añadió agua nanopure (20 mL) para diluir el DMSO y la disolución se dializó frente a agua nanopure usando un filtro Amicon Ultra de MWCO de 10 kD > 8 veces. El retentato, copolímero de cMAP-PEG3.4k, se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,2 μm y se liofilizó hasta obtener un polvo blanco (29,6 mg, 45% de rendimiento). RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,84-8,48, 7,90, 5,41, 4,53, 4,15, 3,82, 3,55, 3,49 (PEG), 3,26, 2,86-2,00, 1,59, 1,27. RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): 174,66, 168,17, 71,24, 71,00, 70,24, 67,22, 51,69, 42,11, 36,75, 32,58, 27,89, 26,66. Se siguió un procedimiento similar usando di-SVA-PEG (éster de ácido succinimidilvalérico) de 5 kD para sintetizar el copolímero cMAP-PEG5k utilizando una membrana SpectraPor 7 MWCO de 15 kD (Spectrum Labs) para diáisisis.

El polímero tribloque cMAP-PEG-cMAP fue aislado del copolímero cMAP-PEG por fraccionamiento a través de filtros de rotación centrífuga de varios MWCO. El copolímero cMAP-PEG3.4k se dializó usando un filtro de centrifugación MWCO de 20 kD, y luego el filtrado se dializó a través de un filtro de centrifugación MWCO de 10 kD para aislar cMAP-PEG3.4K-cMAP, que se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,2 μm y se liofilizó hasta obtener un polvo

blanco (10,6 mg, rendimiento del 16%). El cMAP-PEG5k-cMAP se aisló de la misma forma.

Ejemplo 2.3. Síntesis de polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm (Fig. 3). Los materiales de partida se equilibraron a temperatura ambiente durante 1 h después de sacarlos del congelador a -20°C. Se pesó cMAP (40 mg, 0,006 mmol, 2 equiv.) y mPEG5k-SVA (85,7 mg, 0,017 mmol, 3 equiv.) en un matraz de 10 mL secado en horno con una barra de agitación. El matraz se tapó con un septum, los dos sólidos se secaron a vacío durante 1 hora y luego el matraz se llenó con argón. Se añadió DMSO anhídrico (4 mL) usando una aguja y una jeringa para disolver los dos sólidos blancos y la disolución se agitó durante 48 h. Se añadió agua nanopure (40 mL) para diluir el DMSO y la disolución se dializó frente a agua nanopure usando un filtro de centrifugación MWCO de 20 kD >8 veces. El retentato, mPEG5k-cMAP-PEG5km, se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,2 µm y se liofilizó hasta obtener un polvo blanco (11,3 mg, rendimiento del 9%). RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-d6): 9,84-8,48, 7,90, 5,41, 4,53, 4,15, 3,82, 3,55, 3,49 (PEG), 3,26, 3,20, 2,86-2,00, 1,59, 1,27.

Se siguió un procedimiento similar usando mPEG-SVA de 2 kD para sintetizar mPEG-cMAP-PEGm con bloques de 2 kD. Para el PEG de 2 kD, se usó un filtro de centrifugación MWCO de 10 kD para aislar el polímero tribloque.

Ejemplo 2.4. Síntesis de ácido 5-nitrofenilborónico-PEGm (5-nPBA-PEGm) (Figura 4).

15 Se añadió ácido 3-carboxil-5-nitrofenilborónico (200 mg, 0,95 mmol, 1 equiv.) a un matraz de fondo redondo de 10 mL de 2 bocas secado en horno que contenía una barra de agitación seca. El matraz se ventiló con argón y se selló con un septum de goma. Se añadió tetrahidrofurano anhídrico con inhibidor de BHT (5 mL) para disolver el ácido borónico, seguido de DMF anhidra (14,7 µL, 0,19 mmol, 0,2 equiv.). El matraz se enfrió a 0°C en un baño de agua con hielo. A continuación, se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (195,4 µL, 2,28 mmol, 2,4 equiv.) a la mezcla de reacción. El baño de agua con hielo se retiró después de que se completó la adición de cloruro de oxalilo, y la reacción continuó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, con un viento de argón para permitir el escape de los compuestos volátiles. El disolvente y la DMF se eliminaron mediante un evaporador rotatorio y luego a vacío durante 2 días en condiciones de oscuridad para proporcionar cloruro de 3-acilo de ácido 5-nitrofenil borónico (217,5 mg, rendimiento del 100%) como un sólido amarillo. Se añadió el cloruro de 3-acilo de ácido 5-nitrofenil borónico (27,5 mg, 0,12 mmol, 2 equiv.) a un matraz de fondo redondo de 25 mL secado en horno que contenía una barra de agitación seca. El matraz se selló con un septum de goma, se ventiló con argón y se enfrió a 0°C en un baño de agua con hielo. Se añadió diclorometano anhídrico (4 mL) para disolver el ácido borónico. Se añadió mPEG-amina de 5 kD (300 mg, 0,06 mmol, 1 equiv.) en un matraz de fondo redondo de 10 mL secado en horno ventilado con argón, disuelto en diclorometano anhídrico (5 mL) y diisopropiletilamina (DIPEA, 20,9 µL, 0,12 mmol, 2 equiv.) secados con tamiz molecular 20.

25 activado, lentamente a la disolución de ácido borónico. El matraz de reacción se dejó en el baño de agua con hielo para que se calentara lentamente hasta temperatura ambiente y la reacción se agitó durante la noche en condiciones de oscuridad. El disolvente y la DIPEA se eliminaron mediante un evaporador rotatorio y luego a vacío durante 2 días en condiciones de oscuridad. El residuo sólido se reconstituyó en HCl 0,5 N (5 mL) y se agitó durante 15 min. La suspensión resultante se filtró a través de un filtro de jeringa Supor de 0,2 µm, y la disolución transparente resultante 30 se dializó con un filtro giratorio Amicon Ultra 3 KD de 15 mL contra agua nanopure hasta que el pH fue constante. La disolución de polímero se concentró a 3-4 mL, se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,2 µm en un vial de vidrio de 20 mL previamente pesado y se liofilizó hasta sequedad para proporcionar ácido 5-nitrofenilborónico-PEGm (219,2 mg, rendimiento del 70%) como un sólido blanco esponjoso. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-d6): 8,89 (t, 1H), 8,72 (m, 1H), 8,68 (m, 1H), 8,64 (m, 1H), 8,60 (s, 2H), 3,5 (s - PEG, 510H), 3,22 (s, 3H)). RMN de ¹¹B (160 MHz, 35 40 tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 en D₂O): 11,26 (s ancho). MALDI: 5825,5.

Ejemplo 3. Caracterización de polímeros

Ejemplo 3.1. Cromatografía de permeación en gel. Se conectó un HPLC Agilent 1100 con bomba binaria e inyector a una columna de exclusión por tamaño Tosoh TSKgel G3000PWXL-CP con detección por dispersión de luz Wyatt DAWN HELEOS y por índice de refracción Wyatt Optilab Rex. El polímero liofilizado se disolvió a seis concentraciones 45 diferentes en NaNO₃ 0,1 M y se inyectó en el detector de índice de refracción directamente a través de una bomba de jeringa para determinación *dn/dc*. Para la determinación del peso molecular absoluto por dispersión de luz, se inyectaron 100 µL de disolución de polímero en la columna y se analizó el pico de polímero detectado usando el software ASTRA V.

Ejemplo 3.2. Ensayo TNBSA de cMAP para aminas primarias. Se siguieron las instrucciones proporcionadas por 50 Thermo Scientific usando ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico al 5% p/v en disolución madre de metanol, con las modificaciones que se describen a continuación. Brevemente, el cMAP y la glicina se disolvieron cada uno en el tampón de reacción y se diluyeron en serie para un intervalo de concentración de 2 a 0,0039 mg/mL y de 20 a 0,00195 mg/mL, respectivamente. Se añadieron 100 µL de cada concentración de muestra y 50 µL de disolución de trabajo de TNBSA a una placa de 96 pocillos por triplicado y se agitó brevemente. La absorbancia se leyó en un lector de placas 55 TECAN infinite M200 a una longitud de onda de 335 nm, se incubó a 37 grados Celsius durante 2 h y se leyó de nuevo. Se utilizó glicina como control positivo.

Ejemplo 3.3. Ensayos de encapsulación de ARNip en polímero. La capacidad de los polímeros cMAP para encapsular ARNip se analizó usando dos métodos: un ensayo de retardo en gel y un ensayo RiboGreen. Para el ensayo de retardo en gel, se mezclaron volúmenes crecientes de 0,5 mg/mL de polímero con 1 µL de ARNip de 1

mg/mL a relaciones de carga (+/-) de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 y 5 en agua para un volumen total de 15 μ L. Las mezclas se agitaron brevemente, se centrifugaron y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 3 μ L de colorante de carga de ADN 6X a cada mezcla, que luego se cargó en un gel de agarosa al 1% en peso y se corrió a 95 V durante 1,5 h en tampón TBE 0,5x. Se obtuvieron imágenes del gel en un sistema de obtención de imágenes UVP BioDoc-It.

El ensayo RiboGreen se realizó de manera similar al ensayo de retardo en gel, excepto que se utilizaron volúmenes crecientes de polímero a 0,1 mg/mL y 1 μ L de ARNip a 0,1 mg/mL en agua para un volumen total de 100 μ L en una placa de 96 pocillos. A cada una de estas mezclas se le añadió 100 μ L de la disolución de trabajo del reactivo de ARN Quant-iT RiboGreen, preparada según el protocolo del kit. La placa se agitó brevemente, se incubó en condiciones de oscuridad durante 5 min a temperatura ambiente y se leyó la intensidad de la fluorescencia en un lector de placas Tecan infinite M200 a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Ejemplo 4. Formulación y caracterización de las nanopartículas.

Ejemplo 4.1. Formulación de las nanopartículas. Las NP de cMAP se formularon mezclando primero una relación molar 1:1 de dioles vecinales de cMAP a 5-nPBA-PEGm (1 mg de cMAP para 22 mg de 5-nPBA-mPEG) en tampón fosfato 10 mM pH 7,4, agitando brevemente, centrifugando, y dejar reposar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió ARNip en un volumen equivalente de agua libre de ARNasa a una relación de carga de 3:1 de cMAP a ARNip, y a una concentración de hasta 0,8 mg/mL de ARNip. Las formulaciones de copolímero cMAP-PEG, de tribloque cMAP-PEG-cMAP y de tribloque mPEG-cMAP-PEGm se hicieron de una manera similar, aunque la relación de carga se varió desde 3:1 hasta una relación de carga 1:1 de polímero a ARNip, y a una concentración de hasta 1 mg/mL de ARNip. Para las formulaciones sin 5-nPBA-PEGm, el polímero y el ARNip en volúmenes iguales se mezclaron simplemente en una proporción de carga apropiada. Para la inyección en ratones, se añadieron 0,1 volúmenes de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 10X para obtener una disolución de PBS 1X, con una concentración final de 0,73 mg/mL de ARNip. Para el copolímero de cMAP-PEG y las NP de mPEG-cMAP-PEGm que se formularon en PBS, tanto el polímero como las disoluciones de ARNip estaban en PBS, y luego se mezclaron; esto pudo inyectarse directamente en ratones. Para eliminar el exceso de componentes (es decir, polímero, PEG), la formulación de NP se colocó en un filtro de centrifugación Amicon Ultra MWCO de 0,5 mL de 30 kD y se dializó con PBS a 2000 rpm durante 10 min 5-10 veces.

Ejemplo 4.2. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas. El tamaño de las NP se determinó utilizando dos métodos diferentes: dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de crio-transmisión (CrioTEM). La DLS se realizó en un Zeta-PALS de Brookhaven Instruments Corporation (BIC) con el software BIC Particle Sizing Software. Las partículas se diluyeron hasta una concentración de 0,2 mg/mL de ARNip o menos, dependiendo de la formulación, hasta que se registró un tamaño estable para diez mediciones de 1 minuto. Se promediaron los resultados de al menos 10 mediciones.

Se obtuvieron imágenes de CrioTEM de las partículas en disolución que se congelaron en rejillas R2/2 Quantifoil en etano líquido después de secar con papel de filtro utilizando un Vitrobot FEI Mark IV con un tiempo de transferencia de 2 s (fuerza de transferencia 6) y un tiempo de drenaje de 1 s. Las imágenes se recogieron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai de 120 keV equipado con una cámara CCD Gatan 2k x 2k UltraScan y software automatizado Serial EM. Las imágenes adquiridas se analizaron utilizando el software ImageJ para medir el diámetro de las NP.

La carga superficial de las NP, o potencial zeta, se midió utilizando el mismo Zeta-PALS utilizado para la DLS, con la adición de un conjunto de electrodo acuoso Brookhaven. Se mezclaron 10 μ L de formulación de partículas con 1,5 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 o cloruro potásico 1 mM, pH 5,5 en una cubeta. El electrodo se insertó en la cubeta y se midió el potencial zeta usando el software BIC PALS Zeta Potential Analyzer con un objetivo residual de 0,012. Se promediaron los resultados de al menos 10 mediciones.

Ejemplo 4.3. Estequiometría de las nanopartículas.

Ejemplo 4.3.1. Cuantificación de 5-nPBA-PEGm unido a las NP. Las NP se formularon con 5-nPBA-PEGm y los componentes en exceso se eliminaron como se ha descrito anteriormente. Se inyectaron 50 μ L de filtrado del filtro de centrifugación MWCO de 30 kD (que contenía componentes en exceso) en un HPLC Agilent 1200 con bomba cuaternaria y muestreador automático conectado a una columna de fase inversa Phenomenex Gemini C18 y detector de longitud de onda múltiple. Se registró la absorbancia a 254 nm y se comparó con una curva de calibración de 5-nPBA-PEGm.

Ejemplo 4.3.2. Cuantificación de polímero catiónico unido a las NP. Las NP se formularon en ausencia de 5-nPBA-PEGm. Para cMAP, se eliminó el exceso de polímero catiónico de las NP agregadas como se ha descrito anteriormente. El polímero catiónico unido a las NP se cuantificó directamente tomando el retentato del filtro de centrifugación MWCO de 30 kD que contenía las NP, y desmontando y secuestrando el ARNip con perlas magnéticas BcMag™ SAX (Strong Anion Exchange) (Bioclone Inc). Se inyectaron 50 μ L del líquido que contenía cMAP en la configuración de GPC descrita anteriormente y se determinó la cantidad de polímero unido a las NP directamente usando la señal del índice de refracción en comparación con una curva de calibración de cMAP. Para el copolímero

de cMAP-PEG y mPEG-cMAP-PEGm, se inyectaron 50 μ L de la formulación en la configuración de GPC descrita anteriormente. Se registró la señal del índice de refracción correspondiente al polímero no unido a las NP y se comparó con una curva de calibración del mismo polímero catiónico. Esta cantidad se restó de la cantidad total de polímero usado para la formulación para determinar el porcentaje de polímero unido a las NP.

5 **Ejemplo 5. Estudios farmacocinéticos (PK) *in vivo* en ratones.**

Todos los estudios en animales fueron aprobados por el "Institutional Animal Care and Use Committee" de Caltech. Las NP se formularon como se ha descrito anteriormente, excepto que el 20% del ARNip se sustituyó por un ARNip marcado con fluoróforo Cy3. La formulación de NP se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola del ratón en una dosis de 5 mg de ARNip por kg de ratón. Se afeitaron las patas traseras de ratones Balb/c (Taconic y Jackson Labs) para la extracción de sangre de la vena safena en un activador de coagulación de la parte superior roja que contenía tubos capilares Sarstedt Microvette CB300. La sangre se recogió a varios tiempos, comenzando a los 2 minutos después de la inyección de las NP, con hasta seis muestras por ratón. Los tubos se centrifugaron a 14.000xg durante 15 min a 4°C y el suero de la parte superior del tubo se utilizó para el análisis de fluorescencia de Cy3, con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 570 nm, en comparación con una curva estándar de la formulación de NP en suero de ratón. La fracción de Cy3-ARNip que queda en el suero se calculó usando el volumen de suero referido al peso del ratón y la cantidad de formulación inyectada. Los puntos de datos son de 3 ratones por formulación.

10 **Ejemplo 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

15 **Ejemplo 6.1. Síntesis de cMAP, caracterización por RMN y determinación de grupos terminales.** Se sintetizó un polímero de ácido mágico catiónico (cMAP) utilizando la serie de reacciones ilustradas esquemáticamente en la Fig. 1. Se caracterizaron completamente el ácido mágico y los productos de reacción intermedios que conducen a la preparación de etilendiamina del ácido mágico. (Tabla 1).

Tabla 1. Asignaciones de señales de RMN para etilendiamina de ácido mágico (ver Fig. 6)

	^1H en D_2O Desplazamiento químico (ppm)	^1H en DMSO-d_6 Desplazamiento químico (ppm)	^{13}C en DMSO-d_6 Desplazamiento químico (ppm)
Metileno A	3,04	2,85	36,76
Metileno B	3,45	No observado	39,25
Metina A	3,9	3,82	70,98
Metina B	4,32	4,15	71,39
Hidroxilo A	No observado	4,55	N/A
Hidroxilo B	No observado	5,30	N/A
Amida y aminas	No observado	7,83, 7,97	N/A
Carbono de carbonilo de amida	N/A	N/A	174,78

25 La reacción de condensación entre etilendiamina de ácido mágico y suberimidato de dimetilo (DMS) produjo el material cMAP. Debido a que el DMS puede hidrolizarse en condiciones como las utilizadas para la polimerización, se investigó la vía de reacción para esta reacción y los productos formados.(Tabla 2).

