

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 348**

21 Número de solicitud: 202031074

51 Int. Cl.:

C08G 79/025 (2006.01)

A61K 47/59 (2007.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.03.2021

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GARCIA MAZAS, Carla Maria;
CSABA, Noemi y
GARCIA FUENTES, Marcos**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **POLÍMEROS PARA TERAPIA GÉNICA**

57 Resumen:

Polímeros para terapia génica. La presente invención se refiere a un polímero, más concretamente un polímero polifosfaceno, que es útil para terapia génica. La invención también se refiere un complejo que comprende el polímero, al procedimiento de preparación y a sus usos.

ES 2 809 348 A1

DESCRIPCIÓN

Polímeros para terapia génica

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un polímero, más concretamente un polímero polifosfaceno que es útil para terapia génica. La invención también se refiere un complejo
5 que comprende el polímero, al procedimiento de preparación y a sus usos.

Antecedentes

En terapia génica, además de en otras áreas biomédicas, se requieren nuevos materiales biodegradables y los polímeros desempeñan un papel crítico en este campo. En comparación con los polímeros naturales, los polímeros biodegradables sintéticos generalmente están
10 mejor definidos y son más fáciles de modular con respecto a sus propiedades mecánicas y de degradación. Los poliésteres como polilactida (PLA), poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o policaprolactona (PCL) son algunos de los polímeros sintéticos más utilizados como biomateriales, pero más recientemente, se han comenzado a investigar otras familias de polímeros, como los polifosfacenos (*Hsu WH, Csaba N, Alexander C, Garcia-Fuentes M.*
15 *Polyphosphazenes for the delivery of biopharmaceuticals. J. Appl. Polym. Sci. 2019, 137(25)).*

Los polifosfacenos son una familia relativamente nueva de polímeros basados en un esqueleto de nitrógeno-fósforo donde se pueden insertar grupos laterales.

El primer polifosfaceno del que se tiene constancia, publicado por Stokes en 1897, fue
20 obtenido por calentamiento (250 °C) de una mezcla de PCl_5 y NH_4Cl . Debido a su insolubilidad y al desconocimiento sobre su estructura química, en un primer momento se le denominó “caucho inorgánico”. En 1956, Allcock y colaboradores realizaron la primera síntesis estable de polifosfacenos, momento a partir del cual este tipo de materiales comenzó a tener mayor interés para su uso en aplicaciones biomédicas. El esquema desarrollado por
25 Allcock sigue siendo la base del procedimiento más general para la síntesis lineal de polifosfacenos: el precursor, poli(diclorofosfaceno) (PDCP), se prepara en el primer paso, y luego, el polímero final se forma por sustitución nucleofílica de las cadenas laterales deseadas.

Dado que la ruta sintética de los polifosfacenos es muy versátil, es posible agregar muchas
30 funcionalidades diferentes que modifican completamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los polímeros. De esta forma, los polifosfacenos pueden diseñarse

incorporando una serie de grupos laterales orgánicos que hacen que estos materiales sean biodegradables y altamente biocompatibles (*Hsu WH, Sanchez-Gomez P, Gomez-Ibarlucea E, Ivanov DP, Rahman R, Grabowska AM, Csaba N, Alexander C, Garcia-Fuentes M. Structure-Optimized Interpolymer Polyphosphazene Complexes for Effective Gene Delivery against Glioblastoma. Adv. Ther. 2018, 2(3)*). Estas particularidades de los polifosfacenos, han estimulado un interés creciente, particularmente concentrado en algunas áreas como la ingeniería de tejidos, la administración de genes, la administración de proteínas y la vacunación. Particularmente crítico para este interés es la biodegradabilidad de la mayoría de los poli(organofosfacenos) y la flexibilidad química de estos materiales. Aunque otros tipos de polímeros también pueden ser químicamente diversos, los ingenieros encuentran atractiva la vía de síntesis especial de los polifosfacenos, donde se modifica un precursor para adaptar la estructura del material y cumplir con los requisitos de aplicaciones específicas. Esta ruta de síntesis simplifica la adaptación de las tecnologías existentes a nuevas áreas de interés (*Hsu WH, Csaba N, Alexander C, Garcia-Fuentes M. Polyphosphazenes for the delivery of biopharmaceuticals. J. Appl. Polym. Sci. 2019, 137(25)*).

Aún así, todavía es necesario disponer de derivados de polifosfacenos que permitan una mejor transfección y sean seguros biológicamente. Y más aún, que puedan cargar efectivamente moléculas biológicas para mejorar la transfección de las mismas.

Descripción breve de la invención

Los autores de la invención han diseñado y preparado diferentes polifosfacenos que son adecuados para la transfección de moléculas biológicas.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un polifosfaceno que comprende:

- al menos una cadena hidrocarbonada (A) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el extremo de la cadena es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, opcionalmente la cadena hidrocarbonada tiene entre 1 y 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre hidroxilo y tiol; y,
- al menos una cadena hidrocarbonada (B) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el grupo terminal de la cadena es un grupo de fórmula -NH₂.

Además, los polifosfacenos de la invención son capaces de formar complejos con moléculas biológicas. Y así, un segundo aspecto de la invención se dirige a un complejo que comprende un polifosfaceno del primer aspecto de la invención y una molécula biológicamente activa.

En otros aspectos, la invención se refiere al uso del polifosfaceno o del complejo de la invención, a una composición farmacéutica, a un kit y procedimiento de preparación de los mismos.

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de síntesis y modificación del precursor de polifosfacenos mediante la química del tiol-eno.

Figura 2. Actividad metabólica celular de la línea comercial correspondiente a glioblastoma humano (U87MG) y que ha sido tratada con diferentes concentraciones de nanocomplejos (ratio 8.0.1 y 8.4.1) a las 48 horas después del tratamiento. Las concentraciones se expresan en μg de plásmido para comparar las toxicidades de las formulaciones con la misma capacidad de carga.

Figura 3. Transfección en cultivos bidimensionales de la línea celular de glioblastoma humano (U87MG) medida por luminiscencia 48 horas después de la transfección y tras la adición del sustrato luciferina. Los resultados se expresan con respecto a la luminiscencia de lipofectamina (control de transfección).

Figura 4. Ensayo de clonogenicidad en dos líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87MG). Se estudió la capacidad clonogénica de las células después de la incubación durante 48 h con los diferentes tratamientos, los datos se expresan en número de unidades formadoras de colonias por placa (las células no tratadas se asumieron como 100%); Tz: temozolomida; NCs: nanocomplejos; BMP4: Proteína morfogénica ósea ($p < 0.05$).

Figura 5. Eficacia *in vivo* de la formulación sola y en combinación con un agente quimioterápico. A. Evolución del volumen del tumor. B. Evolución del volumen del tumor corregida por su volumen antes de la administración del tratamiento. C. Evolución en el peso de los ratones. D. Porcentaje de supervivencia de los ratones teniendo en cuenta que los animales con necrosis en el tumor o un tamaño superior a 1500mm^3 , se sacrificaron con el fin de reducir el sufrimiento del animal. Las flechas rojas ilustran las cuatro administraciones

en días consecutivos. Leyenda de los grupos de tratamiento: Control (circulo gris), Nanocomplejos blancos (triángulo gris), Proteína-BMP4 + Temozolomida (triángulo negro invertido), Temozolomida (cuadrado gris), Nanocomplejos-BMP4 (rombo negro), Nanocomplejos-BMP4 + Temozolomida (circulo negro).

- 5 Figura 6. Fotografías de los tumores diseccionados después de la eutanasia de los ratones. NCs: Nanocomplejos; BMP4: Proteína morfogénica del hueso-4; Tz: Temozolomida.

Figura 7. Representaciones de la expresión de genes implicados en el desarrollo de los tumores, la expresión se analizó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). NCs: Nanocomplejos; BMP4: Proteína morfogénica del hueso-4; Tz: Temozolomida.

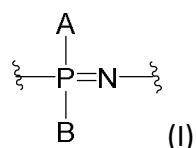
10

Descripción detallada de la invención

Como se ha comentado anteriormente, en un primer aspecto la invención se dirige a un polifosfaceno que comprende:

- 15 - al menos una cadena hidrocarbonada (A) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el extremo de la cadena es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, opcionalmente la cadena hidrocarbonada tiene entre 1 y 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre hidroxilo y tiol; y,
- 20 - al menos una cadena hidrocarbonada (B) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el grupo terminal de la cadena es un grupo de fórmula -NH₂.

Cada unidad monomérica del polifosfaceno se puede representar por la siguiente fórmula:



- 25 De modo que el átomo de fósforo está unido a una cadena de tipo (A) y a una cadena de tipo (B). En una realización particular, los polifosfacenos de la invención tienen entre 150 y 600 unidades monoméricas. En una realización más particular, los polifosfacenos de la invención tienen entre 200 y 500 unidades monoméricas.