Tabla 2: Asignaciones de señales de RMN de ^1H para el suberimidato de dimetilo con diversos grados de hidrólisis (ver Figs. 6-8)

	Metoxi	Metileno A	Metileno B	Metileno C
Suberimidato de dimetilo (Fig. 6)	4,08	2,64	1,60	1,30
Suberimidato de dimetilo hidrolizado a éster dimetílico (Fig. 7)	3,55	2,25	1,45	1,20
Suberimidato de dimetilo hidrolizado a carboxilato (Fig. 8)	Ninguno	2,01	1,46	1,20

La presencia de suberimidato de dimetilo que contiene un grupo metoxi hidrolizado completamente a un grupo carboxilato, se confirmó adicionalmente con el pico del espectro de masas ESI a m/z de 187,9 y con el espectro de RMN de HMBC ^1H - ^{13}C . La señal del metileno A en este caso estaba presente en RMN de ^1H con un desplazamiento químico de 2,01 ppm.

Esta información ayudó en la caracterización del producto cMAP.

El análisis de RMN de cMAP (incluido los datos de RMN de HSQC ^1H - ^{13}C , de RMN de COSY ^1H - ^1H , y de RMN de HMBC ^1H - ^{13}C (Tablas 3-4)) permitió la asignación de todas las resonancias a los diversos entornos de carbono e hidrógeno del polímero. Fue importante la identificación de la composición del grupo terminal de cMAP, ya que éstas 5 funcionalidades se utilizan en reacciones posteriores con PEG funcionalizado para formar copolímeros de cMAP-PEG o polímeros tribloque de mPEG-cMAP-PEGm.

Tabla 3: Asignaciones de señales de RMN de ^1H correspondientes a cMAP; ver Fig. 9

	Monómero de origen	^1H en DMSO Desplazamiento químico (ppm)
Amidina	Ácido mónico y suberimidato de dimetilo	9,65
Amidina	Ácido mónico y suberimidato de dimetilo	9,28
Amidina	Ácido mónico y suberimidato de dimetilo	8,78
Amida	Ácido mónico y suberimidato de dimetilo	7,92
Hidroxilo B	Ácido mónico	5,42
Hidroxilo A	Ácido mónico	4,56
Metina B	Ácido mónico	4,18
Metina A	Ácido mónico	3,84
Metoxi (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	3,58
Metileno B	Ácido mónico	3,40
Metileno A	Ácido mónico	3,29
Metileno A (grupo final)	Ácido mónico	2,87
Metileno A	Suberimidato de dimetilo	2,42
Metileno A (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	2,30
Metileno A (grupo final)	Suberimidato de dimetilo: hidrolizado a carboxilato	2,03
Metileno B	Suberimidato de dimetilo	1,63
Metileno B (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	1,52
Metileno C	Suberimidato de dimetilo	1,30

Tabla 4: Asignaciones de señales de RMN de ^{13}C para cMAP; ver Fig. 9.

	Monómero de origen	^{13}C en DMSO Desplazamiento químico (ppm)
Carbonilo de amida	Ácido mónico	174,29
Metoxi de carbonilo (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	173,47
Carbonilo de amida (grupo final)	Ácido mónico	171,03
Carbonilo de amidina	Suberimidato de dimetilo	167,79, 166,82
Metina B	Ácido mónico	70,83
Metina A	Ácido mónico	70,61
Metoxi (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	51,31
Metileno A	Ácido mónico	41,73
Metileno B	Ácido mónico	36,37
Metileno A	Suberimidato de dimetilo	32,15
Metileno C	Suberimidato de dimetilo	27,48

Metileno B	Suberimidato de dimetilo	26,31
Metileno A (grupo final)	Suberimidato de dimetilo: hidrolizado a carboxilato	35,06
Metileno A (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	33,22
Metileno B (grupo final)	Suberimidato de dimetilo	24,23

Los grupos terminales cMAP incluyen el metoxi de un metoxi éster, amina y pequeñas cantidades de ácido carboxílico (Fig. 10). El análisis de RMN de ^1H de cMAP muestra la presencia de un pico metoxi característico y estrecho a 3,55 ppm (Fig. 11), y esta asignación está respaldada por las mediciones de RMN de HSQC ^1H - ^{13}C (no mostradas). El grupo metoxi se origina por la pérdida de amoniaco del grupo imidato del DMS por hidrólisis (Tabla 2, Figs. 6-8), y se ha sido reportado previamente. El grupo metileno adyacente al metoxi se puede observar como un triplete a 2,25 ppm en el espectro de RMN de ^1H (Fig. 11). El grupo terminal de amina que se origina a partir de la etilendiamina de ácido mágico no se puede observar directamente mediante RMN de ^1H . Sin embargo, el análisis del espectro de RMN del monómero y del espectro de RMN de HMBC de cMAP permitió realizar la asignación del triplete a 2,85 ppm a un grupo metileno adyacente al grupo funcional amina. Además, un ensayo de TNBSA para aminas primarias resultó positivo, lo que confirma que el cMAP tiene una amina primaria terminal como grupo terminal. Por último, había una pequeña cantidad de ácido carboxílico como grupo final procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, o como una impureza en el DMS de partida. El grupo metileno adyacente al ácido carboxílico se observa como un pequeño triplete a 2,00 ppm en el espectro de RMN de ^1H (Fig. 11). Las proporciones de estos grupos terminales en un lote de cMAP se pueden determinar comparando las integraciones de los tripletes en 2,85 (amina), 2,25 (metoxi) y 2,00 (carboxilato) ppm, y se muestran para 8 lotes en Tabla 5. Los valores medios para el % de amina, el % de metoxi y el % de carboxilato son 49%, 42% y 9%, respectivamente.

Tabla 5: Relaciones de grupos terminales de amina: metoxi: carboxilato en 8 lotes de cMAP comparando las integraciones de RMN.

Lote	% de amina	% de metoxi	% de carboxilato
11	52,52	33,96	13,52
12	38,45	54,15	7,40
13	48,58	45,89	5,53
14	47,07	45,71	7,22
15	47,75	51,17	1,08
16	55,58	37,14	7,28
17	63,22	29,92	6,86
18	38,76	39,50	21,75
Promedio	48,99 \pm 2,93	42,18 \pm 2,99	6,22 \pm 2,20

Ejemplo 6.1. Copolímero cMAP-PEG y tribloque de mPEG-cMAP-PEGm. Se hizo reaccionar cMAP con grupos terminales de ácido carboxílico activado en PEG, tales como éster de ácido succinimidil propiónico (SPA) o éster de ácido succinimidilvalérico (SVA). El cMAP reaccionó con los copolímeros generados por di-SPA-PEG o mPEG-SVA o con los polímeros tribloque, respectivamente, con longitudes de PEG de 2, 3,4 o 5 kD.

Debido a que existe una cantidad significativa de cadenas de polímero terminadas en diamina en la mezcla de cMAP, la reacción con di-SPA-PEG (Fig. 2) dio como resultado copolímeros cMAP-PEG con distribuciones de tamaño amplias (los copolímeros variaron desde un copolímero dibloque cMAP-PEG apenas un poco más grande que 10 kD, hasta un polímero tribloque cMAP-PEG-cMAP terminado por un éster metílico o ácido carboxílico en los cMAP, hasta un polímero largo de más de 100 kD; las distribuciones de tamaño mostradas en las Tablas 6-7 son de los rendimientos de polímero obtenidos al fraccionar el polímero sin purificar a través de filtros de centrifugación de corte de peso molecular secuencialmente más pequeño).

Tabla 6: Masa retenida en cada filtro MWCO después de fraccionar el copolímero crudo cMAP-PEG3.4k.

MWCO (kD)	Masa (mg)	Comentario
100	9,5	Copolímero cMAP-PEG de alto peso molecular
50	3,4	Copolímero cMAP-PEG de alto peso molecular
30	5	Copolímero cMAP-PEG de alto peso molecular

20	12,3	
10	10,6	Tribloque cMAP-PEG-cMAP puro
3	13,2	cMAP sin reaccionar, exceso de PEG
Total	54	

Se inició una reacción con 50 mg de cMAP y 16,5 mg de di-SPA-PEG3.4k. Después de agitar durante 24 horas, la reacción se diluyó en agua y se filtró a través de filtros de centrifugación Amicon de corte de peso molecular (MWCO) secuencialmente más pequeño. Se produce algo de pérdida de material en la membrana del filtro y durante los pasos de transferencia, pero se muestra el material retenido en cada uno de estos filtros después de la liofilización hasta sequedad. Se forma una cantidad significativa de copolímero cMAP-PEG3.4k de alto peso molecular en la síntesis debido a la presencia de grupos terminales diamina en cMAP.

Tabla 7: Masa retenida en cada filtro de MWCO después de fraccionar el copolímero de cMAP-PEG5k sin purificar.

MWCO (kD)	Masa (mg)	Comentario
30	18,3	Copolímero cMAP-PEG de alto peso molecular
20	20,8	
10	12	Tribloque cMAP-PEG-cMAP puro + dibloque cMAP-PEG
Total	51,1	

De manera similar, se inició una reacción con 50 mg de cMAP y 22,3 mg de di-SVA-PEG5k. Después de agitar durante 24 horas, la reacción se diluyó en agua y se filtró a través de filtros de centrifugación Amicon de corte de peso molecular (MWCO) secuencialmente más pequeño. Se produce algo de pérdida de material en la membrana del filtro y durante los pasos de transferencia, pero se muestra el material retenido en cada uno de estos filtros después de la liofilización hasta sequedad. En esta síntesis se forma una cantidad significativa de copolímero de cMAP-PEG5k de mayor peso molecular, similar a la reacción análoga anterior.

Debido a que un polímero con un peso molecular tan grande podría presentar una toxicidad sustancial *in vivo*, en un esfuerzo por sintetizar un polímero bien definido con una longitud razonable, la especie de polímero tribloque cMAP-PEG-cMAP se aisló del copolímero usando este método de fraccionamiento. Se han explorado previamente otros polímeros tribloque de esta estructura repetida de un polímero catiónico que flanquea un polímero de PEG o PLA para la liberación de nanotubos de carbono y óxido de hierro y genes.

La reacción de cMAP con mPEG-SVA limitó la estructura del producto resultante al polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm (Fig. 3). También había presente algo de polímero dibloque de cMAP-PEGm y se separó del tribloque deseado mediante fraccionamiento.

Ejemplo 6.2. Pesos moleculares de polímeros por GPC. Se utilizó cromatografía de permeación en gel para caracterizar el peso molecular de cMAP. Aunque el tiempo de elución del polímero puede correlacionarse con su tamaño, con los nuevos polímeros catiónicos no existen patrones de tamaño ideales para la calibración. Por lo tanto, se determinó el peso molecular absoluto de los polímeros usando un detector de dispersión de luz de ángulo múltiple. La ventaja de este método es que depende únicamente de la capacidad de dispersión del polímero y de su concentración; no requiere de un patrón para comparar. Se determinó el índice de refracción diferencial con respecto a la concentración, dn/dc , del cMAP (Tabla 8) y se usó para medir el peso molecular. El peso molecular promedio de 9 lotes de cMAP fue de alrededor de 6 kD con un índice de polidispersidad (PDI) inferior a 1,1 (Tabla 8). Los resultados de los lotes individuales se pueden encontrar en la Tabla 9.

Tabla 8. Pesos moleculares de polímeros basados en cMAP.

Polímero	dn/dc (mL/g)	Mn (kD)	Mw (kD)	PDI (Mw/Mn)
cMAP (9 lotes \pm error estándar)	$0,1806 \pm 0,0002$	$6,30 \pm 0,40$	$6,76 \pm 0,40$	$1,08 \pm 0,01$
Copolímero cMAP-PEG5k (2 lotes \pm error estándar)	$0,1660 \pm 0,0003$	$28,72 \pm 4,55$	$41,49 \pm 14,65$	$1,40 \pm 0,29$
mPEG5k-cMAP-PEG5km (3 lotes \pm error estándar)	$0,1420 \pm 0,0004$	$20,98 \pm 0,67$	$21,95 \pm 0,67$	$1,05 \pm 0,02$

Tabla 9: Análisis de cromatografía de permeación en gel de los lotes de cMAP.

Muestra	Mn	Mw	Mw/Mn (PDI)
cMAP-DP11	5323	6068	1,14
cMAP-DP12	5213	5839	1,12
cMAP-DP13	5936	6365	1,07
cMAP-DP14	5747	5940	1,03
cMAP-DP15	5050	5568	1,10
cMAP-DP16	6102	6357	1,04
cMAP-DP17	7712	8235	1,07
cMAP-DP18	7313	7524	1,03
cMAP-DP19	8353	8984	1,08

Se presentan los valores como el promedio de 3 experimentos.

Usando un método similar, el copolímero de 5k cMAP-PEG presentó una distribución de tamaño más grande con un PDI de 1,4 y un Mw de 42 kD y un Mn de 29 kD (Tabla 8). El tribloque de 5k mPEG-cMAP-PEGm tenía aproximadamente 21 kD con un PDI inferior a 1,1 (Tabla 8). Además, en la Tabla 10 se muestran los resultados para el copolímero PEG cMAP-PEG de 3,4 kD y el tribloque PEG mPEG-cMAP-PEGm de 2 kD, así como los tribloques cMAP-PEG-cMAP derivados del fraccionamiento del copolímero cMAP-PEG.

Tabla 10: Análisis de GPC de copolímeros y tribloques de cMAP (distintos del PEG de 5 kD incluido en el texto del artículo principal).

Polímero	dn/dc (mL/g)	Mn (kD)	Mw (kD)	PDI (Mw/Mn)
Copolímero cMAP-PEG3.4k	0,1660	128,30	289,25	2,27
cMAP-PEG3.4k-cMAP	0,1660 usado (no para tribloque puro)	12,89	14,20	1,10
cMAP-PEG5k-cMAP	0,1660 usado (no para tribloque puro)	24,17	26,84	1,11
mPEG2k-cMAP-PEG2km	0,1654	9,75	9,81	1,01

Ejemplo 6.3. Encapsulación de ARNip mediante polímeros basados en cMAP. La capacidad de cMAP, copolímero de cMAP-PEG y polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm para encapsular ARNip se confirmó usando un ensayo RiboGreen y un ensayo de retardo en gel. El cMAP es capaz de encapsular ARNip en una relación de carga (+/-) de 1+/-, y el copolímero cMAP-PEG5k y el tribloque mPEG5k-cMAP-PEG5km ambos son capaces de encapsular completamente ARNip con una relación de carga de 3 o 2, respectivamente, utilizando el ensayo fluorescente RiboGreen (Fig. 12). Se presentan datos de encapsulación de ARNip similares para copolímeros y polímeros tribloque de las otras longitudes de PEG en las Figuras 13-14. Los resultados del ensayo RiboGreen son quizás más sensibles, pero comparables a los de un ensayo de retardo en gel.

Ejemplo 7. Formulaciones y propiedades de nanopartículas.

Ejemplo 7.1. Formulaciones. El ácido 5-nitrofenilborónico-PEGm (5-nPBA-PEGm) contiene un grupo de ácido borónico que permite que un extremo de este PEG de 5 kD se una a grupos diol vecinales del ácido mágico en cMAP a un pH superior a 6,8 para proporcionar estabilización estérica de las NP que contienen ARNip, tal como se ilustra en la Figura 15. Las diversas formulaciones de NP que utilizan cMAP, copolímero cMAP-PEG y polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm, con o sin 5-nPBA-PEGm adicional, se muestran en las Figuras 16 (A-B). Una NP preparada mezclando cMAP y ARNip en una proporción de carga de 3 +/- sin la adición de 5-nPBA-PEGm, aunque estable en agua, es inestable en PBS (un 5-nPBA-PEGm por diol añadido a la formulación, Figura 17).

Al contrario que el cMAP solo, el copolímero cMAP-PEG y el polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm pudieron formar partículas estables sin 5-nPBA-PEGm adicional. Sin embargo, el polímero tribloque cMAP-PEG-cMAP puro aislado del copolímero cMAP-PEG no pudo formar NP estables que contenían ARNip sin la adición de 5-nPBA-PEGm, quizás porque no contenían suficiente PEG para proteger completamente y estabilizar estéricamente la NP (Tabla 11 y Figuras 18-20).

Tabla 11: NP formadas sin 5-nPBA-PEGm extra usando tribloque cMAP-PEG-cMAP aislado de agregados de copolímero cMAP-PEG en IX PBS, pero es estable cuando se añade a la formulación al menos un PEG por cada 2 grupos diol.