Para la presente invención se entiende por “cadena hidrocarbonada de entre 6 y 24 eslabones” un hidrocarburo que tiene entre 6 y 24 átomos de carbono en su esqueleto y que puede ser lineal o ramificada. Entre 1 y 4 átomos de carbono de estas cadenas hidrocarbonadas pueden haber sido sustituidos por heteroátomos. Así, en las cadenas hidrocarbonadas puede haber 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos que están formando parte de la cadena, ocupando un eslabón de la misma. Dichos heteroátomos se seleccionan de entre O, N y S. Preferiblemente, las cadenas hidrocarbonadas tienen entre 6 y 16 eslabones. Preferiblemente, 2 ó 3 eslabones de las cadenas hidrocarbonadas son heteroátomos seleccionados independientemente entre N y S.

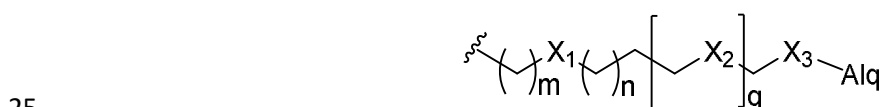
- 10 Para la presente invención se entiende por “sustituyente” un conjunto de átomos que tienen una función química, es decir, un grupo funcional, que se encuentra unido a la cadena hidrocarbonada en alguna de sus posiciones, pero no forma parte de la misma.

Para la presente invención se entiende por “extremo de la cadena” la parte final de la cadena hidrocarbonada (A), siendo el inicio de ese extremo de la cadena el eslabón siguiente al heteroátomo inmediatamente anterior al extremo, o lo que es lo mismo, el heteroátomo situado en el eslabón más alejado del átomo de fósforo.

Para la presente invención se entiende por “grupo terminal” un conjunto de átomos que tienen una función química, es decir, un grupo funcional, que ocupa la posición del extremo de la cadena hidrocarbonada.

- 20 Los polifosfacenos de la invención se caracterizan porque comprenden una cadena hidrocarbonada (A) cuyo grupo alquilo en el extremo de la cadena, es un grupo con carácter alifático e hidrofóbico. La presencia de grupos hidrofóbicos en el polímero presenta la ventaja de que mejora su difusión a través de las membranas celulares.

En una realización particular, la cadena hidrocarbonada (A) tiene la siguiente estructura:



donde m puede tener el valor 0, 1 o 2,

n puede tener el valor 1, 2 o 3,

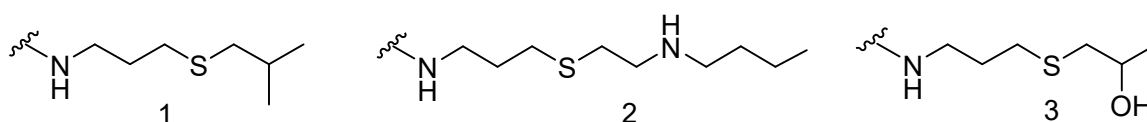
q puede tener el valor 0 o 1,

cada X_1 , X_2 y X_3 se seleccionan de manera independiente de entre los átomos de NH, S y O,

Alq es un alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado, opcionalmente tiene un sustituyente seleccionado de entre un grupo hidroxilo o tiol. Alq es lo que hemos denominado anteriormente el extremo de la cadena. Preferiblemente, metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo y terc-butilo.

En una realización particular, estas cadenas hidrocarbonadas (A) tienen un heteroátomo en la posición 1 de la cadena, más particularmente ese heteroátomo es N. En otra realización particular, las cadenas hidrocarbonadas (A) tienen un heteroátomo en la posición 5, más particularmente ese heteroátomo es S. En otra realización particular, las cadenas hidrocarbonadas (A) tienen dos heteroátomos en las cadenas, en la posición 1 un N y en la posición 5 un S.

En una realización particular, las cadenas hidrocarbonadas (A) de los polifosfacenos de la invención se seleccionan de entre el grupo que consiste en:



Los polifosfacenos de la invención también se caracterizan porque comprenden una cadena hidrocarbonada (B) con un grupo terminal $-NH_2$. Este grupo terminal presenta la ventaja de incrementar la capacidad de carga de proteínas o ácidos nucleicos mediante interacción electrostática.

En una realización particular, estas cadenas hidrocarbonadas (B) tienen un heteroátomo en la posición 1 de la cadena, más particularmente ese heteroátomo es N. En otra realización particular, las cadenas hidrocarbonadas (B) tienen un heteroátomo en la posición 5, más particularmente ese heteroátomo es S. En otra realización particular, las cadenas hidrocarbonadas (B) tienen dos heteroátomos en las cadenas, en la posición 1 un N y en la posición 5 un S.

La presencia de las cadenas hidrocarbonadas (A) y (B) con las características técnicas expuestas anteriormente, en los polifosfacenos de la invención, favorece la capacidad de carga y la internalización de moléculas biológicamente activas, y el efecto final que se obtiene que una transfección mucho más eficiente.

Además, los polifosfacenos de la invención forman complejos con moléculas biológicamente activas. Así, en un segundo aspecto la invención se dirige a un complejo que comprende un polifosfaceno, como se ha descrito anteriormente, y una molécula biológicamente activa.

- 5 En una realización particular, los complejos de la invención tienen un tamaño de partícula de entre 50 nm y 300 nm, preferiblemente entre 80 nm y 200 nm. En una realización particular, los complejos de la invención tienen una carga superficial de entre + 20 mV y +50 mV.

- En una realización particular, la molécula biológicamente activa se selecciona de entre
10 proteína y polinucleótido. En una realización más particular, la molécula biológicamente activa es un plásmido que codifica BMP-4.

Además, los complejos de la invención pueden incorporar también un polifosfaceno aniónico.

- Para la presente invención, se entiende por “polifosfaceno aniónico” aquel polifosfaceno que
15 tiene grupos aniónicos, por ejemplo grupos carboxílicos.

En una realización particular, el polifosfaceno aniónico comprende una cadena hidrocarbonada de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y al menos un grupo carboxílico.

- Los complejos de la invención que comprenden además polifosfacenos aniónicos tienen la
20 ventaja de ser menos tóxicos como se demuestra en el ejemplo 3.1. y la figura 2. Más aún, estos complejos tienen una capacidad de transfección mayor, como se demuestra en el ejemplo 4 y la figura 3. Siendo el que tiene mayor capacidad de transfección PPZ-Alifático.

- En una realización preferida, la invención se dirige a un complejo que comprende un polifosfaceno de la invención, un polifosfaceno aniónico y una molécula biológicamente
25 activa. En una realización más preferida, la invención se dirige a un complejo que comprende un polifosfaceno de la invención cuya cadena de tipo (A) tiene la fórmula 1.

En una realización particular, los complejos de la invención comprenden además una molécula quimioterapéutica. En una realización más particular, la molécula quimioterapéutica es temozolomida.

En otro aspecto, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende el complejo de la invención y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se dirige a los polifosfacenos de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

- 5 En una realización particular, la invención se dirige a los polifosfacenos de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso en terapia génica u oncología, o para su uso en el tratamiento de tumores cerebrales, preferiblemente, glioblastomas.

- En otro aspecto la invención se dirige a un kit que comprende al menos dos recipientes donde uno de los recipientes comprende un complejo de la invención, y el otro recipiente
10 comprende una molécula quimioterapéutica, junto con instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad para administración secuencial o simultánea de ambos ingredientes.

En otra realización la invención se dirige al uso del complejo de la invención en la elaboración de vectores para el transporte de moléculas biológicamente activas.

15

Materiales y Métodos

- Cloruro de aluminio (99.99%), Tetrahidrofurano anhidro (THF), Cisteamina (Cis), Cloroformo-deuterado (99.96 atom % D contiene 0.03% TMS), Oxido de deuterio (99.9 atom % D, contiene 0.05% peso ácido 3-(trimetilsilil)propionico-2,2,3,3-d4), Heparina en
20 forma de sal sódica (de mucosa intestinal porcina), HEPES ($\geq 99.5\%$), Hexaclorociclotrifosfaceno (99%), Cloruro potasico (BioXtra $\geq 99\%$), Trietilamina (TEA), Tris-Acetato-EDTA solución tampón (10x), 1-mercapto-2-propanol (MP), 2-butilamino)etanotiol (BET), Hidrocloruro de 2-(dimetilamino)etanotiol (DMAES), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), 2-metil-1-propanotiol
25 (MPT), Ácido 6-mercaptohexanoico (6MHA), Temozolomida, Xilazina todos ellos fueron comprados a Sigma-Aldrich. Ketamina para la anestesia fue pedida a Pfizer. Etanol, Cristal violeta y ácido acético glacial se adquirieron de Merk. Agua libre de ADNsas/ARNsas (Invitrogen), Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), OptiMEM (Gibco), Medio Eagle esencial minimo (EMEM), Suero fetal bovino (FBS) (Gibco), Penicilina-
30 Estreptomicina para medio de cultivo (Gibco), Membrana de dialisis (tamaño de poro 7kDa), agente transfectante Lipofectamina 2000 (Life Technologies), tinte para ácidos nucleicos

SYBR® Gold (Life Technologies) fueron adquiridos a Thermo Fisher. El test para determinación de proteínas Bio-Rad se compró a BioRad (CA, EE. UU.), Test para determinación de Luciferasa Roche (Alemania) Kit para determinación de proliferación celular MTS BioVision (EE. UU.), Alamar Blue Promega (España). Proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) se le compró a Preprotech (Reino Unido). El plásmido que expresa BMP4

5 proviene de Sino Biological Inc. (Alemania).