Formulación	Tampón fosfato 10 mM	PBS
	Tamaño promedio (nm)	Tamaño promedio (nm)
Tribloque de 3,4k, 1:1, 0 PEG	176,6 ± 1,0	agregados
Tribloque de 3,4k, 1:1, 0,5 PEG	100,1 ± 0,8	57,9 ± 0,9
Tribloque de 3,4k, 1:1, 1 PEG	149,5 ± 1,6	56,5 ± 1,5
Tribloque de 3,4k, 1:1, 2 PEG	85,9 ± 2,0	74,5 ± 3,4
Tribloque de 3,4k, 3:1, 0 PEG	392,3 ± 5,0	agregados
Tribloque de 3,4k, 3:1, 0,5 PEG	42,8 ± 2,0	47,3 ± 2,0
Tribloque de 3,4k, 3:1, 1 PEG	61,3 ± 2,3	55,7 ± 1,2
Tribloque de 3,4k, 3:1, 2 PEG	115,9 ± 11,4	96,6 ± 1,6
Tribloque de 5k, 1:1, 0 PEG	165,2 ± 4,7	agregados
Tribloque de 5k, 1:1, 0,5 PEG	141,3 ± 5,2	99,8 ± 3,8
Tribloque de 5k, 1:1, 1 PEG	109,2 ± 3,6	97,5 ± 4,2
Tribloque de 5k, 1:1, 2 PEG	179,1 ± 19,9	143,5 ± 5,4

Aunque el copolímero cMAP-PEG y el polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm formaron NP estables en PBS, también se prepararon formulaciones con 5-nPBA-PEGm adicional para probar si el PEG adicional ofrecía una mayor estabilidad estérica a las NP cuando se probaban *in vivo*. La cantidad de PEG unido a las NP fue aproximadamente del 20% (Tabla 13). Los componentes poliméricos de las NP se mezclaron con un volumen igual de ARNip para formar NP a concentraciones de 0,8-1 mg de ARNip/mL. Además, el copolímero cMAP-PEG y los polímeros tribloque mPEG-cMAP-PEGm pudieron formular NP estables directamente en PBS, eliminando la necesidad de formular primero partículas estables en un tampón bajo en sal seguido de la adición de PBS (requerido por el cMAP).

Ejemplo 7.2. Tamaño de las nanopartículas. Los tamaños de las NP formuladas se caracterizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de crio-transmisión (CrioTEM). Los diámetros de dichas NP son todos de aproximadamente 30-40 nm, según lo determinado por DLS y CrioTEM (Tabla 12). Las NP tenían una morfología esférica (imágenes CrioTEM, que se muestran en la Figura 21). En las Figuras 22 y 23 se incluyen imágenes adicionales y las distribuciones de tamaños de DLS y CrioTEM.

Tabla 12. Tamaño y carga superficial de las nanopartículas formuladas.

Formulación	Diámetro hidrodinámico por DLS (nm)	Diámetro por CrioTEM (nm)	Potencial zeta (mV) en tampón fosfato 10 mM, pH 7,4	Potencial zeta (mV) en KCl 1 mM, pH 5,5
cMAP + 5-nPBA-PEG5km	40,9 ± 8,9	29,3 ± 12,8	-3,14 ± 0,56	0,76 ± 0,37
Copolímero cMAP-PEG5k	25,1 ± 5,6	27,0 ± 7,9	0,69 ± 0,71	1,77 ± 0,76
Copolímero cMAP-PEG5k + 5-nPBA-PEG5km	38,1 ± 15,3	34,4 ± 19,7	-2,25 ± 0,64	0,70 ± 0,74
mPEG5k-cMAP-PEG5km	36,8 ± 20,2	33,6 ± 16,7	0,42 ± 0,73	0,40 ± 0,64
mPEG5k-cMAP-PEG5km + 5-nPBA-PEG5km	29,8 ± 9,2	27,8 ± 12,9	-0,36 ± 0,64	1,44 ± 0,83

Ejemplo 7.3. Potencial Zeta de las nanopartículas. El potencial zeta de las NP (una medida de la carga superficial de las NP), se midió en dos soluciones de diferente pH: fosfato 10 mM tamponado a pH 7,4, cuando 5-nPBA-PEGm se uniría a los dióles vecinales en cMAP; y KCl 1 mM a pH 5,5, cuando el 5-nPBA-PEGm se disociaría de los dióles del ácido mágico. Las NP de cMAP-ARNip con 5-nPBA-mPEG presentaron un potencial zeta ligeramente negativo a -3 mV en tampón fosfato de pH 7,4 cuando había 5-nPBA-mPEG presente en las NP. Sin embargo, cuando estas NP se colocaron en KCl 1 mM a pH 5,5, el potencial zeta fue de aproximadamente +1 mV. Estos resultados fueron consistentes con la unión del ácido borónico a los dióles del ácido mágico para formar un complejo de boronato

tetraédrico a pH 7,4 que protegió la carga positiva del cMAP, y con el ácido borónico disociado de las NP a pH ácido 5,5. Se observaron efectos similares con el copolímero cMAP-PEG y el polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm con y sin 5-nPBA-PEGm (Tabla 12).

Ejemplo 7.4. Estequiometría de las nanopartículas. En la Tabla 13 se muestra la cantidad de cMAP y copolímeros unidos a las NP. Para los tres polímeros (cMAP, copolímero cMAP-PEG y polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm), aproximadamente el 33% del polímero total usado para la formulación se unió para una relación de carga de las NP efectiva de 1 +/--. La cantidad de 5-nPBA-PEGm presente en las formulaciones de las NP que contienen un exceso de PEG para la estabilización también se muestra en Tabla 13. La cantidad de 5-nPBA-PEGm unido a cMAP + 5-nPBA-PEGm NP fue aproximadamente del 34%, o un PEG por diol (Tabla 13). Se observó que aproximadamente el 20% del PEG estaba unido a las NP para el copolímero cMAP-PEG y las formulaciones de NP del polímero tribloque mPEG-cMAP-PEGm. Teniendo en cuenta el exceso de polímero catiónico presente cuando las partículas se formularon en una relación de carga 3 +/- y debido a que la relación de carga de las NP efectiva es 1 +/-, esto significaba que estaba presente un poco menos de 1 PEG por diol en las NP. Prácticamente todo el ARNip se encapsuló en las NP, como se muestra arriba en los datos sobre la encapsulación del ARNip (Figura 12).

Tabla 13. Composición de nanopartículas para NP formuladas con una relación de carga de 3 +/--. Media +/- S.E.M. de 3 experimentos (para PEG) o 2 experimentos (para polímero).

Formulación	% 5-nPBA-PEGm unido a NP	% de polímero catiónico unido a NP
cMAP	N/A	33,0 ± 0,2
cMAP + 5-nPBA-PEG5km	34,2 ± 8,7	N/A
Copolímero cMAP-PEG5k	N/A	46,1 ± 1,3
Copolímero cMAP-PEG5k + 5-nPBA-PEG5km	21,5 ± 1,7	N/A
mPEG5k-cMAP-PEG5km	N/A	34,4 ± 0,8
mPEG5k-cMAP-PEG5km + 5-nPBA-PEG5km	18,4 ± 4,5	N/A

Ejemplo 8. Estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratones.

Se probaron formulaciones estables de NP *in vivo* mediante inyección en la vena de la cola en ratones Balb/c. En las dosis inyectadas, no se observaron toxicidades de ninguna formulación. Se midió la PK de las diversas NP y los resultados se ilustran en las Figuras 24(A-C).

Se probó una NP compuesta por el polímero cMAP y ARNip mezclados en una relación de carga de 3 +/- y estabilizados con 5-nPBA-PEGm, ya que esta formulación de NP era análoga a la formulación de CDP que se usó para los estudios clínicos (CALAA-01). La NP basado en cMAP tiene tiempos en circulación ligeramente más largos que CALAA-01 (Fig. 24A). Debido a que CALAA-01 usó un complejo de inclusión para la interacción de CDP y adamantano-PEG (AD-PEG), el AD-PEG podría desprenderse de las NP durante la circulación haciendo que las NP pierdan estabilidad. Otros han sintetizado AD₂-PEG, y han demostrado que este compuesto tiene una mayor capacidad para estabilizar NP basadas en CDP que el AD-PEG de la formulación CALAA-01 original. Se cree que esto se debe a la unión mejorada de los dos adamantanos por PEG (en dos CD) que, por lo tanto, da como resultado una mayor estabilización estérica durante la circulación (Fig. 24A). Con el presente sistema de ácido borónico cMAP, la interacción entre el compuesto de PEG y el polímero es a través de un éster de ácido borónico que se forma a partir del ácido borónico y dioles en el polímero, con aprox. 30% del PEG unido a las NP. Debido a que solo 1/3 del cMAP utilizado para formular la NP estaba unido a la partícula (Tabla 13), esto fue aproximadamente equivalente a un PEG presente por diol. Tal como era de esperar, la interacción ácido borónico-diol fue más fuerte que el complejo de inclusión entre adamantina y ciclodextrina, de modo que el 5-nPBA-PEGm pudo permanecer unido a cMAP más tiempo que AD-PEG a CDP para dar como resultado una mayor estabilización estérica y una mejora del tiempo en circulación.

Las NP formadas utilizando el copolímero cMAP-PEG se pueden formular de manera estable con ARNip en PBS a una relación de carga de 3 +/- en una NP sin el uso de 5-nPBA-mPEG (ver más arriba). Se cree que el PEG del copolímero cMAP-PEG forma bucles de PEG para proteger el núcleo de la NP. Se puede usar 5-nPBA-mPEG adicional para una mayor estabilización de las NP. El cambio de potencial zeta de negativo a pH 7,4 a positivo a pH 5,5, además del 20% de PEG unido a las partículas midiendo la cantidad de exceso de PEG filtrado, mostró que el 5-nPBA-PEGm podía interactuar con el copolímero cMAP-PEG en las formulaciones de NP. Las NP formuladas con copolímero cMAP-PEG no proporcionaron tiempos en circulación más prolongados que las NP basadas en cMAP:5-nPBA-PEGm, tanto si se añade 5-nPBA-PEGm como si no (Figura 24B).

Las NP formadas utilizando el tribloque mPEG-cMAP-PEGm formaron NP estables en PBS (ver más arriba), y se cree que tienen una configuración de tipo cepillo del PEG en la superficie de las NP. Como muestran los datos

proporcionados en la Figura 24B, la inyección de estas NP en ratones dio como resultado un perfil PK mejorado en comparación con todas las demás NP basadas en cMAP, con aproximadamente un 5-10% de las NP que permanecieron en la circulación del ratón después de 60 minutos (otras formulaciones estuvieron por debajo del límite de detección a los 60 minutos). Se observaron resultados similares con esta formulación en ratones nude (Figura 25).

5 Estos tiempos en circulación más largos son consistentes con las NP que tienen un mayor grado de estabilización estérica, presumiblemente derivado de una configuración de cepillo del polímero PEG en la superficie de las NP. La adición de 5-nPBA-PEGm a la NP de polímero tribloque-ARNip no proporcionó mejoras en el tiempo en circulación (Figura 24B). Además, una formulación de NP que contiene ARNip con una relación de carga de 2 +/- que se obtuvo 10 eliminando parte del 66% del polímero tribloque en exceso de la formulación de NP de 3 +/- mediante filtración por centrifugación de la formulación con una membrana MWCO de 30 kD no dio lugar a una disminución del tiempo en circulación (Figura 24C). Usando este método de purificación, fue difícil eliminar todo el exceso de polímero. Estos 15 resultados sugirieron que el polímero que no estaba contenido en las NP no alteró la PK.

De las variaciones de polímero investigadas en la presente memoria, las NP de mPEG-cMAP-PEGm proporcionaron el tiempo en circulación más largo y el tiempo en circulación no aumentó con 5-nPBA-PEGm unido adicional. Aunque 15 las interacciones de 5-nPBA-PEGm con los dióles en cMAP fueron probablemente más fuerte que las interacciones entre adamantano y CDP, todavía era probable que hubiera una cierta cantidad de desprendimiento de PEG de las NP. Por otro lado, el polímero tribloque, con 2 PEG por unidad de cMAP, puede haber logrado en la superficie de las NP la densidad de PEG requerida para una buena capa de cepillo. Sin embargo, la cantidad de PEG unido covalentemente en este polímero tribloque fue menor que en las NP de cMAP + 5-nPBA-PEGm. Los datos PK de 20 estos sistemas sugirieron que aún se producía un desprendimiento de PEG durante la circulación, pero fue menor que el que se da con el sistema CDP-adamantano. Parte del 5-nPBA-PEGm debe permanecer en las NP durante la circulación.

Para proporcionar evidencia adicional de que las NP permanecen intactas durante la circulación, el suero recolectado 25 de ratones 20 minutos después de la dosificación se corrió en un gel y se visualizó el ARNip mediante bromuro de etidio, o el ARNip marcado con fluoróforo en un generador de imágenes Typhoon. Los resultados de estos experimentos mostraron que el ARNip y el ARNip marcado con fluorescencia permanecen en las NP intactas mientras circulan *in vivo*.

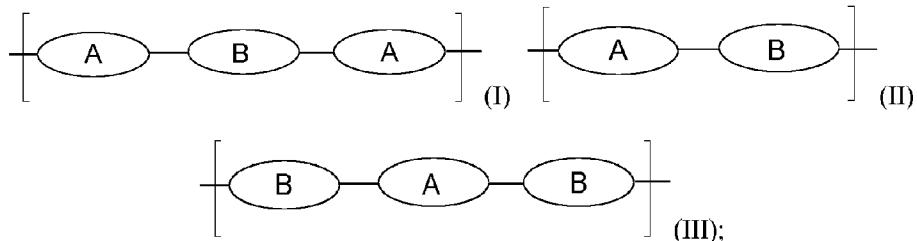
Las siguientes referencias pueden ser útiles para comprender ciertos aspectos de la presente descripción:

1. Wu, S.Y., Lopez-Berestein, G., Calin, G.A. y Sood, A.K. (2014) RNAi Therapies: Drugging the Undruggable. *Science Transl. Med.* 6, 240ps7.
2. Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A y Anderson, D. (2013) Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* 12, 967-977.
3. Davis, M.E. (2009) The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling Cyclodextrin Polymer-Based nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol. Pharm.* 6, 659-668.
4. Davis, M.E. *et al.* (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067-1070.
5. Zuckerman, J.E. *et al.* (2014) Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 11449-11454.
6. Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Han, H., y Davis, M.E. (2012) Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble 40 at the kidney glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3137-3142.
7. Naeye, B., Deschout, H., Caveliers, V., Descamps, B., Braeckmans, K., Vanhove, C., Demeester, J., Lahoutte, T., De Smedt, S.C., Raemdonck, K. (2013) *In vivo* disassembly of IV administered siRNA matrix nanoparticles at the renal filtration barrier. *Biomaterials*, 34, 2350-2358.
8. Christie, R.J., Matsumoto, Y., Miyata, K., Nomoto, T., Fukushima, S., Osada, K., Halnaut, J., Pittella, F., Kim, H.J., Nishiyama, N., y Kataoka, K. (2012) Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano.*, 6, 5174-5189.
9. Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A, Shannon, J.M., Gupta, M.K., y Duvall, C.L. (2013) Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity *in vivo*. *ACS Nano.*, 7, 8870-8880.
10. Barrett, S.E., et al. (2014) Development of a liver-targeted siRNA delivery platform with a broad therapeutic window utilizing biodegradable polypeptide-based polymer conjugates. *Journal of Controlled Release*, 183, 124-137.
11. Gallas, A, Alexander, C., Davies, M.C., Puri, S., y Allen, S. (2012) Chemistry and formulations for siRNA therapeutics. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 7983-7997.