Ejemplo 1. Preparación de polifosfacenos catiónicos y polifosfaceno aniónico.

1.1. Síntesis del precursor poli(alilamino-fosfaceno)

10 La síntesis del precursor se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por el Dr. Wei-Hsin Hsu (Hsu, W.-H., Sánchez-Gómez, P., Gomez-Ibarlucea, E., Ivanov, D. P., Rahman, R., Grabowska, A. M., Garcia-Fuentes, M. (2019). Structure-Optimized Interpolymer Polyphosphazene Complexes for Effective Gene Delivery against Glioblastoma. *Advanced Therapeutics*, 2(3), 1800126. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800126>). En un matraz

15 previamente seco, se mezclaron 14,4 mmol de hexaclorociclofosfaceno con cloruro de aluminio al 7,5% (p/p) (catalizador) en una atmósfera inerte de nitrógeno y se calentó a 240-250°C durante 3 horas, el cloruro de aluminio produjo la polimerización tras la apertura del anillo y la eliminación de parte de los cloruros dando como producto diclorofosfaceno. Después, el producto se enfrió a 120°C y se solubilizó en diglima para minimizar la

20 reticulación y evitar la solidificación del producto y se centrifugó para eliminar el cloruro de aluminio (-10°C, 7000G, 5 min). El sobrenadante se transfirió a un matraz con THF, TEA (3 equivalente/cloro) y alilamina (3 equivalentes/cloro), la reacción se mantuvo en un baño de hielo durante 24h y luego 24h a temperatura ambiente. El producto resultante se filtró para eliminar el clorhidrato de TEA y se precipitó con agua, después se centrifugó (4°C,

25 7000G, 10 min) y el precipitado se recogió y se secó al vacío durante la noche (Figura 1). El alilfosfaceno (APPZ) se caracterizó por resonancia magnética de fósforo, protón y DOSY.

1.2. Modificación del precursor mediante química del tiol-eno

Las cadenas laterales del precursor se modificaron mediante la química del tiol-eno para introducir diferentes radicales, el grupo tiol de los nuevos compuestos reacciona con el grupo

30 alilo del precursor obteniendo cinco polifosfacenos diferentes.

El producto obtenido en el punto anterior se disolvió en trifluoroetanol (TFE) y se mezcló con el o los sustituyente(s) deseado(s) en la siguiente proporción: 3 equivalentes/grupo alilo.

Los sustituyentes empleados fueron: 1-mercapto-2-propanol (para obtener el polifosfaceno PPZ-Hidroxilo), 2- (butilamina) etanotiol (para obtener el polifosfaceno PPZ-Amina2), 2-metil-1-propanotiol (para obtener el polifosfaceno PPZ-Alifático). La mezcla se burbujeó con nitrógeno para conseguir una atmósfera inerte y se añadió el catalizador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMAES) (0,05 equivalentes/grupo alilo). La reacción tuvo lugar durante 3h con agitación magnética e irradiación UV ($\lambda = 365$ nm) (Figura 1). Después, el producto se dializó (tamaño de poro de la membrana 7 kDa) contra HCl 2 mM durante 24 horas y 48 horas contra agua. El dializado se liofilizó y los compuestos se caracterizaron por RMN de fósforo y protón, COSY y HSQC.

- 10 También se sintetizó el polifosfazeno PPZ-Amino1 para poder compararlo con los polifosfacenos de la invención. Este polifosfaceno se preparó como se indica anteriormente y empleando cisteamina como reactivo para reaccionar con el alilfosfaceno.

También se sintetizó un polifosfazeno aniónico (PPZ-aniónico) empleando ácido 6-mercaptohexanoico como sustituyente, empleando una proporción de 3 equivalentes de ácido mercaptohexanoico / grupo alilo para reaccionar con el alilfosfaceno, siguiendo las instrucciones anteriormente descritas.

Los porcentajes de sustitución de cada sustituyente en los heteropolímeros es del 50% para el PPZ-Alifático. Sin embargo, para el PPZ-Amina2 la sustitución es el 68% del radical cisteamina y el 32% del radical 2- (butilamina) etanotiol y en el caso de PPZ-Hidroxilo, la sustitución fue del 33% del grupo radical cisteamina y del 66% del radical 1-mercapto-2-propanol.

Para determinar la masa molar de los polímeros, éstos se disolvieron en cloruro sódico 10mM a una concentración de 5mg/mL y se midieron mediante flujo asimétrico de fraccionamiento campo-flujo (AF4) mediante AF2000 MultiFlow acoplado a un detector de dispersión de luz multiángulo (MALS) (Postnova, Germany). El detector se calibró con un estándar de monómeros de albúmina de suero bovino (66 kDa) y el control de calidad se realizó cada día mediante pululano (48.8 kDa).

Tabla 1 Masa molar del polímero y distribución medida mediante AF4.

	Mw (g/mol)	Mn(g/mol)	Đ
PPZ-Alifático	$1.48 \pm 0.01 \times 10^5$	$1.08 \pm 0.1 \times 10^5$	1.37
PPZ-Amina2	$1.10 \pm 0.1 \times 10^5$	$7.98 \pm 0.5 \times 10^4$	1.37

PPZ-Hidroxilo	$8.18 \pm 0.1 \times 10^4$	$6.5 \pm 0.9 \times 10^4$	1.26
PPZ-Aniónico	$6.16 \pm 0.3 \times 10^4$	$5.11 \pm 0.2 \times 10^4$	1.21
PPZ-Amina1	$1.19 \pm 0.1 \times 10^5$	$8.83 \pm 1.3 \times 10^4$	1.35

Mw: Peso molecular promedio en peso; Mn: Peso molecular promedio en número; Đ: Índice de polidispersión.

5 Ejemplo 2. Formación de los nanocomplejos

Ejemplo 2.1. Formación del nanocomplejo con un plásmido

Los nanocomplejos se prepararon por complejación iónica, usando un plásmido modelo que codifica la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) y luciferasa (Luc). Los polímeros se disolvieron en HEPES 10 mM (pH 5,5) y el plásmido en agua. La formación de los complejos tiene lugar por complejación iónica cuando se añade el plásmido, o la mezcla del plásmido con el polímero aniónico, sobre la solución de polímero catiónico con agitación magnética. Se han preparado diferentes relaciones de carga, en el caso de nanocomplejos que contienen sólo polímero catiónico, las relaciones se basan en el número de aminas cargadas positivamente del polímero catiónico (N) y fosfatos cargados negativamente del plásmido (F), en el caso de nanocomplejos que también contienen polímero aniónico, las relaciones se establecieron entre el número de aminas cargadas positivamente del polímero catiónico (N), el número de grupos carboxilo cargados negativamente del polímero aniónico (C) y el número de grupos fosfato cargados negativamente de ADNc (F), por lo tanto N/F y N/C/F, respectivamente. Los nanocomplejos se prepararon para una concentración final de plásmido encapsulado de $25 \mu\text{g} / \text{mL}$, para poder así comparar las formulaciones entre sí, teniendo todas ellas la misma cantidad de plásmido.

Caracterización del tamaño, carga superficial y concentración de nanocomplejos

La caracterización de los nanocomplejos, en términos de tamaño, se realizó utilizando Dispersión dinámica de la luz (DLS) y el potencial Zeta se determinó mediante anemometría láser doppler utilizando un instrumento Nanosizer ZS (Malvern, Reino Unido). Cada análisis se realizó por triplicado a 25°C , con un ángulo de retrodispersión de 173° . La concentración de nanocomplejos se determinaron mediante el análisis de seguimiento de nanocomplejos utilizando un sistema Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino

Unido) equipado con un láser que mide a $\lambda = 488$ nm, después de diluir las muestras 1: 400 en HEPES 10 mM. En el caso del potencial zeta, las mediciones se realizaron con dilución 1:10 en KCl 1 mM.

Tabla 2 Caracterización de nanocomplejos catiónicos mediante tamaño y carga superficial.

5 nm: nanómetros; PDI: Polidispersión; mV: milivoltios.

	Nanocomplejos (N:F)	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial (mV)
PPZ-Alifático	4:1	131±2	0.2	+46±3
	8:1	141±4	0.2	+54±1
	16:1	149±6	0.3	+54±2
PPZ-Amina2	4:1	96±7	0.2	+48±3
	8:1	110±5	0.1	+53±4
	16:1	122±5	0.2	+56±2
PPZ-Hidroxilo	4:1	101±3	0.1	+31±2
	8:1	116±2	0.1	+34±4
	16:1	117±3	0.1	+41±3
PPZ-Amina1	4:1	110±7	0.2	+46±2
	8:1	129±7	0.1	+51±1
	16:1	128±5	0.2	+54±1

La ratio polímero : plásmido afecta al tamaño y a la carga superficial de los nanocomplejos. cuando aumenta la proporción de polímeros catiónicos, la carga superficial de los nanocomplejos aumenta ligeramente siendo positiva en todos los casos, con respecto al tamaño podemos observar una pequeña variación aunque todos los prototipos mostraron un tamaño de entre 100-150nm, lo que los hace adecuados como vectores en terapia génica.

Tabla 3 Caracterización de nanocomplejos catiónicos y aniónicos mediante tamaño y carga superficial, y concentración. nm: nanómetros; PDI: Polidispersión; mV: milivoltios.