12. Barros, S.A., y Gollob, J.A. (2012) Safety profile of RNAi nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1730-1737.
13. Ballarin-Gonzalez, B. y Howard, K.A. (2012) Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: Adverse effects and solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1717-1729.
- 5 14. Gomes-da-Silva, L.C., Simoes, S., Moreira, J.N. (2013) Challenging the future of siRNA therapeutics against cancer: the crucial role of nanotechnology. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 71, 1417-1438.
- 10 15. Han, H. y Davis, M.E. (2013) Targeted nanoparticles assembled via complexation of boronic acid-containing targeting moieties to diol-containing polymers. *Bioconjugate Chem.* 24, 669-677.
16. Han, H. y Davis, M.E. (2013) Single-Antibody, Targeted Nanoparticle Delivery of Camptothecin. *Mol. Pharmaceutics* 10, 2558-2567.
17. Pun, S.H. y Davis, M.E. (2002) Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjugate Chem.* 13, 630-639.
18. Brissault, B., Leborgne, C., Scherman, D., Guis, C., y Kichler, A (2011) Synthesis of poly(propylene glycol)-block-polyethylenimine tri block copolymers for the delivery of nucleic acids. *Macromol. Biosci.*, 11, 652-661.
- 15 19. Xue, L., Ingle, N.P., Reineke, T.M. (2013) Highlighting the role of polymer length, carbohydrate size, and nucleic acid type in potency of glycopolycation agents for pDNA and siRNA delivery. *Biomacromolecules*, 14, 3903-3915.
20. Yuthavong, Y., Feldman, N., y Boyer, P. (1975) Some chemical characteristics of dimethylsuberimidate and its effect on sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 382, 116-124.
21. Zhong, Z., Feijen, J., Lok, M.C., Hennink, W.E., Christensen, L.V., Yockman, J.W., Kim, Y.-H., y Kim, S.W. (2005) Low molecular weight linear polyethylenimine-b-poly(ethylene glycol)-b-polyethylenimine tri block copolymers: Synthesis, characterization, and in vitro gene transfer properties. *Biomacromolecules*, 6, 3440-3448.
- 25 22. Adeli, M., Ashiri, M., Chegeni, B.K., y Sasanpour, P. (2013) Tumor-targeted drug delivery systems based on supramolecular interactions between iron oxide-carbon nanotubes PAMAM-PEG-PAMAM linear-dendritic copolymers. *J Iran. Chem. Soc.*, 10, 701-708.
23. Zhu, Y., Sheng, R., Luo, T., Li, H., Sun, W., Li, Y., y Cao, A (2011) Amphiphilic cationic [dendritic poly(L-lysine)]-block-poly(L-lactide)-block-[dendritic poly(L-lysine)]s in aqueous solution: Self-aggregation and interaction with DNA as gene delivery carries. *Macromol. Biosci.*, 11, 174-186.
- 30 24. Sato, A, Choi, S.W., Hirai, M., Yamayoshi, A, Moriyama, R., Yamano, T., Takagi, M., Kano, A, Shimamoto, A, Maruyama, A (2007) Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life. *Journal of Controlled Release*, 122, 209-216.
- 25 25. D' Addio, S.M., Saad, W., Ansell, S.M., Squiers, J.J., Adamson, D.H., Herrera-Alonso, M., Wohl, A.R., Hoye, T.R., Macosko, C.W., Mayer, L.D., Vauthier, C., y Prud'homme, R.K. (2012) Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from *in vivo* clearance. *Journal of Controlled Release*, 162, 208-217.
- 35 26. Han, H. Development of targeted, polymeric delivery vehicles for camptothecin and siRNA via boronic acid-diol complexation. Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, CA, 2012.
27. Eriksen, F. Relationship between *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetic behavior of a polymeric gene delivery system. M.S. Thesis, ETH, Zurich, Suiza, 2011.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un primer polímero que comprende segmentos alternos cargados y no cargados que comprenden una o más de las siguientes unidades estructurales de Fórmula (I) o Fórmula (II) o Fórmula (III):



5

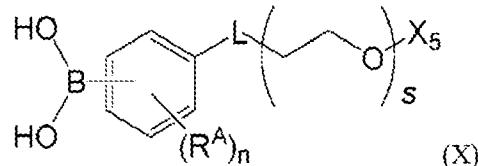
en donde

A es el segmento no cargado que comprende un polialquilenglicol;

B es el segmento cargado en donde el segmento cargado está catiónicamente cargado y comprende al menos un enlace polihidroxi que comprende al menos un par de dioles vecinales;

10 en donde la nanopartícula además comprende un agente biológico encapsulado, opcionalmente en donde el agente biológico está unido covalentemente al polímero; y

en donde la nanopartícula opcionalmente comprende un segundo polímero que comprende una estructura que contiene ácido borónico de Fórmula (X)



15 conjugado al primer polímero, en donde el primer polímero y el segundo polímero que contiene ácido borónico están conectados de forma reversible entre sí mediante un enlace de condensación de borato entre los restos de ácido borónico de Fórmula (X) y el al menos un par de dioles vecinales de los enlaces polihidroxi de Fórmula (I), Fórmula (II) o (III), estando X_5 en un extremo distal del mismo;

en donde

20 R^A es nitro;

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

ses 20-1200

Les -NH-C(=O)-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)-, ou -C(=O)-O-; y

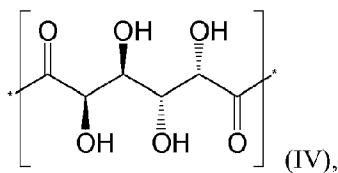
25 X_5 es alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N (alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo; y

en donde si la nanopartícula comprende el polímero que comprende la estructura que contiene ácido borónico de Fórmula (X), la nanopartícula opcionalmente además comprende un ligando conjugado dirigido, en donde la conjugación de produce mediante un enlace de condensación entre el extremo distal del polímero que contiene ácido borónico y el ligando dirigido;

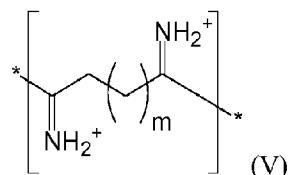
30 opcionalmente en donde

(a) A comprende polietilenglicol y un grupo de enlace apropiado, en donde el polietilenglicol tiene un peso nominal en un rango de aproximadamente 500 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton.

35 (b) B es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos un enlace de ácido mÚlico que comprende al menos un par de dioles vecinales, y que comprende al menos una subunidad repetida que comprende una estructura de Fórmula (IV):



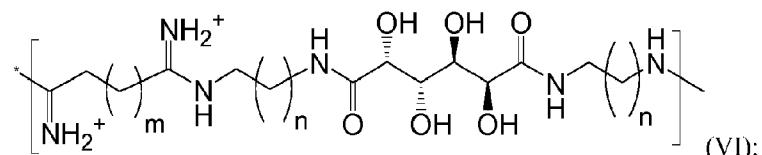
(c) B es un segmento cargado catiónicamente que comprende al menos una subunidad repetida que comprende una estructura de Fórmula (V):



5 en donde m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

y/o

(d) B comprende al menos una subunidad repetida que comprende cMAP, cuya estructura de subunidades se representa como Fórmula (VI):

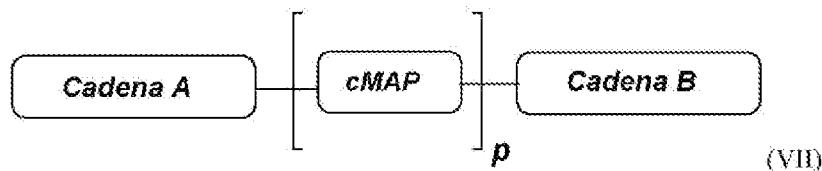


10 donde

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

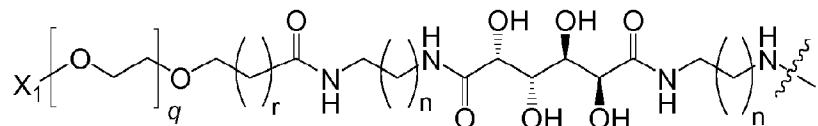
n es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4 o 5.

2. La nanopartícula de la reivindicación 1, descrito por una estructura de Fórmula (VII):

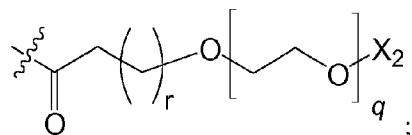


15 donde

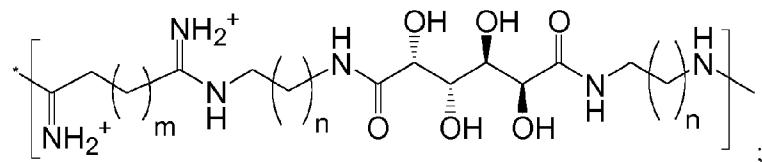
La cadena A es



La cadena B es



20 cMAP es



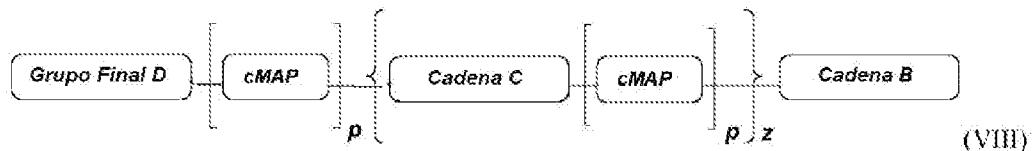
p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular promedio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un rango de 500 Da a 50.000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

5 n y r son independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4 o 5; y

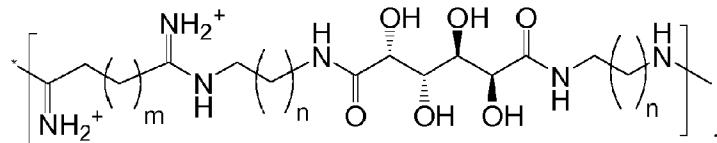
X₁ y X₂ son independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -COOH, -C(=O)O(alquilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.

3. La nanopartícula de la reivindicación 1, descrito por una estructura de Fórmula (VIII):

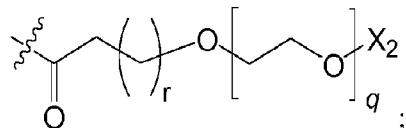


10 donde

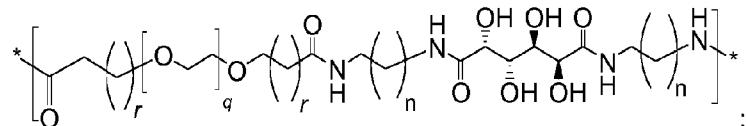
cMAP es



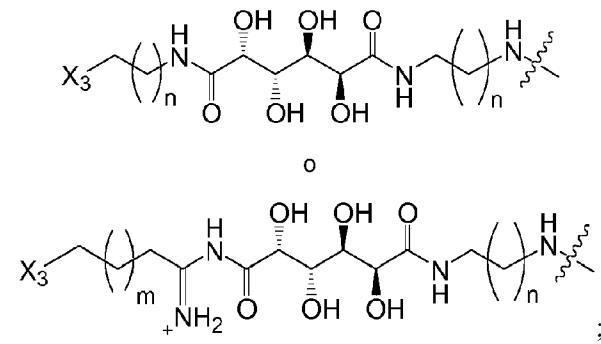
La cadena B es



15 La cadena C es



El grupo final D es:



20

p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de 500 Da a 50.000 Da;

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferiblemente 4, 5 o 6;

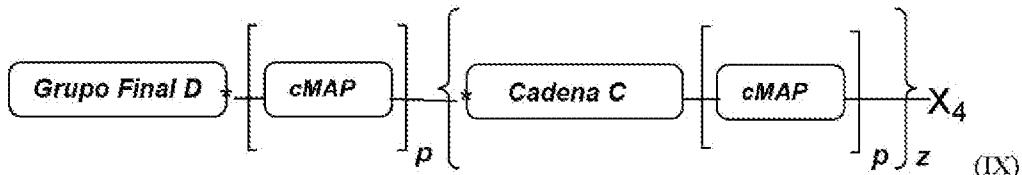
n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5, preferiblemente 1, 2 o 3;

z es igual o mayor que 1 y hasta 10;

5 X₂ es independientemente en cada aparición alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo; y

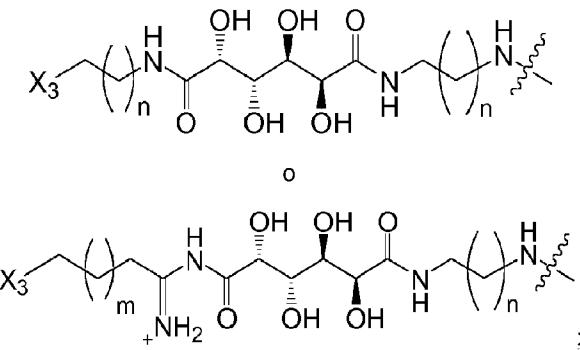
X₃ es -NH₂, -COOH, -C(=O)O(alquilo), o una sal o análogo protegido del mismo.

4. La nanopartícula la reivindicación 1, descrito por una estructura de Fórmula (IX):

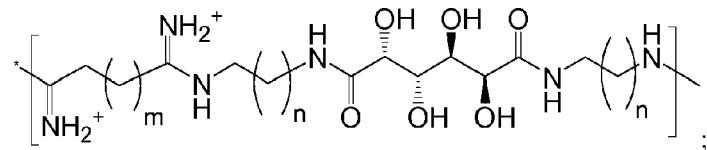


en donde

10 El grupo final D es:

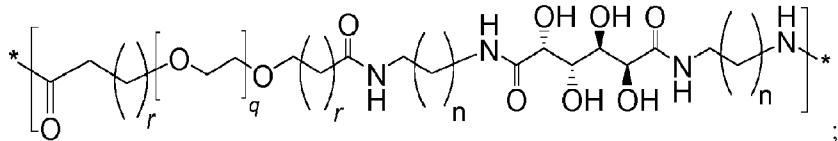


cMAP es



15

La cadena C es



p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un intervalo de 500 Da a 50.000 Da;

20

m es independientemente en cada aparición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

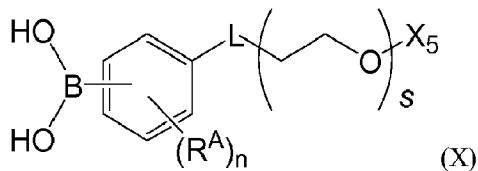
n y r son independientemente en cada aparición 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

z es igual o mayor que 1 y hasta 10 y

X₃ y X₄ son independientemente en cada aparición -NH₂, -COOH, -C(=O)O(alquilo), o una sal o análogo protegido del mismo.

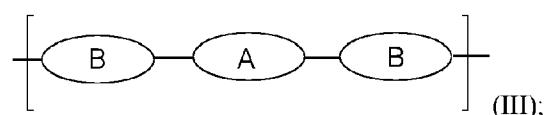
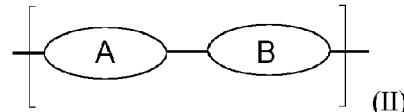
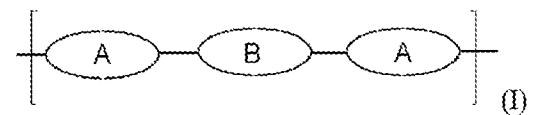
25 5. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde A y B tienen independientemente pesos moleculares medios en número en un rango de 500 Da a aproximadamente 5000 Da, de mayor que 5000 Da a aproximadamente 10 kDa, o de mayor que 10 kDa a aproximadamente 20 kDa.

6. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde p y q son suficientes para proporcionar un peso molecular medio en número para las subunidades que comprenden cMAP y PEG, respectivamente, independientemente en un rango de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 1000 Da, de mayor que 1000 Da a aproximadamente 5000 Da, mayor que 5000 Da a aproximadamente 10.000 Da.
- 5 7. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente biológico está unido covalentemente o de otra forma contenido dentro o por la nanopartícula.
8. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
- (a) el agente biológico es una enzima o proteína biológicamente activa; o
- (b) el agente biológico es una molécula pequeña terapéutica.
- 10 9. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente biológico es:
- (a) un agente terapéutico de pequeña molécula;
- (b) un antibiótico, esteroide, oligonucleótido antisentido, polinucleótido, plásmido, péptido, fragmento o producto terapéutico natural;
- (c) un agente quimioterapéutico, epotilona, fármaco basado en camptotecina, taxol o ácido nucleico; o
- 15 (d) un ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNip, ARNhc, miARN, oligonucleótidos antisentido, virus y polinucleótidos químéricos.
10. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende el segundo polímero que comprende la estructura que contiene ácido borónico de Fórmula (X)



- 20 conjugado al primer polímero, en donde
- el primer polímero y el segundo polímero que contiene ácido borónico están conectados reversiblemente entre sí mediante un enlace de condensación de borato entre los restos de ácido borónico de Fórmula (X) y el al menos un par de dioles vecinales de los enlaces polihidroxi de Fórmula (I), (II) o (III), estando X₅ en un extremo distal del mismo; en donde
- 25 R^A es nitró; n es 1; s es 20-1200
- L es -NH-C(=O)-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)-, o -C(=O)-O-; y
- 30 X₅ es alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(arilo), -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, o una sal o análogo protegido del mismo.
11. La nanopartícula de la reivindicación 10, que comprende el ligando conjugado dirigido, en donde la conjugación ocurre mediante el enlace de condensación entre el extremo distal del polímero que contiene ácido bórico y el ligando dirigido.
12. La nanopartícula de la reivindicación 11, en donde el ligando dirigido comprende un anticuerpo, un aptámero o un fragmento de un anticuerpo, un ligando para un receptor celular o una proteína de receptor celular o en donde el ligando dirigido comprende transferrina o un fragmento de la misma.
- 35 13. Una dispersión que comprende una pluralidad de nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un medio acuoso, opcionalmente en donde las nanopartículas están monodispersadas y tienen una dimensión en la sección transversal en un rango de 20 nm a 300 nm con una desviación estándar en dimensión en sección transversal de menos de 60% según se mide mediante microscopía electrónica de crio-transmisión.
- 40 14. La dispersión de la reivindicación 13, que además comprende un amortiguador.
15. Un método para obtener una composición farmacéutica, comprendiendo el método combinar:

(a) una nanopartícula que comprende un primer polímero que comprende segmentos alternados cargados y sin cargar que comprenden uno o más de las siguientes unidades estructurales de Fórmula (I), Fórmula (II) o Formula (III):



en donde

A es el segmento sin cargar que comprende un polialquilenglicol;

B es el segmento cargado en donde el segmento está cargado catiónicamente y al menos un enlace polihidroxí que comprende al menos un par de dioles vecinales; y