Proporción N.C.F	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial (mV)	Concentración (partículas/mL)
PPZ-Alifático 8.0.1	150±4	0.2	+ 38±3	5,45±0,1 x 10 ¹⁰
PPZ-Alifático 8.4.1	143±4	0.2	+ 32±3	1,69±0,05 x 10 ¹¹
PPZ-Amina2 8.0.1	126±4	0.2	+ 37±4	6,94±0,3 x 10 ¹⁰
PPZ-Amina2 8.4.1	129±3	0.1	+ 31±3	1,55±0,04 x 10 ¹¹

PPZ-Hidroxilo 8.0.1	111±3	0.1	+ 38±2	7,22±0,3 x 10 ¹⁰
PPZ-Hidroxilo 8.4.1	135±3	0.1	+ 39±3	1,71±0,05 x 10 ¹¹
PPZ-Amina1 8.0.1	119±2	0.2	+ 36±2	5,29±0,2 x 10 ¹⁰
PPZ-Amina1 8.4.1	122±2	0.1	+ 35±4	1,62±0,08 x 10 ¹¹

El tamaño de todos los nanocomplejos formados está entre 100 y 150 nm, la carga superficial entre +30 y +40 mV y se observó que la concentración de nanocomplejos que asocian los polímeros catiónicos y el aniónico es entre 2 y 3 veces mayor que las que contienen sólo polímeros catiónicos.

El análisis morfológico se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (Zeiss Gemini Ultra Plus, Alemania) y utilizando microscopía electrónica de transmisión de exploración (STEM) y detectores de lentes de inmersión (InLens) para la observación de la muestra. Para la preparación de la muestra, se colocaron 10 µL de los nanocomplejos en una rejilla de cobre con películas de carbono y se eliminó el exceso. Luego se añadió el mismo volumen de ácido fosfotúngstico (2%) y se lavó dos veces con agua. Una vez seca, la muestra se observó a través de detectores STEM y lentes de inmersión (InLens).

En todos los casos las partículas son esféricas y que las que contienen polímero aniónico muestran una mayor intensidad, lo que puede ser indicativo de una mayor densidad de partícula en comparación con las catiónicas.

Eficiencia asociación del ácido nucleico en los nanocomplejos

La eficiencia de unión de los nanocomplejos se determinó por ensayo de retardo en gel de agarosa. Las muestras se cargaron en el gel de agarosa (1% p/v en tampón Tris-EDTA 1x). Cada pocillo contenía 0,33 µg de ADNc, se usó plásmido libre como control. Para la visualización de la muestra y facilitar la carga, todas las muestras contenían 1x SYBR® Gold para tinción de ácido nucleico y tampón de carga (30% de glicerol y 0.25% de azul de bromofenol). El ensayo de disociación se realizó incubando muestras con un exceso de un competidor aniónico (20: 1 p / p heparina: ADNc) durante 1 hora a 37°C.

Se demostró que el ácido nucleico no se une irreversiblemente al vehículo y puede liberarse en el medio fisiológico y realizar su función.

Ejemplo 2.2. Formación del nanocomplejo con una proteína

Los nanocomplejos se prepararon por complejación iónica, usando una proteína modelo, heparina. Los polímeros se disolvieron en HEPES 10 mM (pH 5,5) y la proteína en agua. La formación de los complejos tiene lugar por complejación iónica cuando se añade la proteína, o la mezcla de la proteína con el polímero aniónico, sobre la solución de polímero catiónico con agitación magnética.

Se midieron el tamaño, la polidispersión (PDI) y la carga de los nanocomplejos preparados.

Tabla 4. Caracterización de nanocomplejos catiónicos y aniónicos mediante tamaño y carga superficial. nm: nanómetros; PDI: Polidispersión; mV: milivoltios.

Ratio de masa (PPZ-Alifático: PPZ- Aniónico-heparina)	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial (mV)
8.0.1	137±3	0.2	+ 39±2
8.0.2	136±4	0.2	+ 40±1
8.3.1	142±3	0.2	+ 42±3
8.3.2	155±12	0.3	+ 24±1

10 Ejemplo 3. Estudios de toxicidad

3.1. Toxicidad *in vitro* 2D

Todos los ensayos *in vitro* se realizaron en células de glioblastoma humano U87MG cultivadas en medio DMEM (Gibco, EE. UU.) Suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco, EE. UU.) y penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% (Gibco, EE. UU.) incubándolas a 37°C, atmosfera saturada de humedad y 5% de CO₂. En todos ellos el control negativo es medio y el control positivo es Tritón 0.1%.

Para el ensayo de toxicidad 2D, se sembraron 8.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron 24 horas antes del tratamiento para permitir su adherencia al fondo del pocillo. Luego, los nanocomplejos se incubaron en medio suplementado durante 4 horas a diferentes concentraciones de referencia a la concentración de plásmido (0,1-2 µg /cm²). Después, se lavaron con PBS, se añadió medio fresco y se dejaron crecer 48h más. La evaluación de citotoxicidad se realizó agregando 10 µl de MTS por pocillo (BioVision, EE. UU.) Y se midió la absorbancia después de 3 h de incubación en un lector de placas a 495 nm.

La figura 2 muestra que en todos los casos hubo una disminución en la toxicidad de los nanocomplejos que contienen el polímero aniónico en comparación con las que únicamente contienen polímero catiónico.

3.2. Toxicidad *in vitro* 3D

- 5 Para el ensayo de toxicidad 3D, en primer lugar se formaron las neuroesferas, se sembraron 500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de ultra baja adherencia, las células se centrifugaron 20 minutos a 200 rcf. Después de 3 días, los nanocomplejos se incubaron durante 12 h a una concentración de nanocomplejos relativa a 2 µg plásmido/ml, después de 12 h los nanocomplejos se reemplazaron por medio fresco y las neuroesferas se incubaron
10 72 h más. Evaluamos dos parámetros: el tamaño de la neuroesfera a las 0, 24, 48 y 72 h y la citotoxicidad a las 72 h mediante el ensayo metabólico de reducción de resazurina (CellTiter-Blue®, Promega, EE. UU.). Para el ensayo metabólico, se añadieron 40 µl del reactivo por pocillo y se incubaron durante 4 h. La fluorescencia fue evaluada por un lector de placas a 539 nm de longitud de onda de excitación y 620 nm de emisión.
- 15 Se observó un crecimiento y una morfología similares en las neuroesferas no tratadas (control de viabilidad añadiendo medio de cultivo fresco) y las tratadas con las formulaciones, mientras que se observó una disgregación y disminución del tamaño en las neuroesferas tratadas con el tritón (control tóxico). Por otro lado, también se realizó una prueba metabólica con alamar blue y que ha mostrado que las formulaciones no son tóxicas
20 a esa concentración, datos concordantes con los obtenidos en el estudio de la evolución del crecimiento de las neuroesferas.

Ejemplo 4. Estudios de transfección *in vitro*

- Para el ensayo de transfección se utilizó la línea celular de glioblastoma U87MG, se sembraron 56,000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos múltiples en medio DMEM
25 suplementado con 10% FBS y 1% P/S. Después de 24 h, se añadieron nanocomplejos a una concentración de 0,5 µg de plásmido/cm² en medio OptiMEM (Gibco, EE. UU.) Y se incubaron durante 4 h. Después, se lavaron y se reemplazó por medio DMEM fresco y se incubaron las células durante 48 h. Para medir la transfección, se empleó el kit comercial Luciferase Reporter Gene Assay (Roche, Alemania). Las células se lavaron dos veces con
30 PBS y se añadieron 100 µl de tampón de lisis, después de 5 minutos el lisado se centrifugó. Se colocaron 50 µl del sobrenadante en una placa blanca y, utilizando un inyector automático, se agregaron 25 µl de luciferina del kit comercial inmediatamente antes de cada

medición de luminiscencia en un luminómetro Mithras LB940 (Berthold, Alemania). Los resultados se corrigieron para la proteína mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad (BioRad, EE. UU.), Se agregaron 40 µL del reactivo a la muestra y se midió la absorbancia a 595 nm.

En la figura 3 (los resultados se expresan como porcentaje de luminiscencia de lipofectamina) podemos ver que 48 horas después del tratamiento, los prototipos que contienen el polímero aniónico han mostrado un marcado aumento en la transfección en comparación con los prototipos catiónicos y el plásmido libre. La luminiscencia obtenida después de la transfección con PPZ-Alifático combinado con PPZ-Aniónico fue superior incluso en comparación con el transfectante comercial, lipofectamina.

Ejemplo 5. Estudios de toxicidad aguda en embriones de peces zebra (FET)

Para esta prueba, se ha seguido la regulación de OCDE, se seleccionaron huevos recién fecundados de pez zebra en torno a 2-3 horas después de la fertilización, concretamente se seleccionan en las etapas de blastómero de 16-32 células. Se colocaron diez huevos fertilizados viables en agua de osmosis por grupo, uno por pocillo. Los embriones se incubaron con diferentes concentraciones de los polímeros que forman los nanocomplejos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h y se observó toxicidad cada 24 horas hasta el final de la prueba. Las observaciones realizadas para determinar la toxicidad incluyen la detección de coagulación de embriones, falta de formación de somitas, desprendimiento de la cola, falta de latidos cardíacos (después de 48 h) y edema en el embrión.

Las formulaciones se diluyeron en agua de ósmosis inversa a diferentes concentraciones, para comparar la toxicidad de los nanocomplejos. Los embriones se incubaron 96h y se estudió su evolución cada 24 h hasta el final del estudio. La mortalidad del control negativo fue inferior al 10% y la tasa de eclosión fue superior al 80%. Para expresar los resultados de toxicidad, se calcularon los parámetros enumerados en la siguiente tabla; Concentración letal necesaria para matar al 50% de la población (LC50); Concentración sin efecto observado (NOEC); Concentración mínima de efecto observado (LOEC).

En todos los casos la LC50 es mayor en los prototipos que contienen el polímero aniónico, además los resultados coinciden con la tendencia encontrada *in vitro*. Los resultados mostraron que el polímero alifático es el menos tóxico, pero se debe considerar que para la

misma carga de plásmido, la concentración del polímero alifático es casi el doble que la PPZ-Amina1 o PPZ-Amina2, debido al número de grupos amina por monómero.

	LC50 (mg/l)	NOEC	LOEC
PPZ-Alifático 8.0.1	>10	<1	<1
PPZ-Alifático 8.4.1	16.052	10	20
PPZ-Amina2 8.0.1	5.854	2.5	5
PPZ-Amina2 8.4.1	>10	7.5	10
PPZ-Hidroxilo 8.0.1	5.886	2.5	5
PPZ-Hidroxilo 8.4.1	9.647	5	7.5
PPZ-Amina1 8.0.1	5.521	1	2.5
PPZ-Amina1 8.4.1	9.98	10	20

Tabla 5. Toxicidad *in vivo* determinada por la prueba de toxicidad aguda en embriones de peces zebra (FET). Los resultados se expresan en mg de polímero catiónico / mL de agua de ósmosis. LC50: concentración letal necesaria para matar al 50% de la población; NOEC: Concentración sin efecto observado; LOEC: Concentración de efecto más baja observada.

Ejemplo 6. Preparación de nanocomplejos con plásmido que codifica BMP-4

Las nanocomplejos se prepararon por complejación iónica empleando el polímero catiónico PPZ-Alifático asociado al PPZ-Aniónico, en este caso los nanocomplejos se prepararon para una concentración final de plásmido encapsulado de 83.3µg de plásmido/mL, lo que se corresponde con una concentración teórica de nanocomplejos de 0.967 mg/mL. En este caso, se usó el plásmido que codifica la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) como ácido nucleico y como nanocomplejos blancos se usaron nanocomplejos asociando un plásmido no terapéutico, el pEGFP-Luc empleado en la optimización de la formulación.

El tamaño de los nanocomplejos se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) usando un instrumento Nanosizer ZS (Malvern, Reino Unido) después de la dilución 1:10 en KCl 1 mM. Cada análisis se realizó por triplicado a 25°C, con un ángulo de retrodispersión de 173°.

	Tamaño (nm)	PDI
NCs-blancos	143 ±4	<0,2
NCs-BMP-4	125 ±3	<0,2

Se evaluó la eficiencia de complejación del ácido nucleico empleando la misma técnica descrita en el ejemplo 2, y no se observaron cambios en la asociación/disociación del ácido nucleico, lo que demuestra que las partículas se pueden preparar más concentradas sin que esto afecte a sus propiedades fisicoquímicas.

5 **Ejemplo 7. Ensayo de clonogenicidad**

Se han utilizado dos líneas de células de glioblastoma humano (U87MG y U251) en este experimento. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio EMEM suplementado, se sembraron 10^5 células/pocillo en una placa de 12 pocillos. Después de 24 horas, se agregó el tratamiento, las células se trataron con siete tratamientos diferentes: Medio, proteína BMP4, nanocomplejos blancos (NCs-blancas), nanocomplejos con BMP-4 (NCs-BMP4) preparadas en el ejemplo 6, Temozolamina (Tz), combinación de BMP4-proteína + Tz y combinación de NCs-BMP4 + Tz. La concentración fue de 23,2 μ g de nanocomplejos/ml, 30 ng de proteína BMP4/ml y 2,4 μ g de temozolamida/ml. Dos días después, se resembraron 500 células/pocillo en una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer 12 días más.

15 Las células se tiñeron con una preparación de etanol 50%, ácido acético 5% y cristal violeta 0,5%, se lavaron con agua dos veces y se contó el número de colonias por pocillo.

En la Figura 4, se observa que en ambas líneas celulares los nanocomplejos de BMP4 reducen la clonogenicidad de las células tumorales comparado con la administración directa de la proteína o los nanocomplejos blancos, además, su asociación con temozolomida genera un efecto sinérgico al que se observa cuando se emplea sólo el agente quimioterápico.

20 **Ejemplo 8. Eficacia in vivo en modelo de xenoinjerto de glioblastoma en ratón**

Este experimento fue aprobado por el comité ético de cuidado animal de la Université Catholique de Louvain (2019 / UCL / MD004) y se realizó de acuerdo con las Directrices nacionales belgas de acuerdo con la Directiva Europea. Los animales tenían libre acceso al agua y a la comida todo el tiempo.

Se anestesiaron ratones nude hembra NMRI de ocho semanas de edad (Janvier, Francia) por vía intraperitoneal con 150 μ L de una solución de 10 mg/ml de ketamina (Pfizer, EE. UU.) y 1 mg/ml de xilazina (Sigma, EE. UU.) Dos millones de células U87MG frescas se administraron por vía subcutánea en el costado. El tumor se dejó crecer diez días antes de la administración del tratamiento.

Cuando el tamaño del tumor era de alrededor de 35mm³, se anestesiaron los ratones, aleatorizados en seis grupos y el tratamiento se administró por vía intratumoral a excepción de la temozolamida que se administró por vía intraperitoneal, cuatro dosis en cuatro días seguidos. Distribución de los grupos: Grupo 1: Control, suero salino (n = 7); Grupo 2: temozolomida (n = 6); Grupo 3: nanocomplejos blancos (n = 6); Grupo 4: BMP4 proteína + Tz (n = 6); Grupo 5: nanocomplejos-BMP4 preparados en el ejemplo 6 (n = 7) y Grupo 6: nanocomplejos-BMP4 preparados en el ejemplo 6 + Tz (n = 7). Las dosis administradas fueron 5µg de temozolomida/g ratón por vía intraperitoneal, 1.54 µg de nanocomplejos de BMP4 /g ratón y 2 ng de proteína BMP4/g ratón por vía intratumoral.

- Después de la administración de los diferentes tratamientos, se midió el tamaño del tumor y el peso corporal de los animales cada 2 días. El tamaño del tumor se midió mediante un calibre digital y el volumen se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula $V = L \times A \times H$, en la que L es la longitud, A es el ancho y H es la altura del tumor. El volumen relativo del tumor se calculó como V / V_0 (V_0 es el volumen del tumor antes de la primera administración). Se consideró que los ratones estaban muertos y se sacrificaron cuando el volumen del tumor fue superior a 1500 mm³, aparición de necrosis o úlceras, > 20% de pérdida de peso o presencia de signos de angustia.

Dado que siempre existe cierta heterogenicidad en el tamaño de los tumores los ratones se distribuyeron manteniendo los grupos comparables, aun así también se corrigieron los resultados respecto al volumen inicial del tumor para disminuir las variables debidas a la heterogenicidad tumoral.

Una vez diseccionados los tumores se fotografiaron y se analizó la expresión de algunos RNA implicados en el cancer. Para la extracción de ARN, los tumores se homogeneizaron en 1 ml de TRI-Reagent (ThermoFisher) mediante el GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Alemania), el tumor homogeneizado se mezcló con 200 µl de cloroformo / ml de TRI-Reagent y las muestras se centrifugaron, la fase acuosa se transfirió a un eppendorf que contenía 500 µl de isopropanol / mL de TRI-Reagent y se enfrió a -20 ° C. La muestra se centrifugó y el sobrenadante se decantó, el sedimento se lavó con etanol, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua. La concentración de ARN se determinó mediante NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Las muestras de ARN se transcribieron de forma inversa usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher). La PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizó utilizando el kit NZYSpeedy qPCR Green Master Mix

(2x) (NZYTech, Portugal). Ambas PCR se llevaron a cabo utilizando el Mastercycler Nexus (Eppendorf, Alemania). GAPDH sirvió como gen para normalizar la expresión génica. Las secuencias de cebadores para los genes de interés se muestran en la siguiente tabla.