(b) un agente biológico, que es opcionalmente un antibiótico, enzima, esteroide, oligonucleótido antisentido, polinucleótido, plásmido, péptido, fragmento de péptido, proteína o una molécula pequeña o producto terapéutico natural;

en donde los resultados combinados dan como resultado la encapsulación del agente biológico dentro de la nanopartícula;

comprendiendo el método además opcionalmente mezclar la nanopartícula con un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

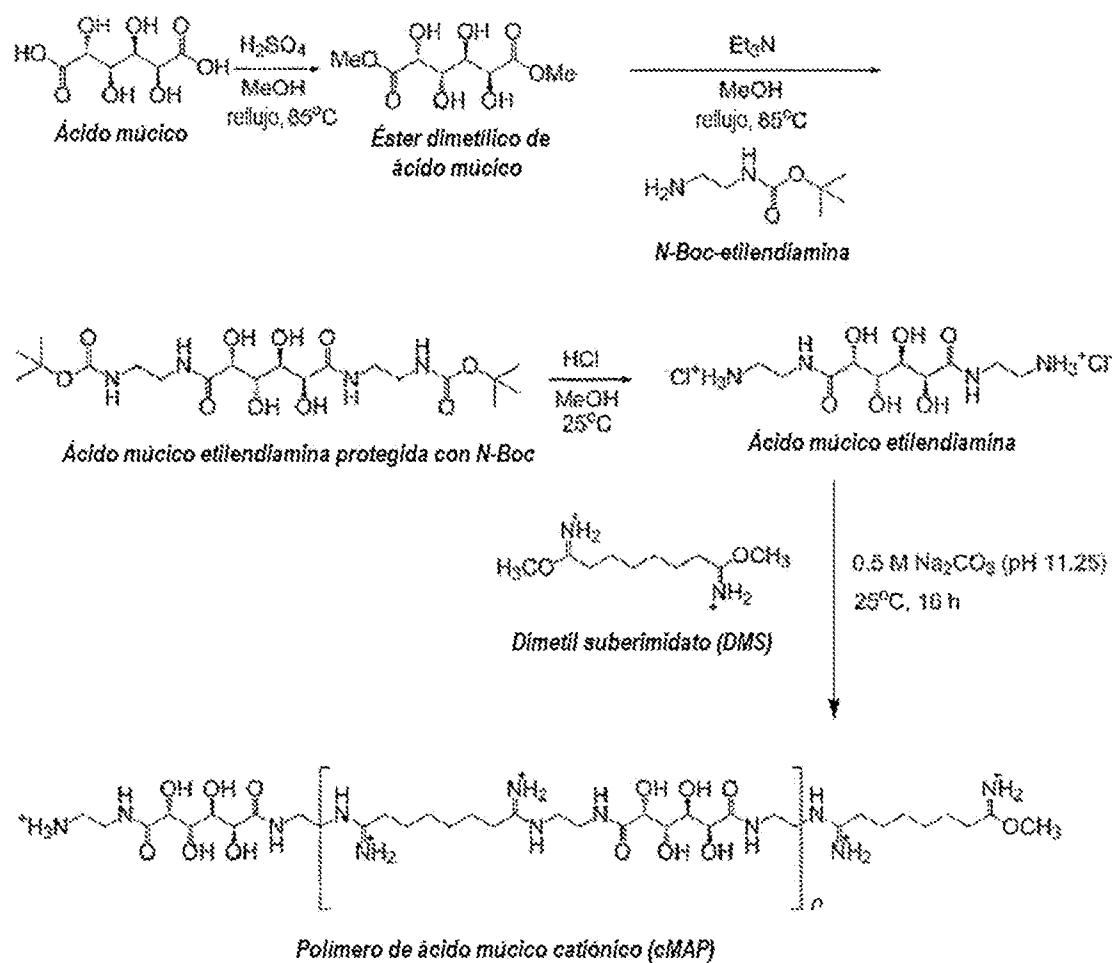


FIG. 2

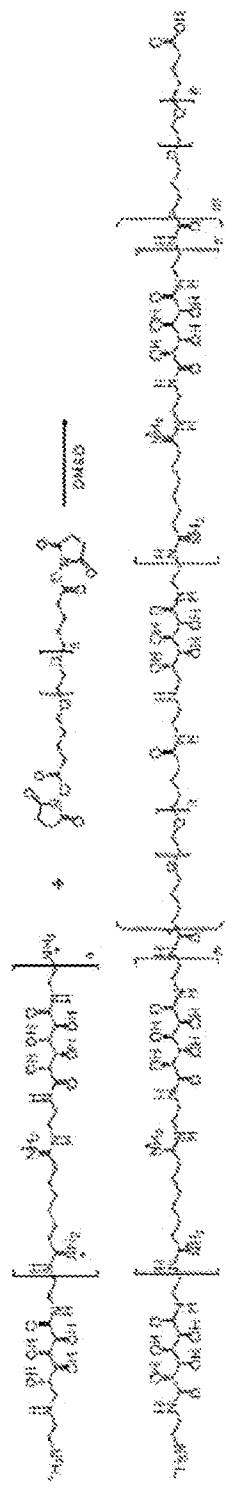


FIG. 3

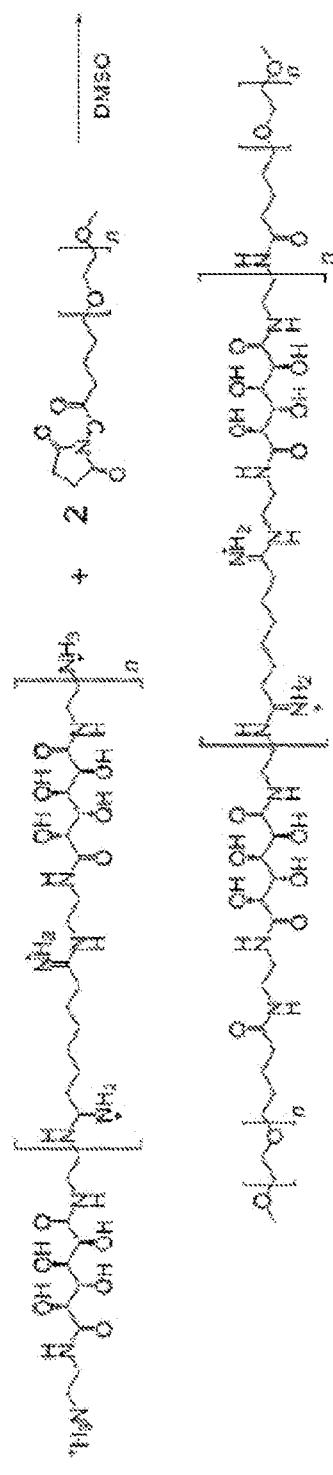


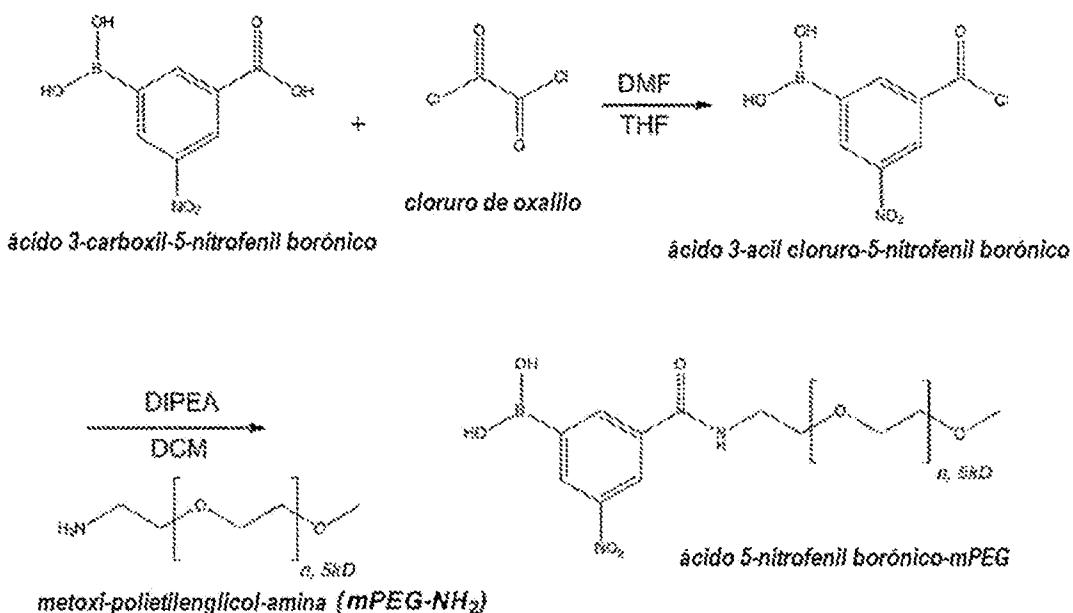
FIG. 4

FIG. 5

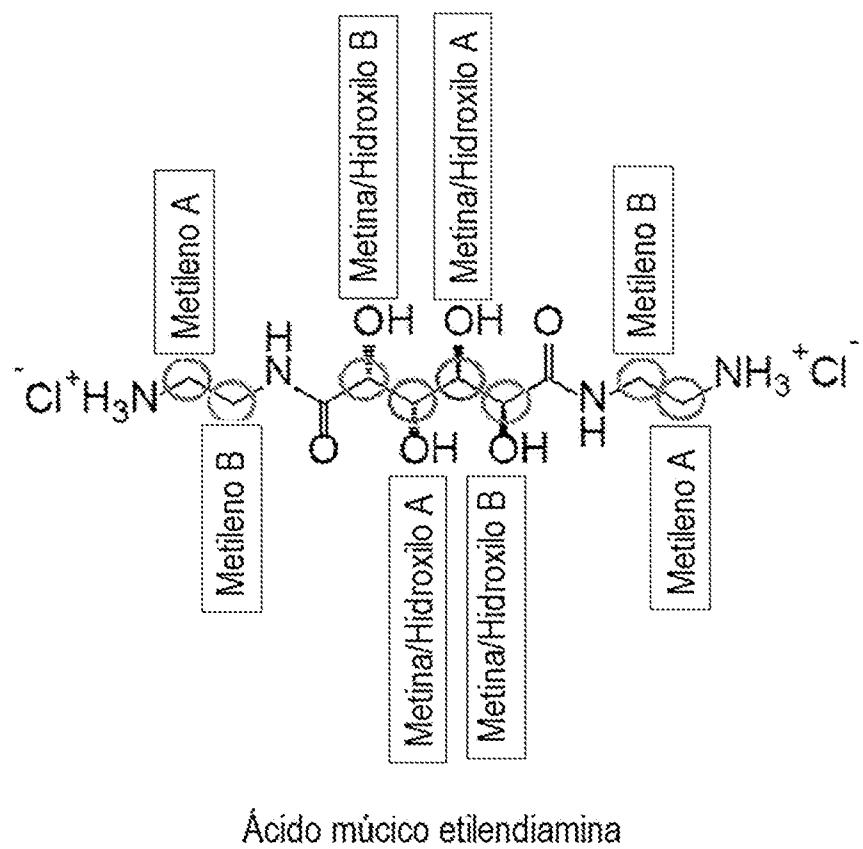


FIG. 6

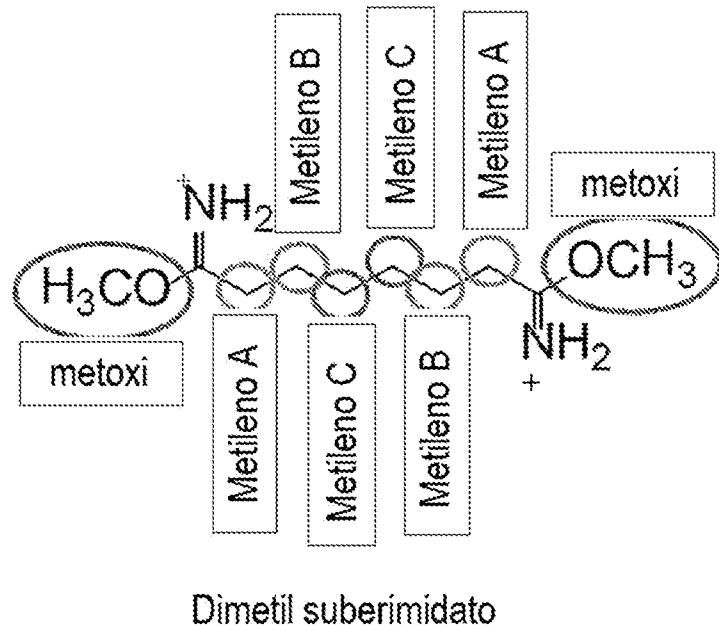


FIG. 7

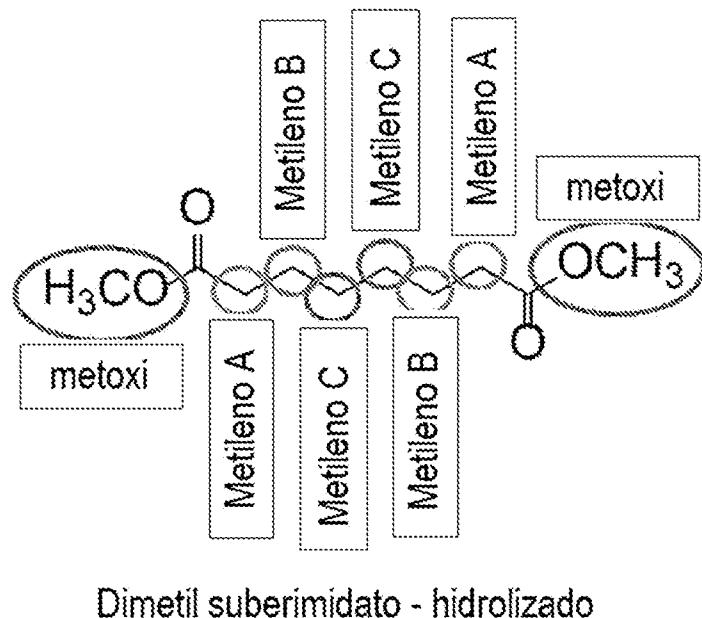


FIG. 8

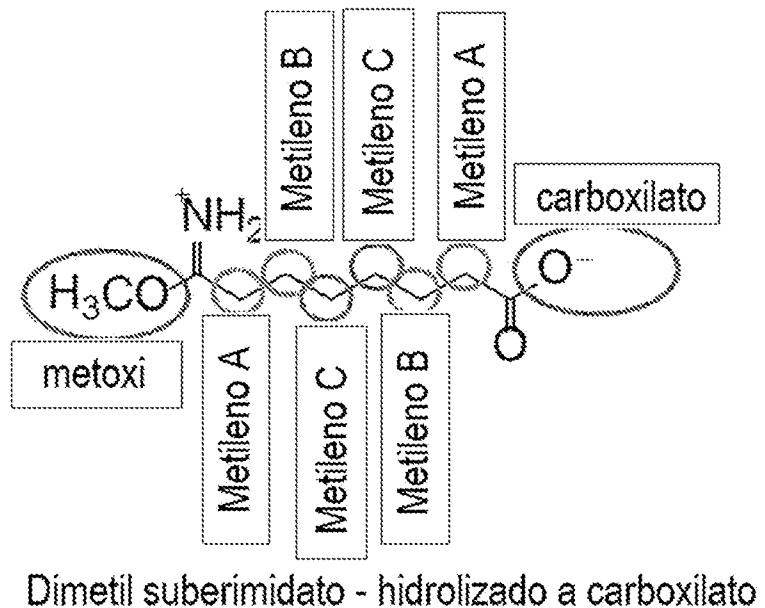


FIG. 9

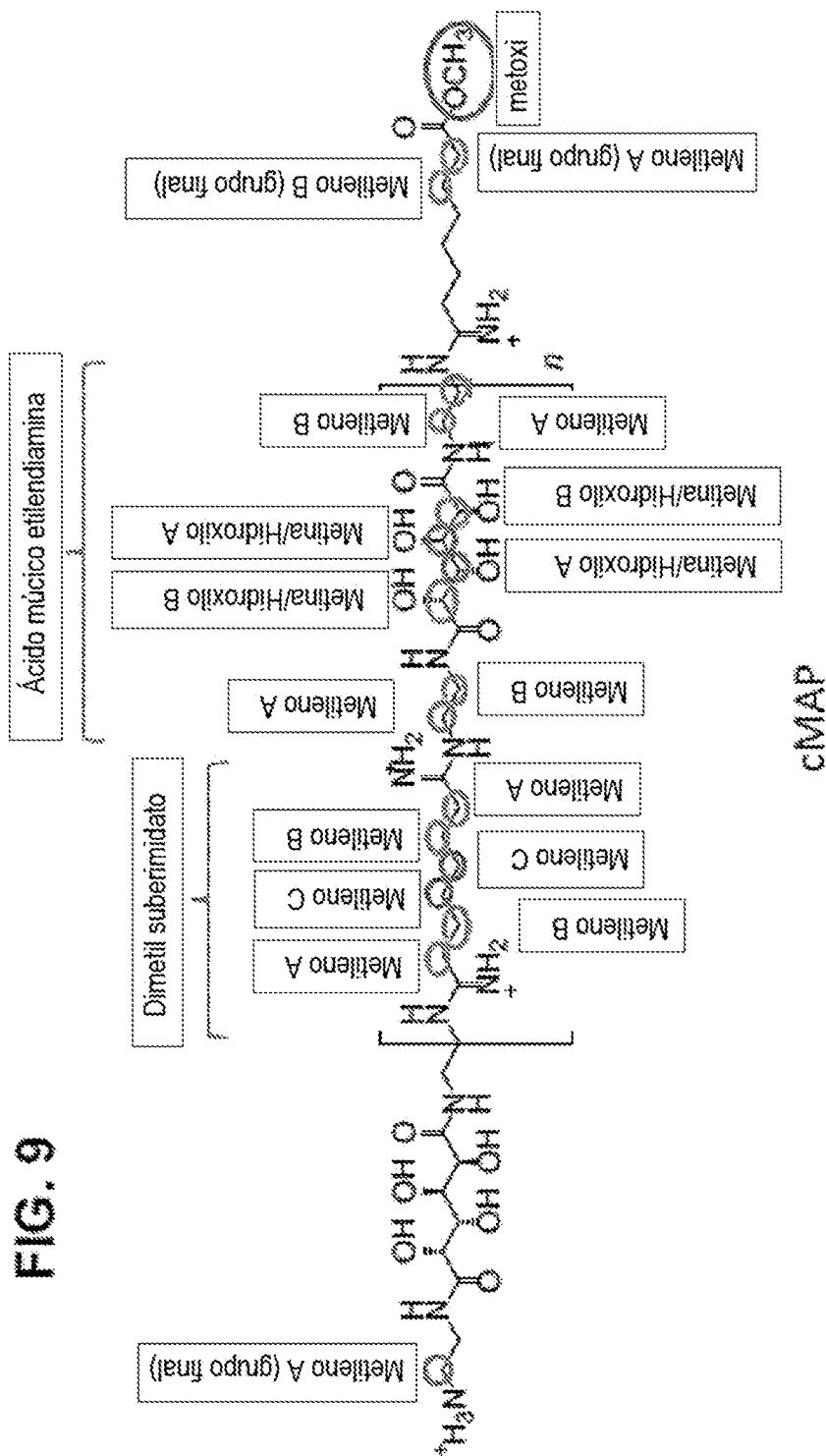


FIG. 10

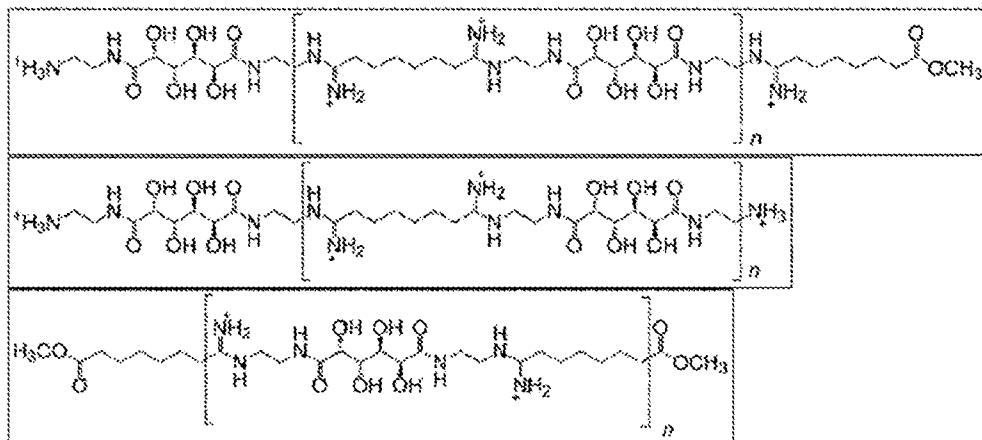


FIG. 11

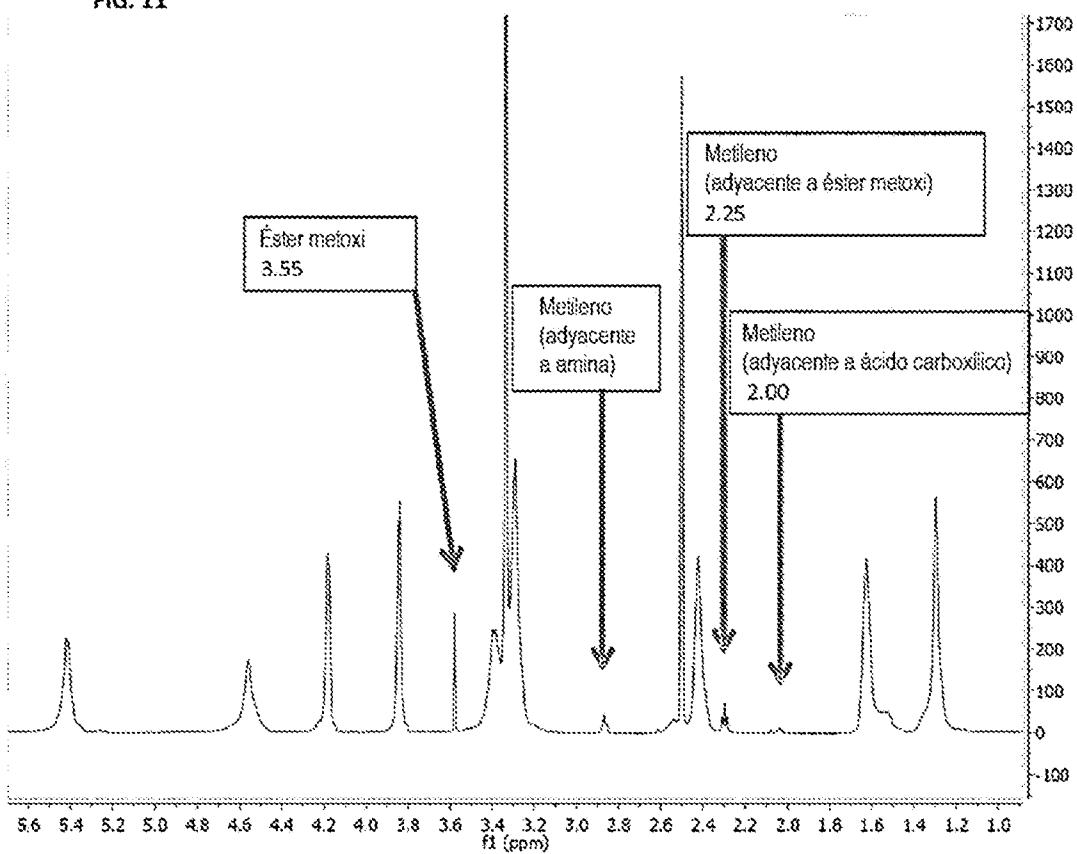


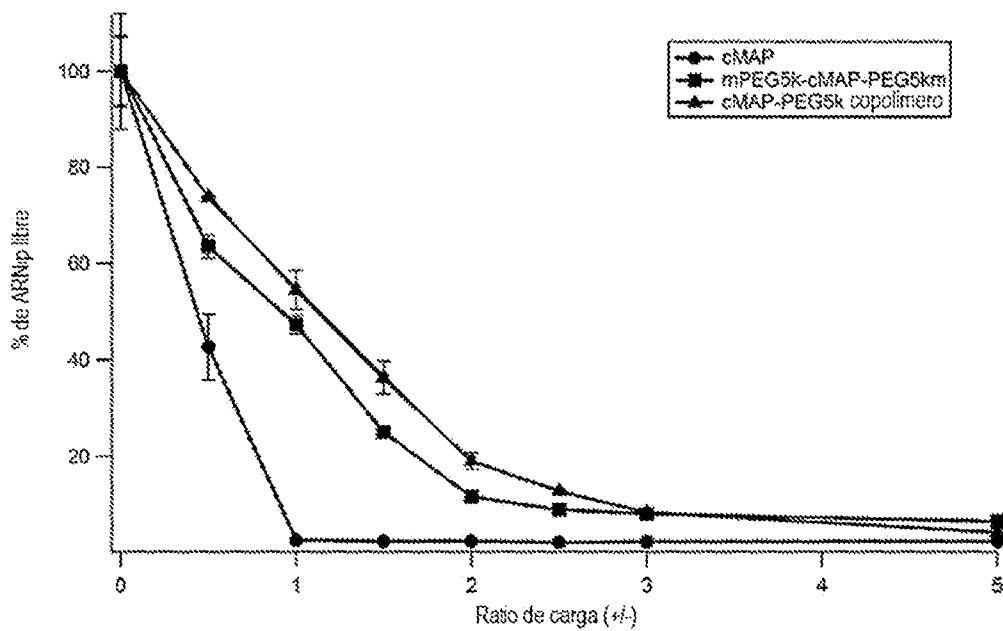
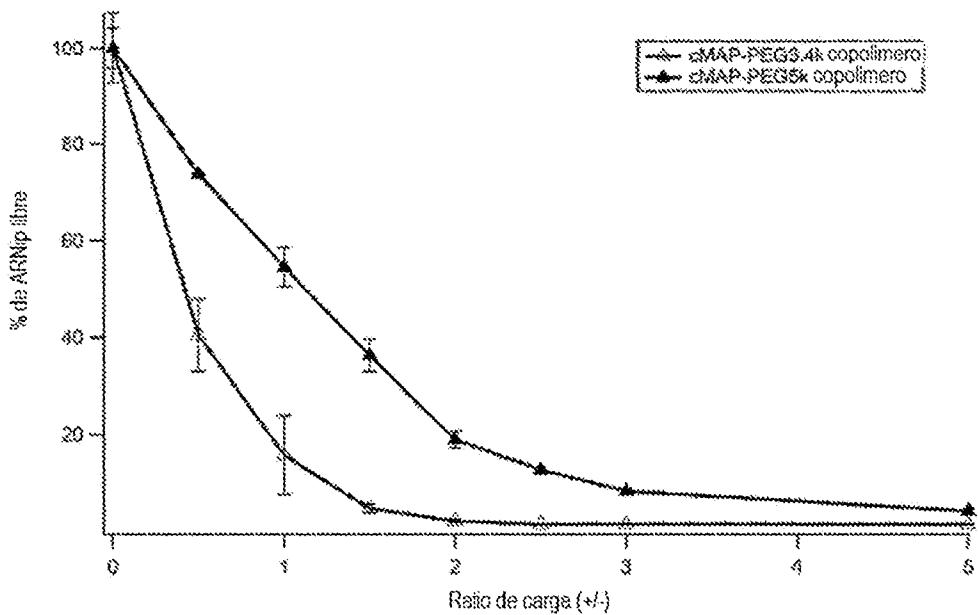
FIG. 12**FIG. 13**