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GCCAAGGTCATCCATGACAACT-3'	5'-AGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'
Sox2	5'-ACACCAATCCCATCCACACT-3'	5'-GCAAACCTCCTGCAAAGCTC-3'
Nestin	5'-CCTCCTGGAGGCTGAGAACTC-3'	5'-AAGGCTGGCACAGGTGTCTC-3'
Oct4	5'-CCCGCCGTATGAGTTCTGTGG-3'	5'-CCGGGTTTTGCTCCAGCTTCTC-3'
Nanog	5'-CCGCGCCCTGCCTAGAAAAGAC-3'	5'-AGCCTCCAATCCCAAACAATACG-3'
BMP4	5'-AATGTGACACGGTGGGAAACT-3'	5'-CCCGCTGTGAGTGATGCTTA-3'
MDR1	5'-AACACGCATTGCCATAGCTCGTG-3'	5'-AGTCTGCATTCTGGATGGTGGACA-3'
MRP1	5'-CATCGTTCTGTTGCTGCCCTGTT-3'	5'-AGTACGTGGTGACCTGCAATGAGT-3'
ABCG2	5'-GCCACGTGATTCTTCCACAA-3'	5'-TTCTGCCCAGGACTCAATGC-3'

- 5 Se observa que la combinación de los nanocomplejos que codifican para el BMP4 en combinación con la temozolomida, ralentizan la evolución del tumor de manera significativa comparado al resto de grupos, también podemos observar que los nanocomplejos-BMP4 por sí mismos no redujeron el tamaño tumoral de manera significativa comparados con el grupo control (figura 5a).
- 10 Cuando los resultados se corrigen teniendo en cuenta el volumen inicial del tumor, figura 5b, se observa la misma tendencia que en la gráfica anterior.

En cuanto al peso, no se observaron variaciones en el peso debidas a la toxicidad entre los diferentes tratamientos.

- 15 Por último, se observó un aumento de supervivencia de los animales del grupo que combina los nanocomplejos-BMP4 con Tz frente al grupo control y al tratado sólo con Tz (figura 5.c). Estos resultados también se observaron tras la disección de los tumores al final del ensayo (Figura 6).

- 20 Finalmente, se analizó la expresión de algunos genes de interés en cáncer, en la figura 7 podemos ver que tras la administración de los nanocomplejos terapéuticos, la expresión de BMP4 es más de mil veces superior respecto al resto de grupos. También se analizó la

expresión de dos genes sobreexpresados en células madre tumorales (Sox2 y Nanog) en ambos casos el tratamiento con los nanocomplejos terapéuticos disminuyó la expresión, además, se observó un efecto adicional en Nanog cuando se asociaron los nanocomplejos de BMP4 con Tz. Por último, se analizó la expresión de un gen implicado en la resistencia a los
5 agentes quimioterápicos (MDR) y por ello causante de que la quimioterapia no sea tan efectiva, tras el tratamiento con temozolomida, este gen se encuentra sobreexpresado, pero la asociación con los nanocomplejos reduce su expresión a niveles basales.

REIVINDICACIONES

1. Polifosfaceno que comprende:

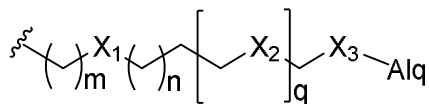
- al menos una cadena hidrocarbonada (A) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el extremo de la cadena es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, opcionalmente la cadena hidrocarbonada tiene entre 1 y 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre hidroxilo y tiol; y

- al menos una cadena hidrocarbonada (B) de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y el grupo terminal de la cadena es un grupo de fórmula -NH₂.

2. Polifosfaceno según la reivindicación 1, donde las cadenas hidrocarbonadas tienen entre 6 y 16 eslabones.

3. Polifosfaceno según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde 2 ó 3 eslabones de las cadenas hidrocarbonadas son heteroátomos seleccionados independientemente entre N y S.

4. Polifosfaceno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cadena hidrocarbonada (A) tiene la siguiente estructura:



donde m puede tener el valor 0, 1 o 2,

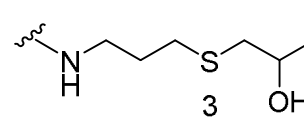
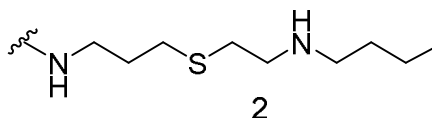
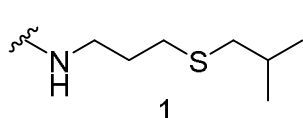
n puede tener el valor 1, 2 o 3,

q puede tener el valor 0 o 1,

cada X₁, X₂ y X₃ se seleccionan de manera independiente de entre los átomos de NH, S y O,

Alq es un alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, opcionalmente tiene un sustituyente seleccionado de entre un grupo hidroxilo o tiol.

5. Polifosfaceno según la reivindicación 1, donde la cadena hidrocarbonada (A) se seleccionan de entre el grupo que consiste en:



6. Complejo que comprende un polifosfaceno, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y una molécula biológicamente activa.
7. Complejo según la reivindicación 6, donde la molécula biológicamente activa se selecciona de entre proteína y polinucleótido.
- 5 8. Complejo según la reivindicación 6, donde la molécula biológicamente activa es un plásmido que codifica BMP-4.
9. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende además un polifosfaceno aniónico.
- 10 10. Complejo según la reivindicación 9, donde el polifosfaceno aniónico comprende una cadena hidrocarbonada de entre 6 y 24 eslabones, donde entre 1 y 4 eslabones son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, y al menos un grupo carboxílico.
11. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, que comprende además una molécula quimioterapéutica.
- 15 12. Complejo según la reivindicación 11, donde la molécula quimioterapéutica es temozolamida.
13. Composición farmacéutica que comprende el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-1, y excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, o composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su uso en medicina.
- 20 15. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, o composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su uso en terapia génica u oncología.
16. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, o composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de tumores cerebrales, preferiblemente, glioblastomas.
- 25 17. Kit que comprende al menos dos recipientes donde uno de los recipientes comprende un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, y el otro recipiente comprende una molécula quimioterapéutica, junto con instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad para administración secuencial o simultánea de ambos ingredientes.
- 30 18. Uso del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en la elaboración de vectores para el transporte de moléculas biológicamente activas.