FIG. 14

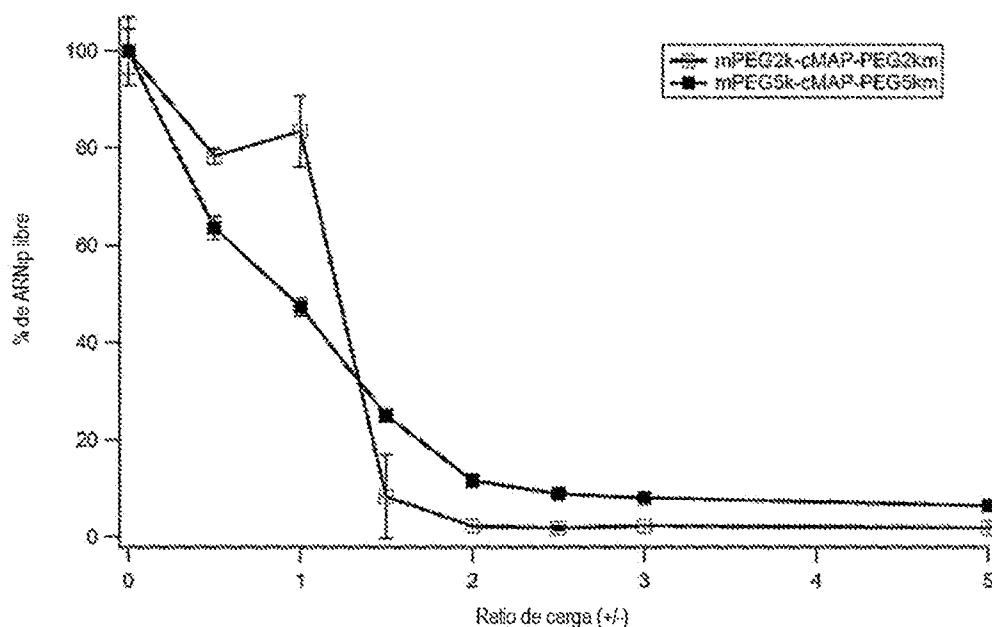


FIG. 15

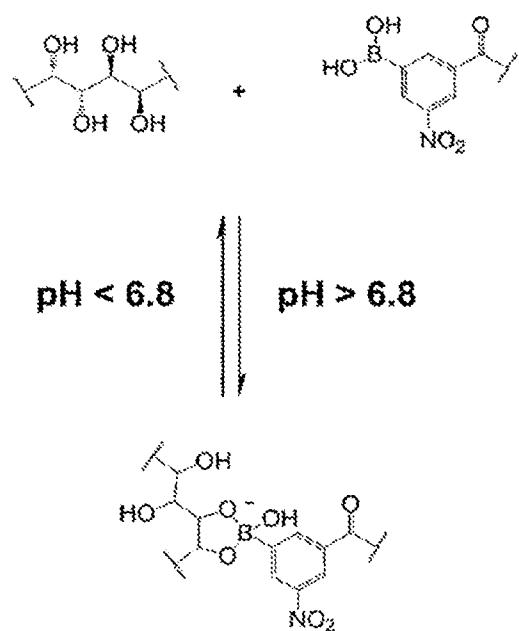


FIG. 16A

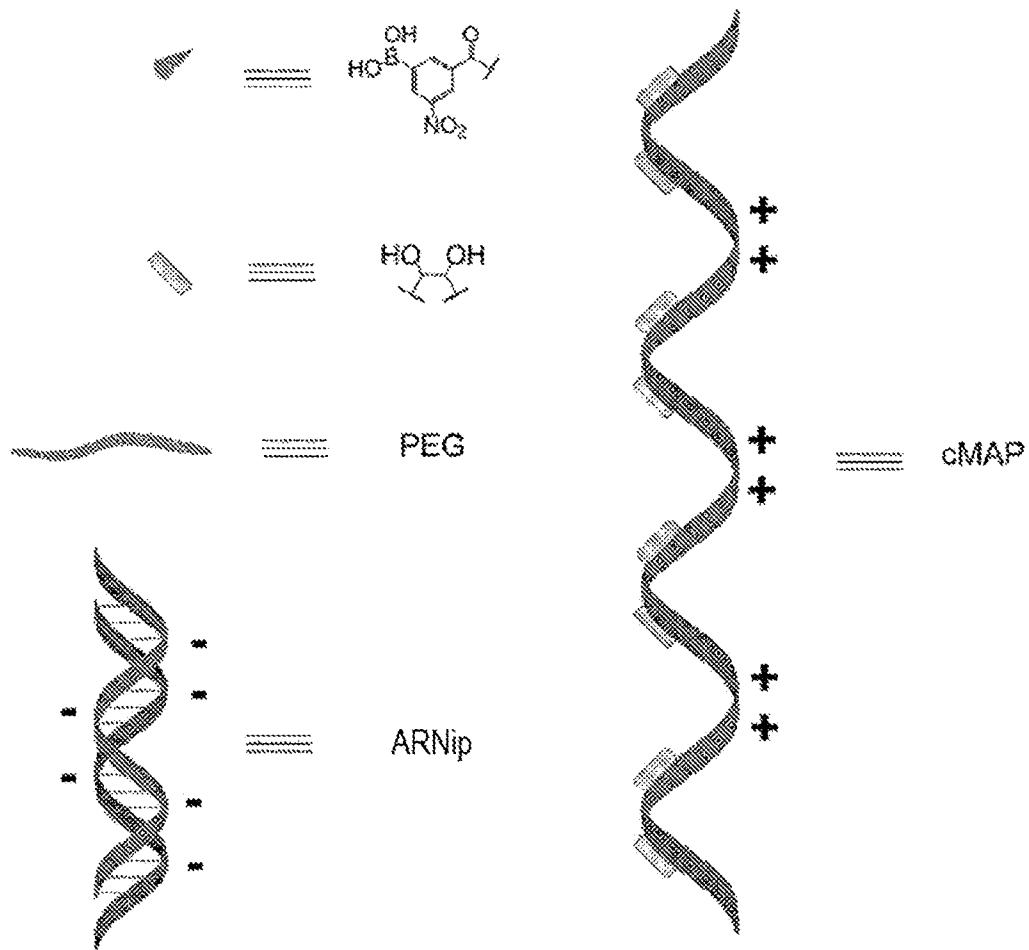


FIG. 16B

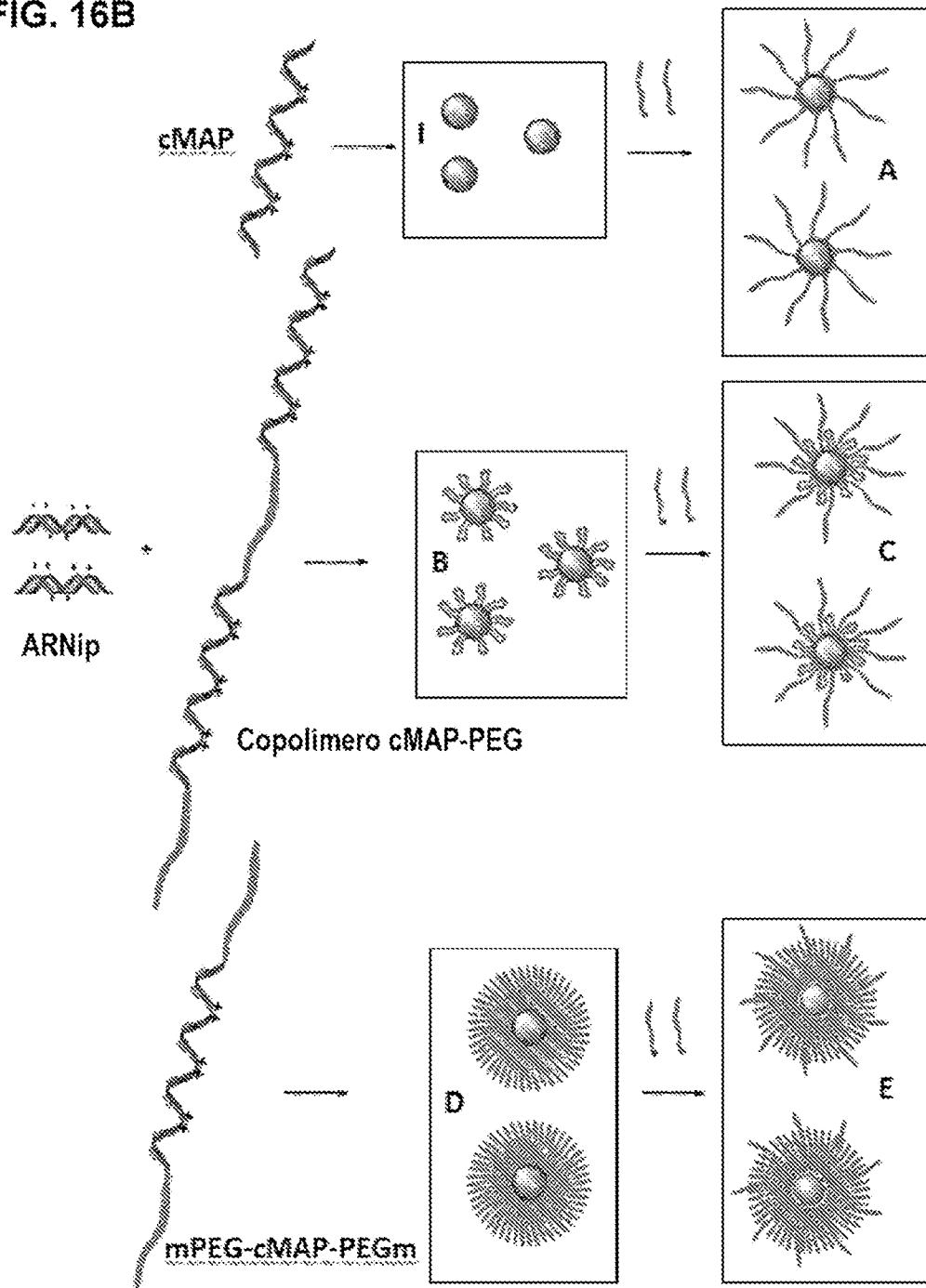


FIG. 17

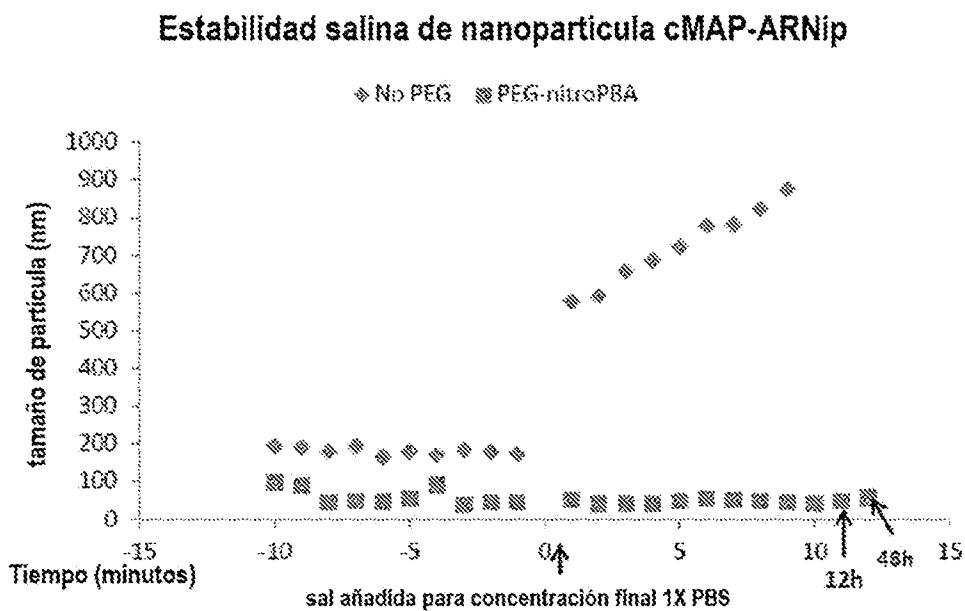


FIG. 18

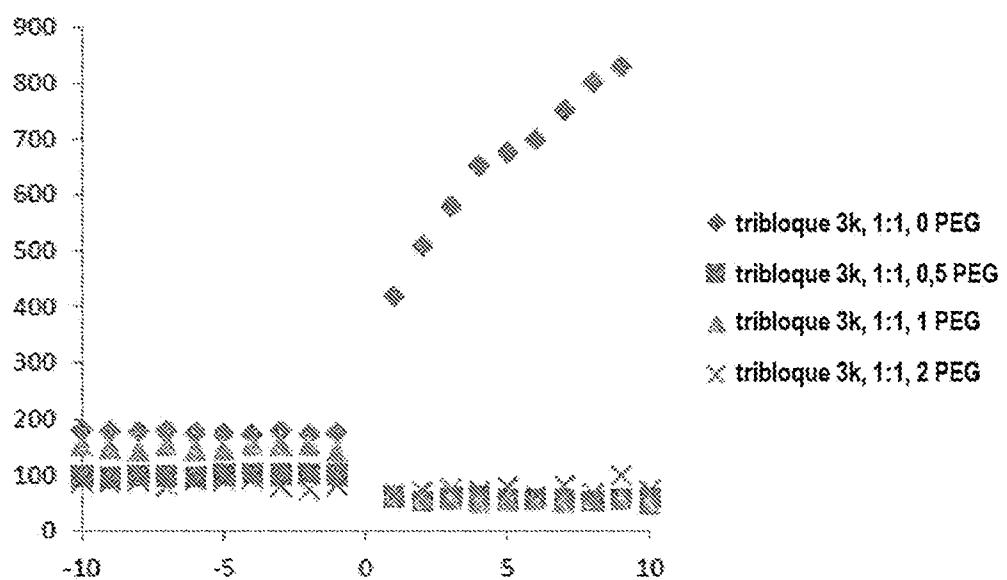


FIG. 19

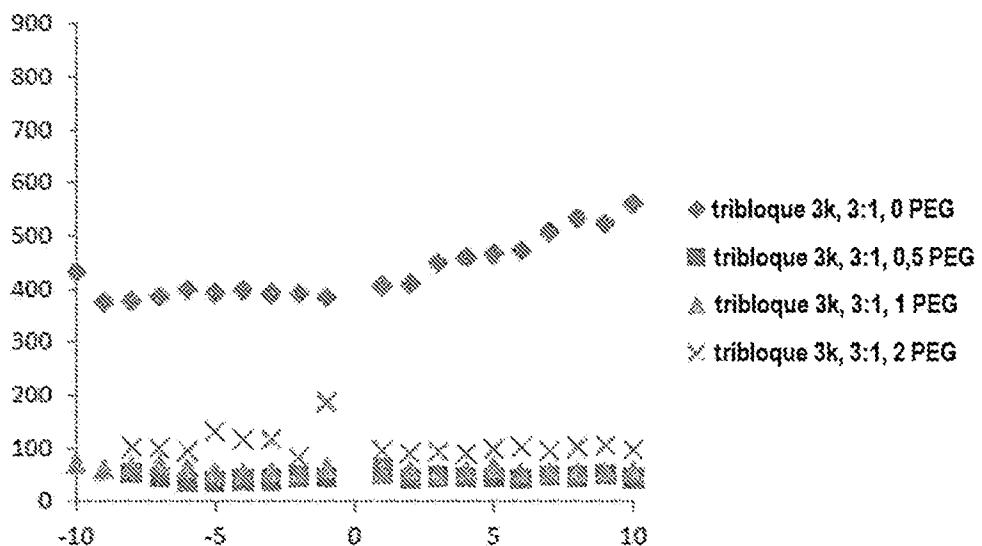


FIG. 20

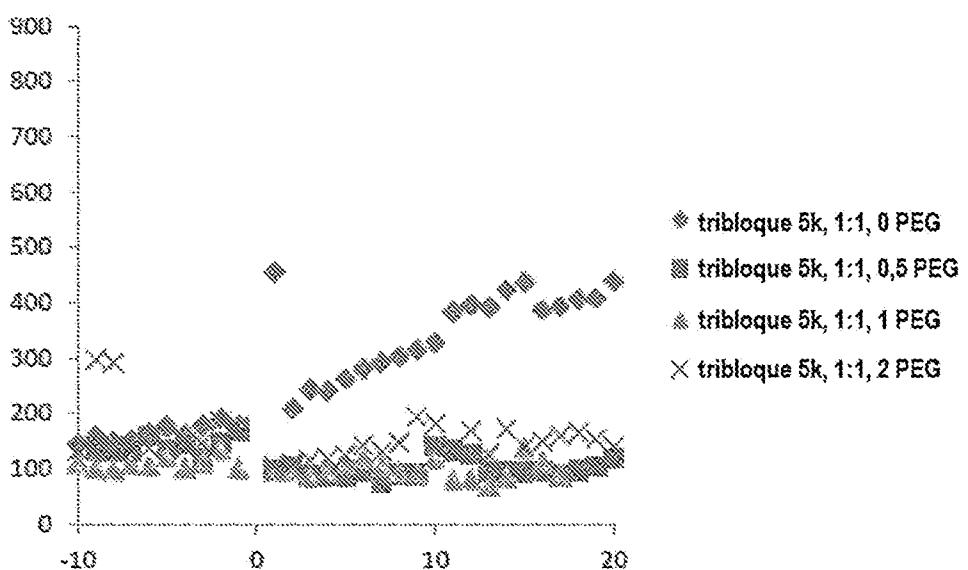


FIG. 21

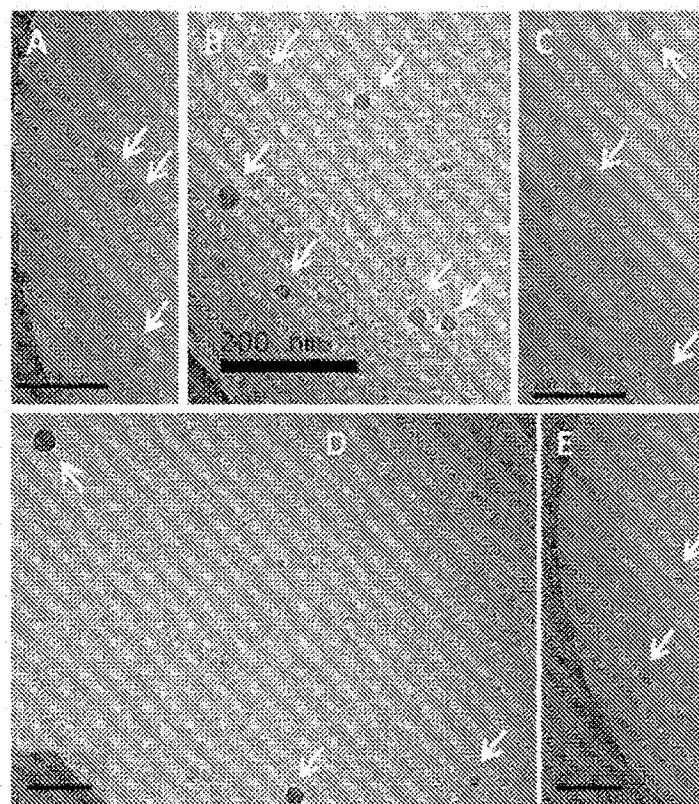


FIG. 22A

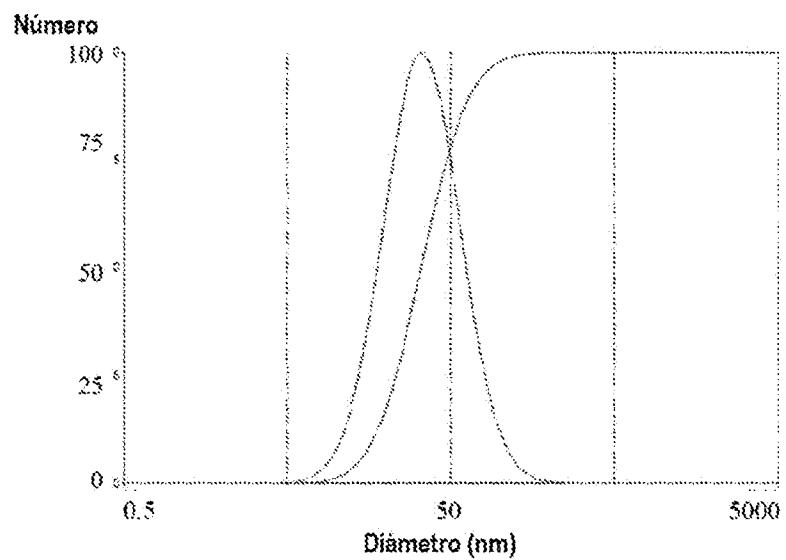


FIG. 22B

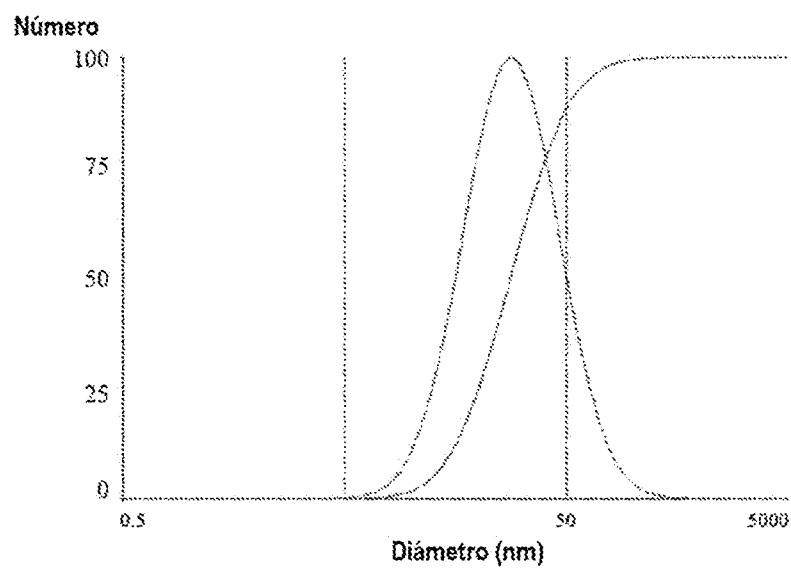


FIG. 22C

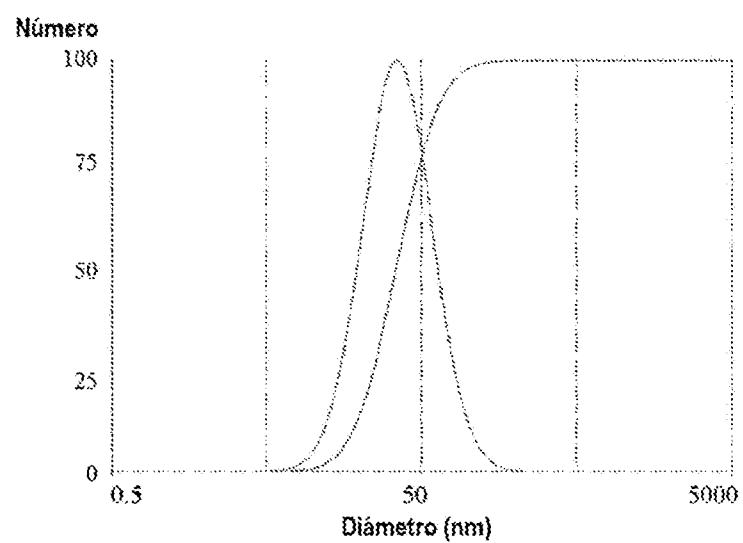


FIG. 22D

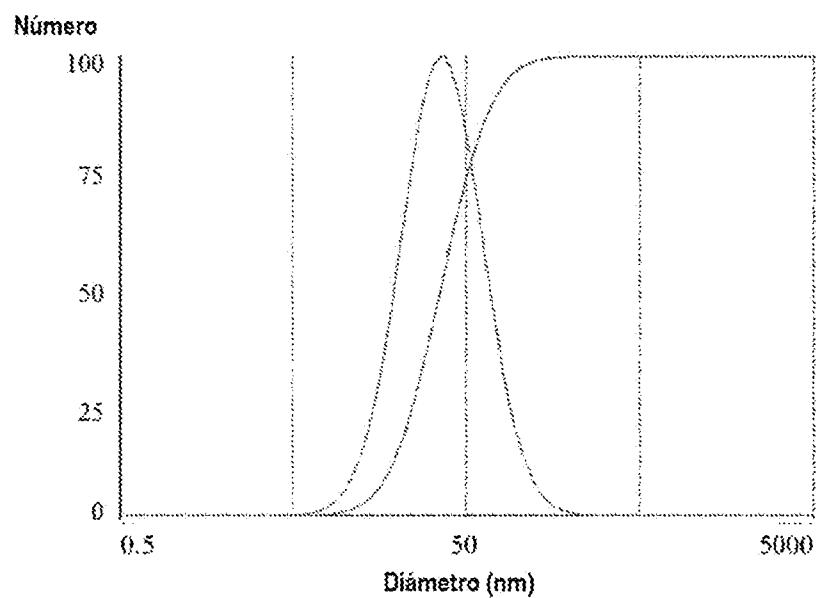


FIG. 22E

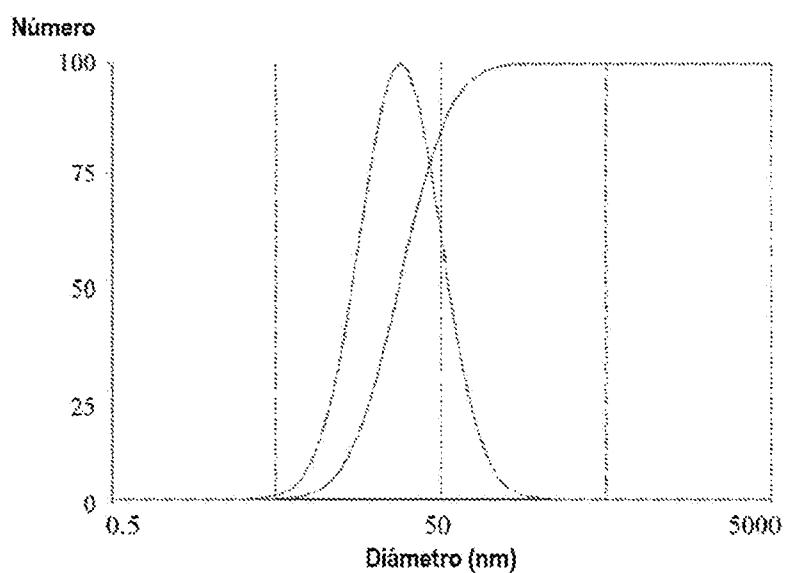


FIG. 23A

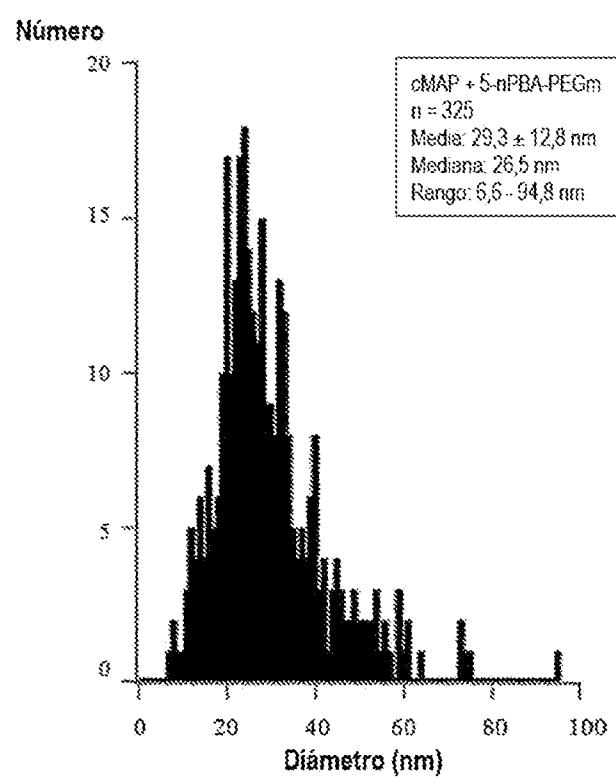


FIG. 23B

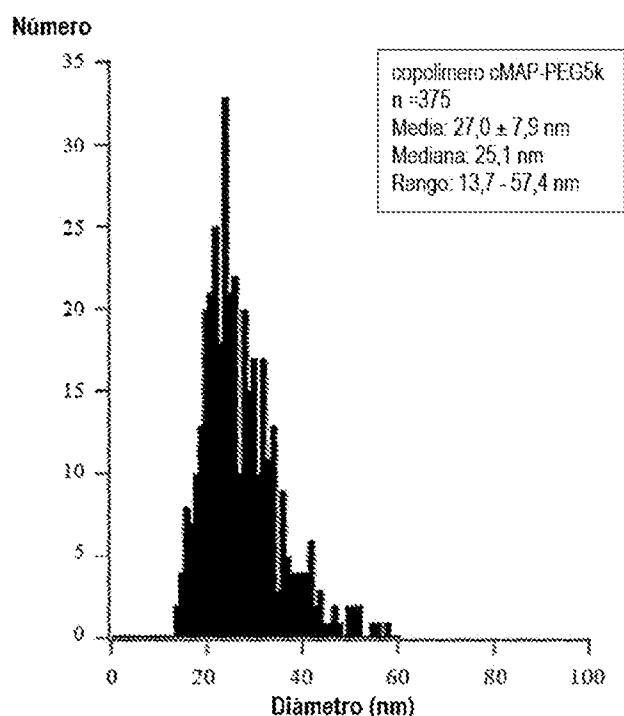


FIG. 23C

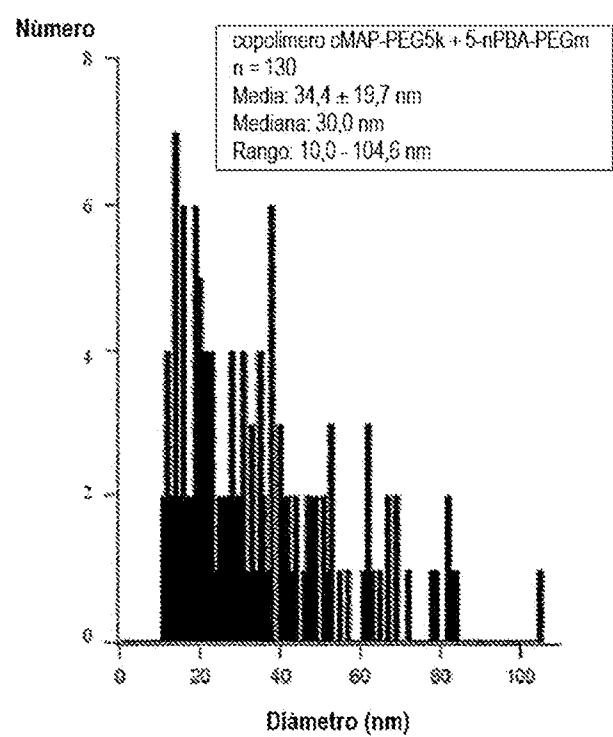


FIG. 23D

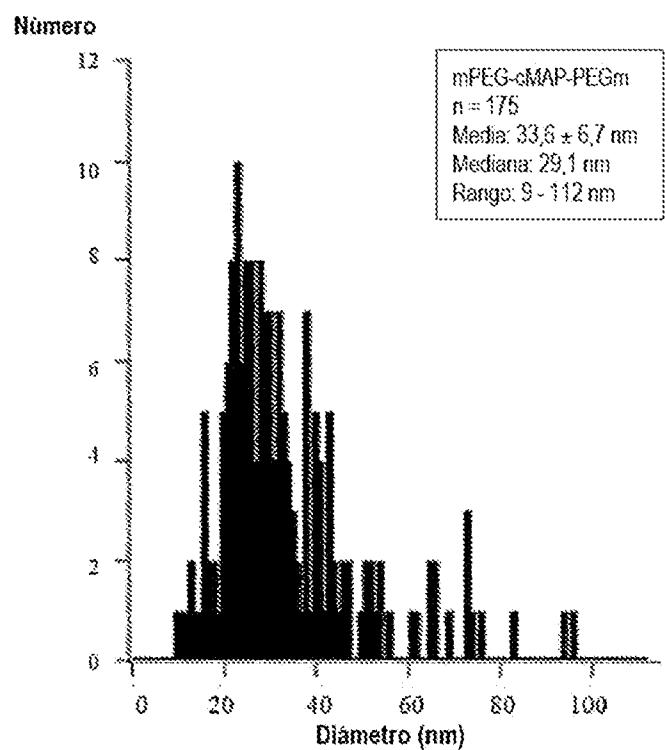


FIG. 23E

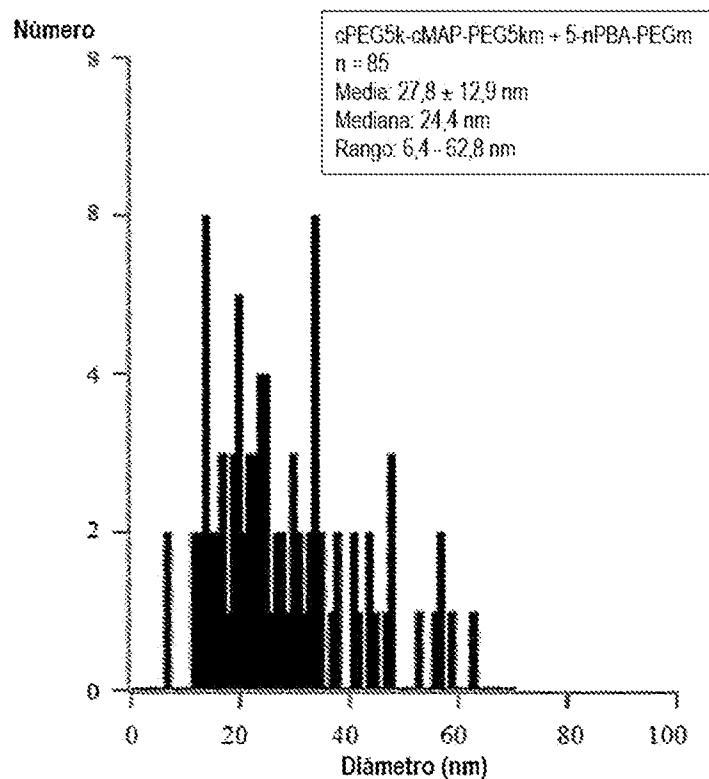


FIG. 24A

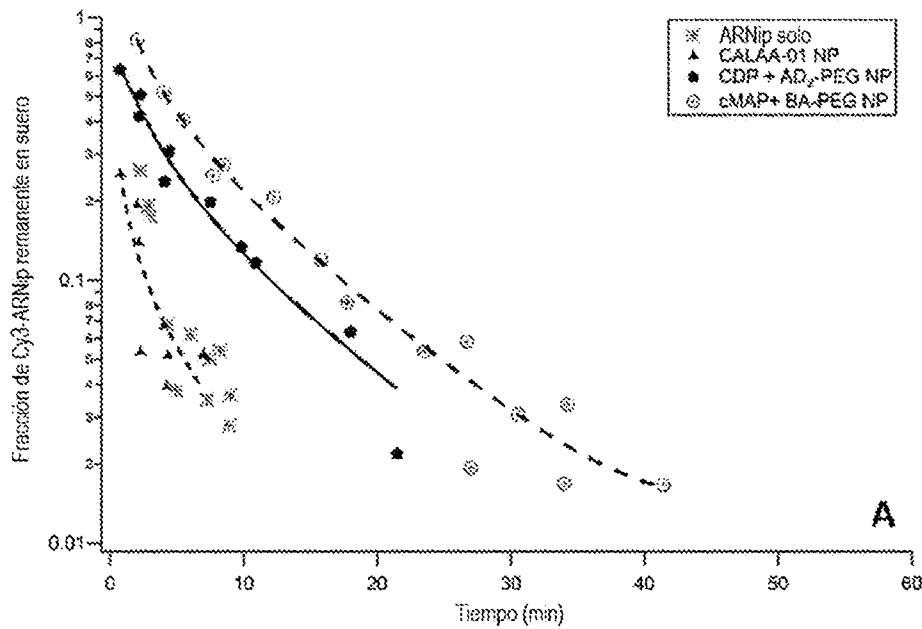


FIG. 24B

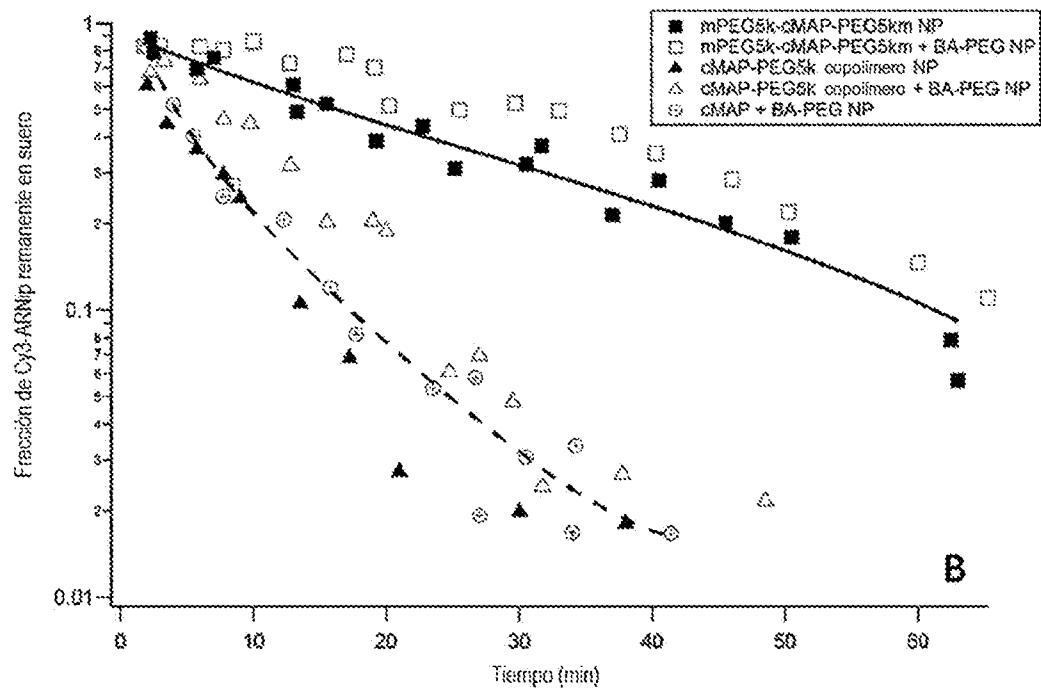


FIG. 24C

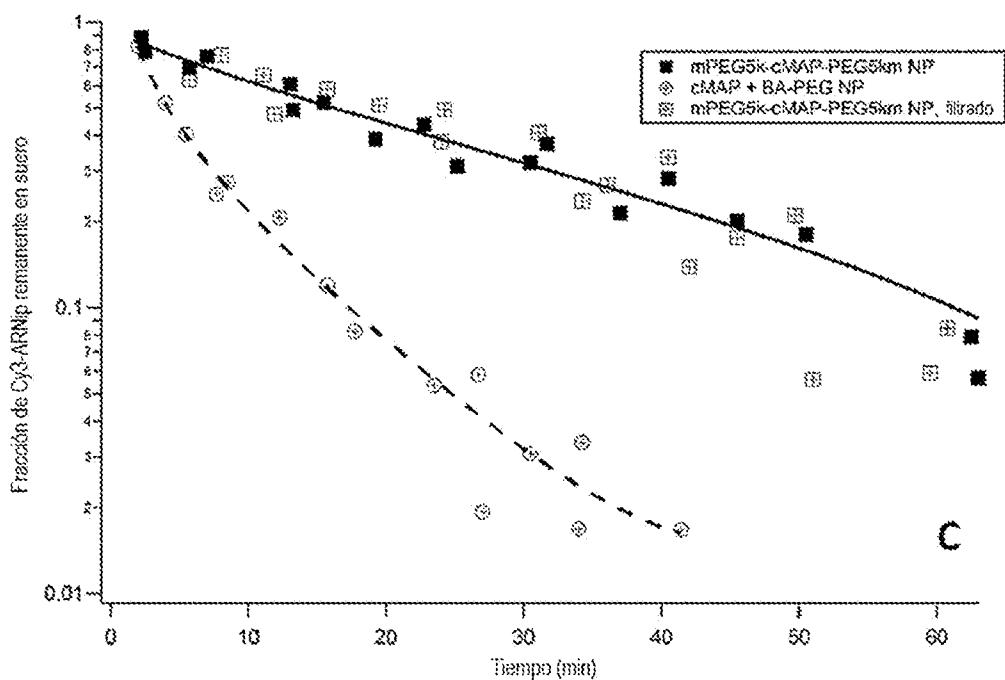


FIG. 25