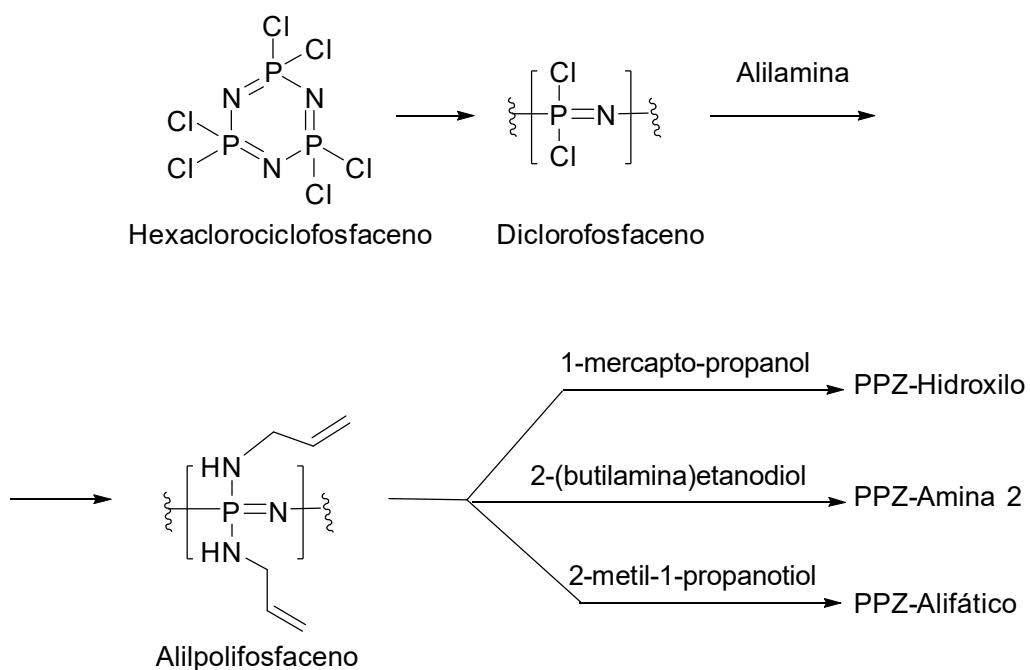


Figura 1

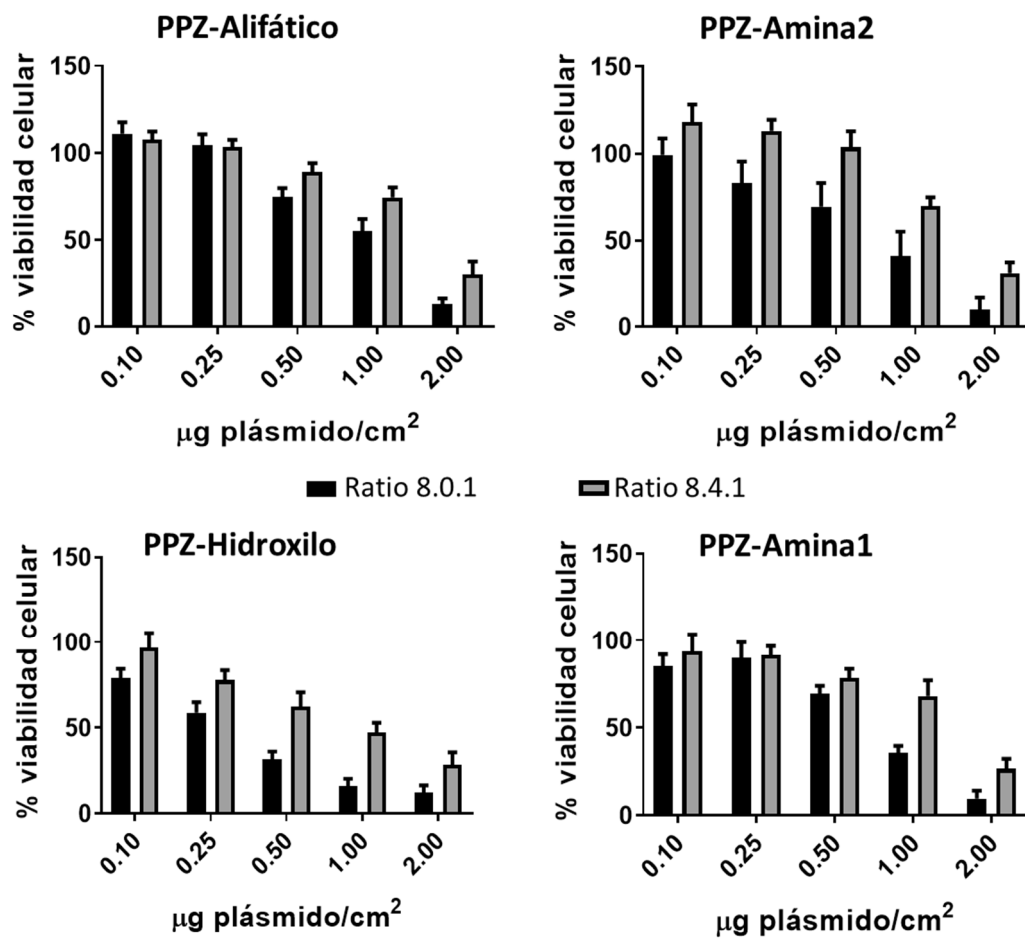


Figura 2

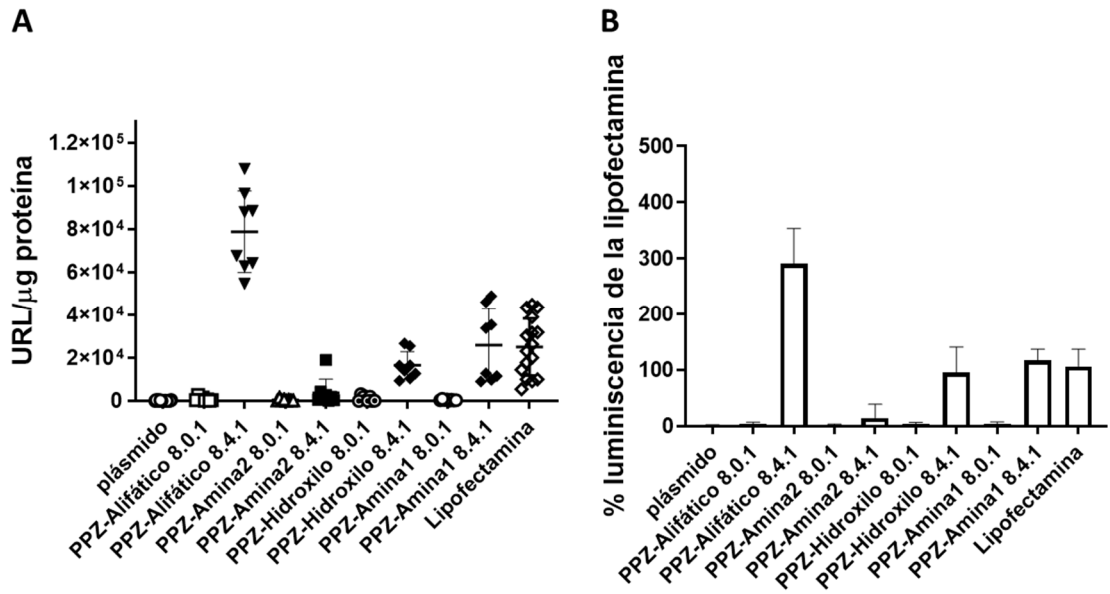


Figura 3

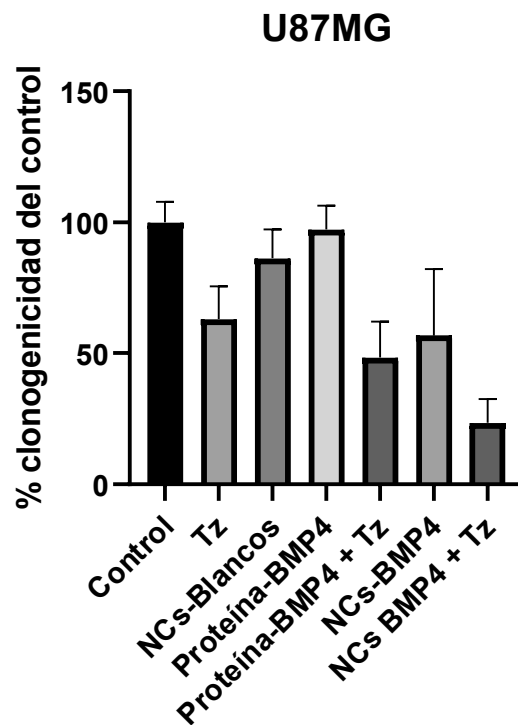
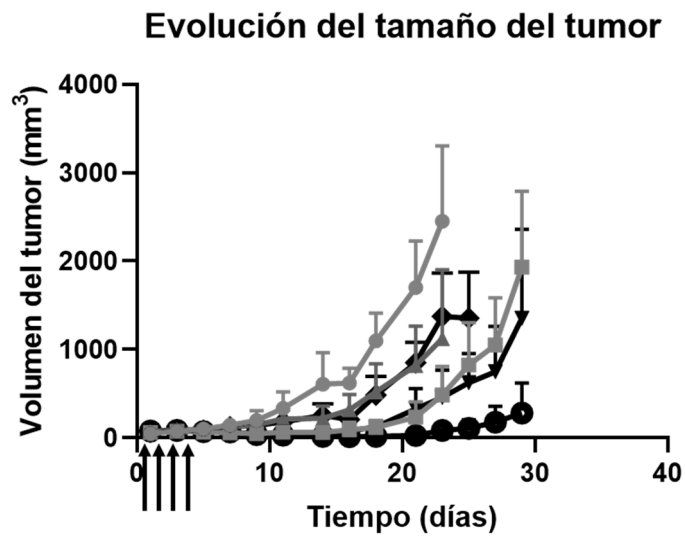
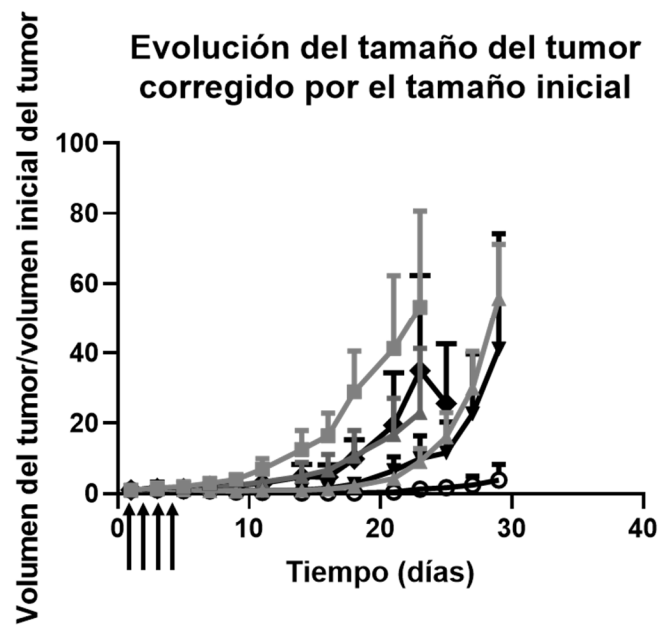


Figura 4

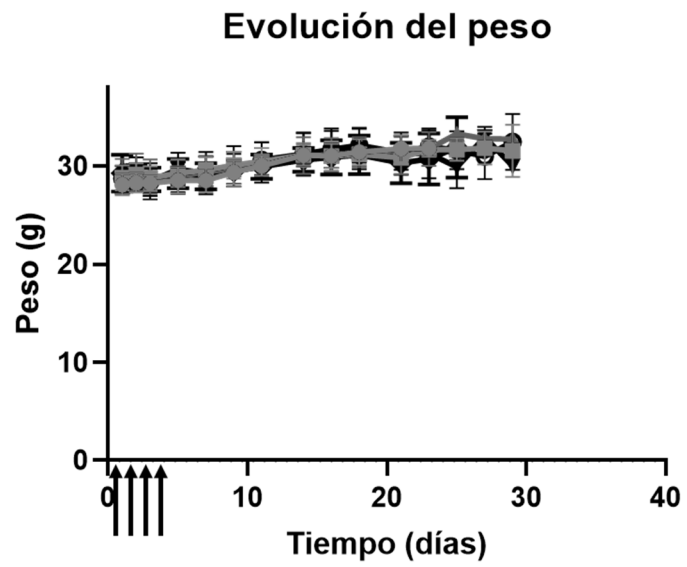
A



B



C



D

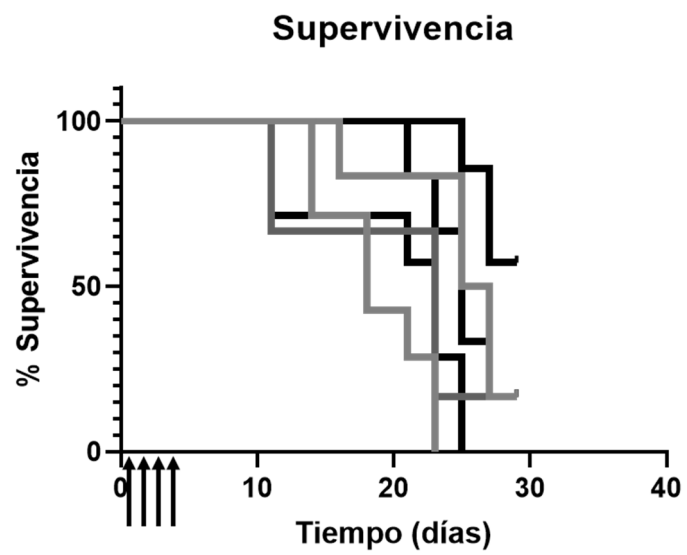


Figura 5

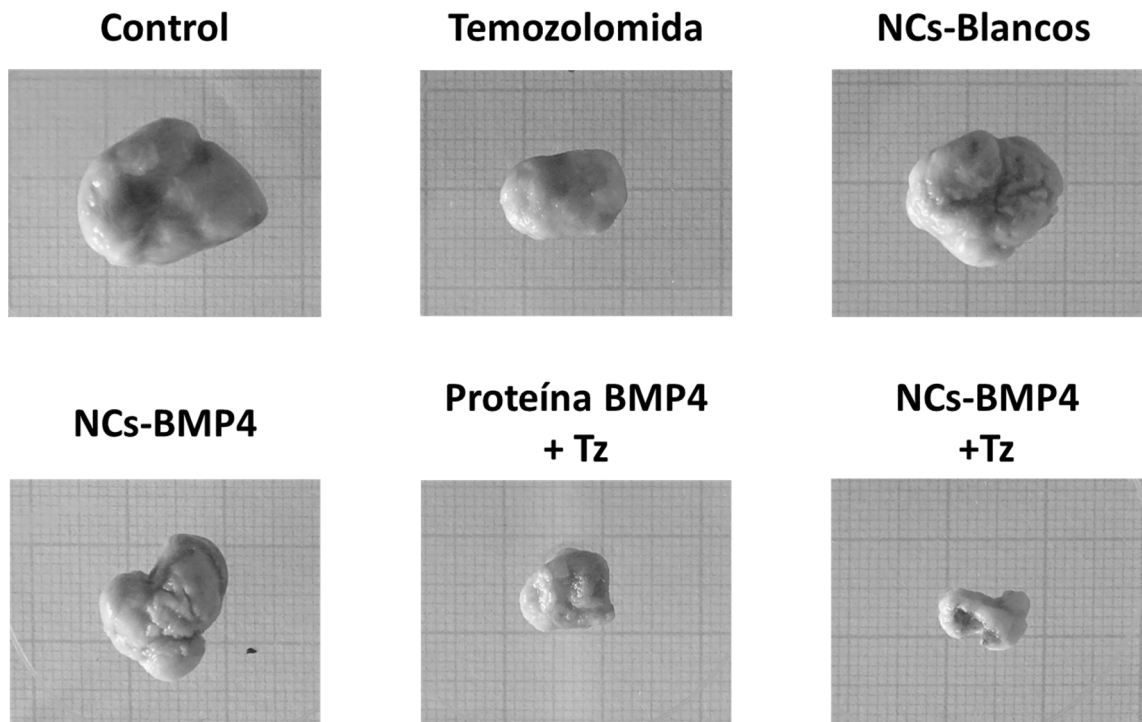


Figura 6

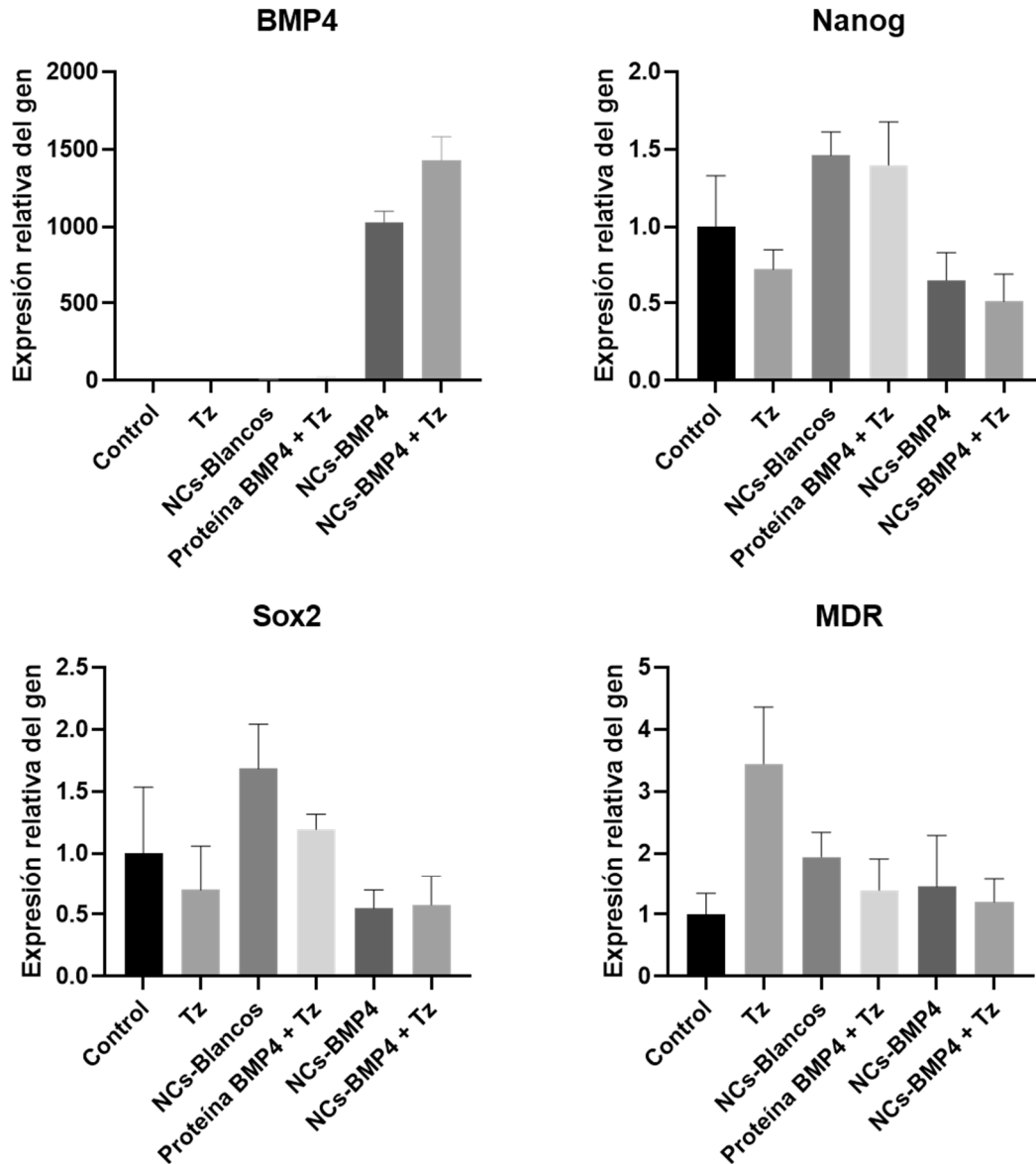


Figura 7



- ②① N.º solicitud: 202031074
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.10.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C08G79/025** (2016.01)
A61K47/59 (2017.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HSU WEI-HSIN et al. "Structure-Optimized Interpolymer Polyphosphazene Complexes for Effective Gene Delivery against Glioblastoma". Advanced Therapeutics, 28/02/2019, Vol. 2, Article No.: 1800126, ISSN 2366-3987(electronic), <DOI: doi:10.1002/adtp.201800126>. Ver resumen, apartados 2 y 3; figuras 1-7.	1-4, 6-18
A	HSU, W. "Polyphosphazenes for the delivery of biopharmaceuticals". Journal of Applied Polymer Science, 2020, Vol. 137, Páginas 48688 (1-11) [en línea][recuperado el 14/11/2019], <DOI: doi.org/10.1002/app.48688>. Ver resumen; figuras 1-5.	1-18
A	WO 2017191345 A1 (UNIV SANTIAGO COMPOSTELA) 09/11/2017, reivindicaciones 1-13.	1-18
A	DE WOLF H K et al. "In vivo tumor transfection mediated by polyplexes based on biodegradable poly(DMAEA)-phosphazene". Journal of Controlled Release, 20051205 Elsevier, AMSTERDAM, NL. Hanes Justin; Ensign Laura M; Kannan Rangaramanujam; Suk Jung Soo, 05/12/2005, Vol. 109, Páginas 275 - 287, ISSN 0168-3659. Ver resumen, figura 1.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
19.01.2021

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08G, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS