

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/744,994 presentada el 12 de octubre de 2018 y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/826,461 presentada el 29 de marzo de 2019, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

10 [0002] Varias modalidades de la presente descripción se refieren a polímeros ramificados que son útiles, por ejemplo, para aplicaciones de terapia génica como agentes de transfección de ácidos nucleicos seguros y no tóxicos.

ANTECEDENTES

15 [0003] La administración de materiales genéticos funcionales a la célula (por ejemplo, células de fibroblastos de la piel) para manipular la expresión del transgén es de gran importancia en nanomedicina. A pesar de que se han desarrollado numerosos sistemas poliméricos de administración de genes, todavía no se ha logrado una transfección de genes altamente segura y eficaz (por ejemplo, transfección de genes de fibroblastos).

20 [0004] Después de casi tres décadas de desarrollo, la terapia génica se ha convertido en una parte predominante del arsenal de nanomedicina en rápido crecimiento para mejorar las condiciones de salud y corregir trastornos genéticos.^[1] Aunque se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos mediante el uso de vectores de administración de genes virales, siguen sin abordarse los riesgos de desencadenar respuestas inmunogénicas y mutagénesis de inserción transgénica, las limitaciones asociadas con la

25 producción a gran escala y la baja «capacidad de carga» de materiales genéticos, junto con la imprevisibilidad de la movilidad de los vectores.^[2,3] Desde esta perspectiva, los vectores de administración de genes no virales serían más prometedores debido a su potencial de mínima inmunogenicidad, ausencia de tumorigenicidad, fabricación rentable, alta carga útil de ácidos nucleicos y expresión génica localizada. A partir de 2010, ha aumentado notablemente la cantidad de ensayos

30 clínicos de terapias génicas que utilizan vectores de genes no virales; se han formulado ADN de plásmidos y ARN interferentes pequeños (ARNip) en al menos 40 terapias génicas basadas en nanopartículas para la corrección génica, expresión de proteínas terapéuticas y vacunación de antígenos, con 12 sistemas de liposomas principales investigados en 27 ensayos clínicos y 7 sistemas

basados en polímeros en 13 ensayos clínicos.^[3] Entre los ensayos clínicos de terapia génica basada en polímeros, el polímero catiónico de venta libre polietilenimina (PEI) ha mostrado algunas promesas. Sin embargo, PEI no es degradable y se encuentra seriamente obstaculizada por preocupaciones sobre su seguridad.^[4] Por lo tanto, se han realizado enormes esfuerzos para mejorar la eficacia de la transfección de genes y la seguridad de los vectores de genes poliméricos para que las terapias génicas basadas en polímeros puedan acercarse a las aplicaciones clínicas.

[0005] Entre los vectores de administración de genes poliméricos, los poli(β -amino ésteres) (PAE) son un tipo de los candidatos más prometedores. Los PAE fueron diseñados y sintetizados por primera vez por Langer y colaboradores mediante la copolimerización de aminas con diacrilatos mediante un proceso de adición de Michael de una etapa.^[5] Las aminas terciarias en la cadena principal y las aminas primarias en los extremos sirven como unidades catiónicas para condensar el ADN en partículas nanométricas a través de interacciones electrostáticas, y para facilitar el escape del poliplexo de los endo/lisosomas a través del «efecto de esponja de protones», y los enlaces de éster de la cadena principal pueden degradarse hidrolíticamente en condiciones acuosas para disociar los poliplexos y liberar ADN, así como reducir la citotoxicidad después de la transfección génica.^[6,7] Después de una optimización intensiva de la estructura/propiedad,^[8-10] se han identificado varios PAE para la transfección de ADN con un perfil de seguridad favorable y una alta eficiencia de transfección, tanto *in vitro* como *in vivo*.^[6,11,12] Sin embargo, hasta 2015, casi todos los estudios con PAE se habían centrado en polímeros con una estructura lineal. Los polímeros ramificados pueden tener un mayor potencial para la transfección de genes porque su estructura tridimensional (3D) y sus múltiples grupos funcionales de extremo podrían otorgar ventajas adicionales a los vectores de genes poliméricos, por lo que se han desarrollado con éxito poli(β -amino ésteres) (HPAE) altamente ramificados. a través de una estrategia sencilla de adición de Michael «A2+B3+C2» en un solo recipiente.^[13-16] En una amplia gama de tipos de células, los HPAE mostraron una capacidad de transfección de genes mucho mayor en comparación con sus equivalentes lineales correspondientes, lo que demuestra su mayor potencial para la administración de genes. La alta capacidad de transfección de genes de los HPAE se demostró, además, *in vivo* mediante el uso del modelo de enfermedad de la piel de epidermolisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB). La RDEB es un trastorno mecanoampollosa hereditario, devastador y poco común causado por la mutación del gen COL7A1 que codifica el colágeno tipo VII (C7), que es un componente clave de las fibrillas de anclaje (AF) que sirven para asegurar la adherencia epidérmica-dérmica^[17]. La deficiencia de C7 produce fragilidad de la piel, ampollas generalizadas y erosiones que, de manera característica, se curan con cicatrices exuberantes y formación de milia.^[18] Tanto en el modelo de ratón con inactivación de RDEB

como en el modelo de ratón injertado, los HPAE mediaron un alto nivel y hasta 10 semanas de restauración de la expresión de C7,^[13,15,19] destacando su enorme potencial para la administración clínica de genes cutáneos. Los HPAE se describen con mayor detalle en la publicación de patente estadounidense n.º 2017/0216455, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia para todos los fines.

[0006] Los fibroblastos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del tejido cutáneo y la función biológica de la piel, regulan el microambiente celular y están asociados con múltiples enfermedades de la piel tales como cicatrización hipertrófica, envejecimiento/fotoenvejecimiento, cicatrización de heridas diabéticas, cáncer y paquidermoperiostosis.

La capacidad de manipular la expresión génica dentro de los fibroblastos es fundamental para la genómica funcional, el análisis de las vías y las aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, los fibroblastos dérmicos humanos primarios (HPDF) son una fuente accesible de células de piel humana fenotípicamente y cariotípicamente normales, biológicamente más relevantes para aplicaciones *in vivo* en comparación con las líneas celulares inmortalizadas.^[20] Anteriormente, los HPDF se inyectaban directamente en la piel para la restauración de C7 en RDEB. No obstante, la inyección intradérmica directa de HPDF muestra una morfología anormal de las AF^[21] y un reemplazo transitorio de las proteínas^[22] en pacientes con RDEB. Por el contrario, se puede prever que después de la modificación genética mediante transfección, los fibroblastos pueden adaptarse de forma diversa y hacerse más adecuados para la terapia génica clínica. La mejora de C7 de los HPDF podría tener un efecto significativo en la mejora de la resistencia y la estabilidad de las AF reconstruidas, optimizando el programa de dosificación y reduciendo la frecuencia de administración en RDEB. Sin embargo, la transfección de genes no virales de fibroblastos siempre ha sido un desafío. Los métodos más comunes incluyen la electroporación costosa, la magnetofección y las formulaciones químicas relativamente ineficientes y tóxicas.^[20,23,24] Por ejemplo, solo se detectó 27 % y 44 % de las eficiencias de administración de la proteína de fluorescencia verde mejorada (EGFP) en fibroblastos dérmicos humanos^[25] y fibroblastos primarios humanos^[26] mediante diferentes sistemas de electroporación. La máxima eficiencia de transfección de los principales reactivos lipídicos catiónicos TransFectin, Lipofectamine LTX y electroporación en el fibroblasto embrionario de ratón fue de 15,7 %, 11,8 % y 48,1 %, respectivamente^[24].

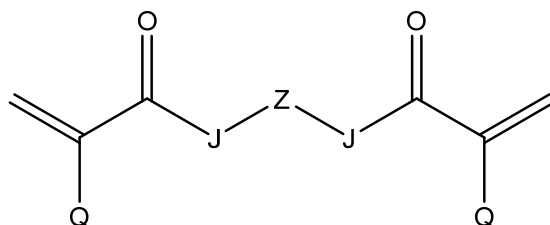
[0007] Por lo tanto, el desarrollo de un sistema confiable de administración de genes no virales para transfectar fibroblastos con alta eficiencia y seguridad es imperativo y de gran importancia.

COMPENDIO

[0008] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona polímeros ramificados

adecuados para formar poliplejos útiles para terapias de transfección génica elaboradas mediante un proceso de:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)

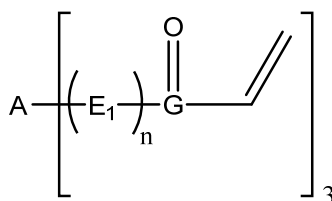


(A)

con una primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$;

(b) hacer reaccionar el producto de la Etapa (a) con una segunda amina que tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$; y

(c) hacer reaccionar el producto de la Etapa (b) con un compuesto de la fórmula (B):



(B);

en donde

cada J es independientemente $-O-$ o $-NH-$;

Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

15 A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , éter C_1-C_6 , tioéter C_1-C_6 , sulfona C_1-C_6 , sulfóxido C_1-C_6 , amida primaria C_1-C_6 , amida secundaria C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, $-OC(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)O-$ alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 o arilo C_6-C_{10} ; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ;

G es $-C-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-P(OR_1)-$, o $-P(OH)-$;

25 cada Q es un grupo alquilo C_1-C_{10} lineal o ramificado;

cada E_1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$

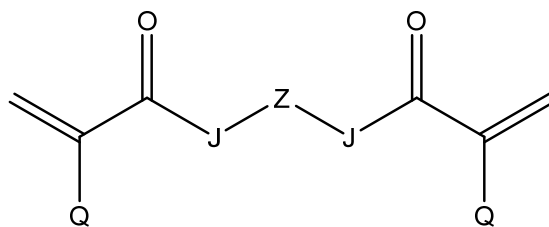
, alquilenos, heteroalquilenos, alquenos, heteroalquenos, alquinos, heteroalquinos;

cada uno de R_1 y R_2 es independientemente alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alqueno C_2-C_{40} , heteroalqueno C_2-C_{40} , cicloalqueno C_4-C_8 , alquino C_2-C_{40} , heteroalquino C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C_1-C_{40} , alqueno C_2-C_{40} , cicloalqueno C_4-C_8 , alquino C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , $-OH$, $-O$ -alquilo C_1-C_6 , $-NH_2$, $-NH$ (alquilo C_1-C_6), o $-N$ (alquilo C_1-C_6)₂; y R_1 no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C_1-C_6 , un alcoxi C_1-C_6 , un éter C_1-C_6 , un tioéter C_1-C_6 , una sulfona C_1-C_6 , un sulfóxido C_1-C_6 , una amida primaria C_1-C_6 , una amida secundaria C_1-C_6 , un haloalquilo C_1-C_6 , un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, $-OC(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)O$ -alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 y arilo C_6-C_{10} ; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ; y

cada n es al menos 1.

[0009] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para elaborar un polímero, que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)

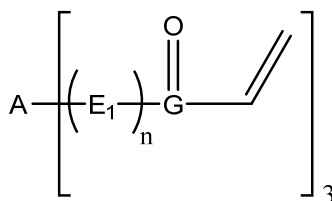


(A)

con una primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$;

(b) hacer reaccionar el producto de (a) con una segunda amina que tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_1-N(H)-Z''-N(H)-R_2$; y

(b) hacer reaccionar el producto de (b) con un compuesto de la fórmula (B):



(B);

en donde

cada J es independientemente $-O-$ o $-NH-$;

Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono
 5 lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo
 sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , éter C_1-C_6 , tioéter C_1-C_6 , sulfona C_1-C_6 ,
 sulfóxido C_1-C_6 , amida primaria C_1-C_6 , amida secundaria C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , grupo carboxilo, grupo
 10 ciano, grupo nitro, grupo nitroso, $-OC(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)O-$ alquilo C_1-C_6 ,
 cicloalquilo C_3-C_6 , heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 o arilo C_6-C_{10} ; en donde cada R' se selecciona
 independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ;

G es $-C-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-P(OR_1)-$, o $-P(OH)-$;

cada Q es H o un grupo alquilo C_1-C_{10} lineal o ramificado;

15 cada E_1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$,
 , alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

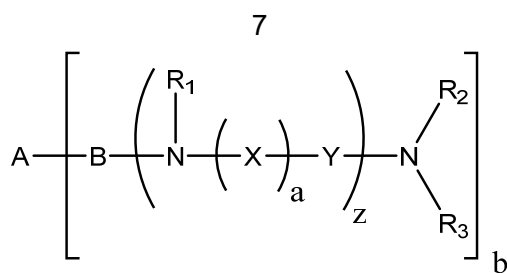
cada uno de R_1 y R_2 es independientemente alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} ,
 heteroalquenileno C_2-C_{40} , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , heteroalquinileno C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-
 C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos

20 seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} ,
 cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, y heteroarilo están
 opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , $-OH$, $-O-$ alquilo C_1-C_6 , $-NH_2$, $-NH$ (alquilo C_1-
 C_6), o $-N$ (alquilo C_1-C_6)₂; y R_1 no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un

25 hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupos sulfonamida, un tiol, un alquilo C_1-C_6 , un alcoxi
 C_1-C_6 , un éter C_1-C_6 , un tioéter C_1-C_6 , una sulfona C_1-C_6 , un sulfóxido C_1-C_6 , una amida primaria C_1-C_6 ,
 una amida secundaria C_1-C_6 , un haloalquilo C_1-C_6 , un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro,
 un grupo nitroso, $-OC(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)O-$ alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 ,
 heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 y arilo C_6-C_{10}); en donde cada R' se selecciona independientemente
 del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ; y

30 cada n es al menos 1.

[0010] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un poliplejo que comprende un
 componente de ácido nucleico y un polímero preparado mediante los procesos descritos en la presente
 o un polímero que comprende la fórmula (I)



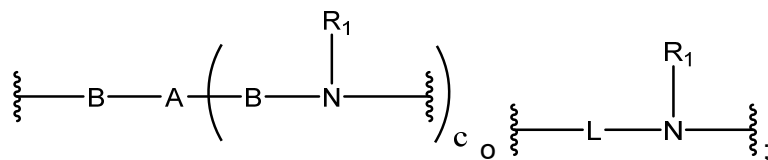
(I)

en donde

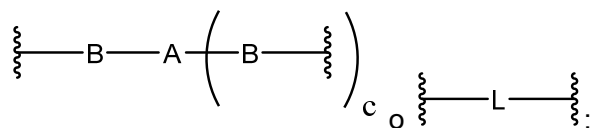
cada A es independientemente una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, éter C₁-C₆, tioéter C₁-C₆, sulfona C₁-C₆, sulfóxido C₁-C₆, amida primaria C₁-C₆, amida secundaria C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ o arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

cada B es independientemente un primer resto de enlace;



cada X es independientemente



cada Y es independientemente

cada L es independientemente un segundo resto de enlace;

en cada aparición, cada R₁, R₂ y R₃ es independientemente H, alquilo C₁-C₄₀, heteroalquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₈, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂; o

en donde R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar heterociclilo o heteroarilo que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O;

a es 1-1000;

b es 1-4;

c es 1-3; y

z es 1-100;

- 5 con la condición de que al menos uno de R_2 y R_3 no sea H.

[0011] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un poliplexo de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 10 **[0012]** En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método de transfección de células que comprende poner en contacto una o más células diana con una composición farmacéutica que comprende al menos un poliplexo de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en condiciones adecuadas para transfectar la célula diana con uno o más poliplexos.

- 15 **[0013]** En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende al menos un poliplexo de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, de modo que una o más de las células del paciente se transfectan con el componente de ácido nucleico del poliplexo.

- 20 **[0014]** En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende al menos un poliplexo de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en donde la administración de la composición corrige una traducción defectuosa de un gen diana en el sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 **[0015]** La **FIGURA 1** muestra la evaluación de la viabilidad celular y la eficiencia de transfección. La **FIGURA 1a** muestra la actividad de Gluc y la viabilidad celular de HPDF 48 h después de la transfección mediante los poliplexos de LBPAE/ADN, PEI/ADN y SuperFect/ADN en una serie de relaciones de p/p. La **FIGURA 1b** muestra la actividad de Gluc y la viabilidad celular de 3T3. Diferencia significativa del grupo *PEI y #SuperFect en la actividad de Gluc ($p < 0,05$, prueba t de Student dedos colas).

- 30 **[0016]** La **FIGURA 2** muestra la evaluación de LC_{50} de los poliplexos de LBPAE/ADN y poliplexos de SuperFect/ADN en HPDF y 3T3. La **FIGURA 2a** muestra imágenes representativas de vivas/muertas de las células no tratadas o células transfectadas con los poliplexos de LBPAE/ADN en la concentración de $555 \mu\text{g mL}^{-1}$ o poliplexos de SuperFect/ADN en la concentración de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las barras de escala

son de 50 μm . La **FIGURA 2b** muestra la viabilidad celular dependiente de la concentración del poliplexo de LBPAE/ADN medida mediante un ensayo de Alamarblue. La **FIGURA 2c** muestra la viabilidad celular dependiente de la concentración del poliplexo de SuperFect/ADN medida mediante un ensayo de Alamarblue.

5 **[0017]** La **FIGURA 3** muestra una comparación de la expresión de GFP y MFI mediada por diferentes sistemas de administración de genes. La **FIGURA 3a** muestra imágenes de GFP de células HPDF después del tratamiento con poliplexos de LBPAE/ADN, PEI/ADN y SuperFect/ADN. Se utilizaron células no tratadas (UT) como control negativo. Barra de escala, 200 μm . La **FIGURA 3b** muestra la distribución de histograma de poblaciones de HPDF después de la transfección con diferentes poliplexos. La **FIGURA**
 10 **3c** muestra el porcentaje de HPDF positivas para GFP y la MFI de las células después de la transfección. La **FIGURA 3d** muestra imágenes de GFP de 3T3. Barra de escala, 200 μm . La **FIGURA 3e** muestra la distribución de histograma de poblaciones de 3T3 después de la transfección con diferentes poliplexos. La **FIGURA 3f** muestra el porcentaje de 3T3 positivas para GFP y la MFI de las células después de la transfección. Diferencia significativa con grupos de reactivos comerciales en el *porcentaje de células
 15 positivas para GFP y $\#MFI$ ($p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas).

[0018] La **FIGURA 4** muestra características fisicoquímicas de los poliplexos de LBPAE/ADN. La **FIGURA 4a** muestra la determinación de la capacidad de condensación del ADN con electroforesis en gel de agarosa. La **FIGURA 4b** muestra la medición de la afinidad de unión al ADN con el ensayo PicoGreen. La **FIGURA 4c** muestra las mediciones del potencial zeta y el tamaño de los poliplexos. La
 20 **FIGURA 4d** muestra la observación de la morfología de los poliplexos con TEM. Barra de escala, 200 nm.

[0019] La **FIGURA 5** muestra la absorción celular de los diversos poliplexos. La **FIGURA 5a** muestra imágenes fluorescentes de las células 4 horas después de las transfecciones diferentes poliplexos. El núcleo se tiñó con DAPI (azul), el ADN se marcó con Cy3 (rojo). Barra de escala, 20 μm . La **FIGURA 5b**
 25 muestra la eficiencia de absorción de los poliplexos en HPDF cuantificadas con citometría de flujo. La **FIGURA 5c** muestra la eficiencia de absorción de los poliplexos en 3T3 cuantificadas con citometría de flujo. La **FIGURA 5d** muestra el porcentaje de HPDF positivas para Cy3 y la MFI normalizada de las células. La **FIGURA 5e** muestra el porcentaje de 3T3 positivas para Cy3 y la MFI normalizada de las células. Diferencia significativa con SuperFect en la cuantificación de * MFI ($p < 0,05$, prueba t de Student
 30 de dos colas).

[0020] La **FIGURA 6** muestra la capacidad amortiguadora de los protones, la degradación y la evaluación de la liberación de ADN de LBPAE. La **FIGURA 6a** muestra la capacidad amortiguadora de los protones determinada mediante titulación ácido-base. La **FIGURA 6b** muestra el perfil de degradación determinado mediante el uso de GPC. La **FIGURA 6c** muestra la evaluación de la liberación

de ADN de los poliplejos evaluados con el ensayo PicoGreen.

[0021] La **FIGURA 7** muestra tinción por inmunofluorescencia de la expresión de C7 en los HPDF. La **FIGURA 7a** muestra imágenes fluorescentes de los HPDF cuatro días después de la transfección con los poliplejos de LBPAE/MCC7. El núcleo se tiñó con DAPI (azul) y el C7 se incubó con anticuerpo primario monoclonal anti-colágeno VII y se tiñó con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa-568 (rojo). Barra de escala, 20 μ m. La **FIGURA 7b** muestra la cuantificación por citometría de flujo de la expresión de C7 de los HPDF. La **FIGURA 7c** muestra el grado de regulación por aumento de la expresión de C7 y la MFI de los HPDF después de la transfección con los poliplejos de LBPAE/MCC7 y SuperFect/ADN. Diferencia significativa con SuperFect en el *porcentaje de regulación por aumento de C7 y #MFI ($p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas).

[0022] La **FIGURA 8** es una ilustración esquemática de la síntesis de LBPAE a través de la estrategia de combinación de oligómeros lineales. En la etapa 1, la amina de tipo A2 reacciona con el diacrilato de tipo C2 para formar el oligómero de base lineal A2-C2, que tiene, adicionalmente, un casquete en el extremo con una segunda amina para generar el oligómero lineal A2-C2. En la etapa 2, el oligómero lineal A2-C2 se combina con el triacrilato de tipo B3 mediante ramificación para producir LBPAE. El recuadro muestra los monómeros y el agente de casquete del extremo usado para la síntesis de LBPAE en este trabajo.

[0023] La **FIGURA 9** muestra los resultados de GPC del oligómero lineal y LBPAE.

[0024] La **FIGURA 10** muestra la curva alfa de MH y el valor de LBPAE.

[0025] La **FIGURA 11** muestra el análisis de la composición química de LBPAE mediante ^1H NMR.

[0026] La **FIGURA 12** muestra los resultados del gel de agarosa de MCC7 y pcDNA3.1COL7A1.

[0027] La **FIGURA 13a** muestra la síntesis de HPAE a través de la estrategia de adición de Michael «A2+B3+C2». La **FIGURA 13b** muestra curvas de GPC y el Mw calculado de los HPAE de la presente descripción. La **FIGURA 13c** muestra curvas alfa de MH y los valores calculados de HPAE de la presente descripción. (Las Figuras 13 y 16-19 usan «HC32-122» para definir el polímero HPAE de la presente descripción. HC32-122 es equivalente a HC32-DATOU, que se usa en los Ejemplos).

[0028] La **FIGURA 14** muestra la transfección de queratinocitos de RDEB mediante el uso de poliplejos que comprenden HPAE que tienen un MW de 11 kDa, 21 kDa, 34 kDa y 41 kDa mediante el uso de relaciones de HPAE/ADN de 10:1, 30:1 y 50:1 (% en peso/% en peso).

[0029] La **FIGURA 15** muestra la prueba de viabilidad celular después de la transfección génica de queratinocitos de RDEB mediante el uso de poliplejos que comprenden HPAE que tienen un MW de 11 kDa, 21 kDa, 34 kDa y 41 kDa mediante el uso de relaciones de polímero/ADN de 10:1, 30:1 y 50:1 (% en peso/% en peso).

[0030] La **FIGURA 16** muestra estudios de transfección de genes indicadores en células RDEBK

mediante el uso de poliplexos de HPAE/ADN. La **FIGURA 16a** muestra la actividad relativa de Gluc de las células RDEBK 48 h después de la transfección mediante poliplexos de HPAE/ADN y PEI/ADN. Los datos se presentan como el porcentaje normalizado a la actividad de Gluc de las células RDEBK transfectadas mediante poliplexos de HPAE/ADN (30:1 % en peso/% en peso). *Diferencia significativa con el grupo de HPAE (p/p = 30:1) ($p < 0,05$, prueba t de Student); la **FIGURA 16b** muestra la viabilidad de las células RDEBK después de la transfección con poliplexos de HPAE/ADN y PEI/ADN; la **FIGURA 16c** muestra imágenes de GFP de células no tratadas (UT), células tratadas con poliplexos de HPAE/ADN (p/p = 30:1) o PEI/ADN (p/p = 1:1). Barra de escala, 200 μm ; la **FIGURA 16d** muestra distribuciones de histograma representativas de una población de células UT y transfectadas; la **FIGURA 16e** muestra el porcentaje de células RDEBK positivas para GFP y la MFI cuantificada con citometría de flujo. Diferencia significativa con PEI en el *porcentaje de células positivas para GFP y #MFI celular ($p < 0,05$, prueba t de Student).

[0031] La **FIGURA 17** muestra la biosíntesis de MCC7 y la absorción celular de poliplexos de HPAE/MCC7. La **FIGURA 17a** muestra la biosíntesis de MCC7 con el sistema de digestión de phiC31 con 1-scel. La **FIGURA 17b** muestra electroforesis en gel de agarosa de tres ADN de plásmido que codifican COL7A1 después de la digestión con EcoR1. El plásmido regular (RP) de pcDNA3.1COL7A1, el plásmido original (PP) de MN511A-1-COL7A1 y MCC7 tienen longitudes de la cadena principal de 5 kb, 8 kb y 3 kb, respectivamente; la **FIGURA 17c** muestra imágenes fluorescentes de células RDEBK después de la transfección con poliplexos diferentes. El núcleo se tiñó con DAPI (azul), el ADN se marcó con Cy3 (rojo). Barra de escala, 20 μm ; la **FIGURA 17d** muestra la eficiencia de absorción celular de los poliplexos cuantificada con citometría de flujo; la **FIGURA 17e** muestra el porcentaje de células positivas para Cy3 y MFI. *Diferencia significativa con el grupo de PEI/MCC7 en la MFI celular ($p < 0,05$, prueba t de Student).

[0032] La **FIGURA 18** muestra la expresión de C7 recombinante y ARNm de COL7A1 después de la transfección con poliplexos de HPAE/MCC7. La **FIGURA 18a** muestra un gráfico de amplificación de GAPDH de control endógeno obtenido mediante RT-qPCR; la **FIGURA 18b** muestra un gráfico de amplificación de ARNm de COL7A1 de células RDEBK después de la transfección obtenida mediante RT-qPCR; la **FIGURA 18c** muestra la cuantificación del ARNm de COL7A1, *Diferencia significativa con el grupo de PEI ($p < 0,05$, prueba t de Student); la **FIGURA 18d** muestra imágenes de citoinmunofluorescencia de tinción de C7 (fluorescencia roja), barra de escala, 20 μm ; la **FIGURA 18e** muestra los resultados de la transferencia Western de la expresión de C7. Se utilizó β -actina de 42-kDa como control de carga.

[0033] La **FIGURA 19** muestra propiedades fisicoquímicas de los poliplexos de HPAE/MCC7 en la relación de HPAE/ADN en % en peso/% en peso de 30:1. La **FIGURA 19a** muestra la formación de

poliplejos de HPAE/MCC7; la **FIGURA 19b** muestra los resultados del gel de agarosa de la condensación del ADN y el ensayo de competición con heparina 2 h después de la preparación de los poliplejos; la **FIGURA 19c** muestra la prueba de capacidad de unión al ADN mediante el ensayo PicoGreen con o sin presencia de heparina 2 h después de la preparación de los poliplejos; la **FIGURA 19d** muestra el tamaño de los poliplejos de HPAE /MCC7 medidos mediante NTA; la **FIGURA 19e** muestra la distribución del potencial Zeta de los poliplejos de HPAE /MCC7; la **FIGURA 19f** muestra la imagen de TEM de los poliplejos de HPAE/MCC7. Barra de escala, 500 nm.

[0034] La **FIGURA 20** muestra el desempeño de la transfección génica de una formulación que comprende un poliplejo de HPAE de la presente descripción. La **FIGURA 20a** muestra la liofilización del poliplejos y estudios de transfección adicionales en células RDEBK; la **FIGURA 20b** muestra imágenes de GFP después de la transfección con poliplejos a partir de métodos de almacenamiento y condiciones de liofilización diferentes. FZ: liofilización; Suc: sacarosa. Barra de escala, 200 μ m; la **FIGURA 20c** muestra distribuciones de histograma representativas de una población de células UT y transfectadas; la **FIGURA 20d** muestra la eficiencia de expresión de GFP de las células después de la transfección cuantificada mediante citometría de flujo. *Diferencia significativa con el grupo de poliplejos preparado recientemente ($p < 0,05$, prueba t de Student); (e) MFI normalizada cuantificada mediante citometría de flujo. *Diferencia significativa con el grupo de poliplejos preparado recientemente ($p < 0,05$, prueba t de Student).

[0035] La **FIGURA 21** muestra la transfección de los poliplejos de HPAE de la presente descripción en células RDEBK después de un almacenamiento a largo plazo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0036] Tal como se usan anteriormente y a lo largo de esta descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados. Si falta un término, rige el término convencional conocido por un experto en la técnica.

[0037] Tal como se usan en la presente, las expresiones «que incluye», «que contiene» y «que comprende» se usan en su sentido amplio no taxativo.

[0038] Los artículos «un» y «una» se usan en la presente descripción para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

[0039] El término «y/o» se usa en la presente descripción para hacer referencia a «y» u «o», a menos que se indique de otro modo.

[0040] Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas proporcionadas en la presente no están calificadas con el término «alrededor de». Se entiende que, ya

sea que el término «alrededor de» se utilice explícitamente o no, se pretende que cada cantidad proporcionada en la presente haga referencia al valor determinado real, y también se pretende que haga referencia a la aproximación de dicho valor determinado que se deduciría razonablemente en función del conocimiento habitual en la técnica, incluidos los equivalentes y aproximaciones debido a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor determinado. Cuando un rendimiento se proporciona como un porcentaje, dicho rendimiento hace referencia a una masa de la entidad para la cual se proporciona el rendimiento con respecto a la cantidad máxima de la misma entidad que podría obtenerse en las condiciones estequiométricas particulares. Las concentraciones que se proporcionan como porcentajes se refieren a relaciones de masa, a menos que se indique de otro modo.

[0041] Un «paciente» es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, cobayo, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o primate no humano, tal como un mono, chimpancé, babuino o mono rhesus. «Paciente» incluye tanto a seres humanos como a animales.

[0042] Los términos «cantidad eficaz» o «cantidad terapéuticamente eficaz», cuando se usan en relación con un compuesto, hacen referencia a una cantidad suficiente del compuesto para proporcionar el resultado biológico deseado. El resultado puede ser una reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una «cantidad eficaz» para uso terapéutico es la cantidad de la composición que comprende un compuesto, tal como se describe en la presente, necesaria para proporcionar una disminución clínicamente significativa en una enfermedad. Una «cantidad eficaz» adecuada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica mediante el uso de experimentación de rutina. Por tanto, la expresión «cantidad eficaz» hace referencia, generalmente, a la cantidad para la que la sustancia activa tiene efectos terapéuticos.

[0043] Tal como se usa en la presente, los términos «tratar» o «tratamiento» son sinónimos del término «prevenir» y están destinados a indicar un aplazamiento del desarrollo de enfermedades, prevenir el desarrollo de enfermedades y/o reducir la gravedad de los síntomas que se espera que se desarrollen. Por lo tanto, estos términos incluyen mejorar los síntomas de la enfermedad existente, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de los síntomas, inhibir el trastorno o la enfermedad, por ejemplo, detener el desarrollo del trastorno o la enfermedad, aliviar el trastorno o la enfermedad, provocar la regresión del trastorno o la enfermedad, aliviar una afección provocada por la enfermedad o el trastorno, o detener o aliviar los síntomas de la enfermedad o el trastorno. En determinadas modalidades, «tratar» o «tratamiento» hacen referencia a promover un fenotipo de piel saludable.

[0044] El término «trastorno» se usa en la presente descripción para hacer referencia a los términos enfermedad o afección, y se usa de forma indistinta con estos, a menos que se indique de otro modo.

[0045] Se pretende que el uso de los términos «farmacéuticamente aceptable» o «farmacológicamente aceptable» signifique un material que no es biológicamente, o de otro modo, no deseable; el material puede administrarse a un individuo sin provocar ningún efecto biológico sustancialmente no deseable ni interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

[0046] El término «portador», tal como se usa en la presente descripción, comprende portadores, excipientes y diluyentes y significa material, composición o vehículo, tal como un material de relleno sólido o líquido, diluyente, excipiente, solvente o encapsulante, involucrado en el transporte o la transferencia de un agente farmacéutico de un órgano o una parte del cuerpo a otro órgano o parte del cuerpo de un sujeto. Los excipientes deben seleccionarse en base a la compatibilidad y las propiedades del perfil de liberación de la forma de dosificación deseada. Los ejemplos de materiales portadores incluyen, por ejemplo, aglutinantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración, agentes de relleno, tensioactivos, solubilizantes, estabilizadores, lubricantes, agentes humectantes, diluyentes, dispersiones secadas por pulverización, y similares.

[0047] El término «materiales portadores farmacéuticamente compatibles» puede comprender, por ejemplo, acacia, gelatina, dióxido de silicio coloidal, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnesio, caseinato de sodio, lecitina de soja, cloruro de sodio, fosfato tricálcico, fosfato dipotásico, lactilato de estearoilo sódico, carragenina, monoglicérido, diglicérido, almidón pregelatinizado, y similares. Véase, por ejemplo, Hoover, John E., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1975.

[0048] Tal como se usa en la presente, el término «sujeto» abarca los mamíferos y los no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, de modo no taxativo, cualquier miembro de la clase de mamíferos: seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratas, ratones y cobayos, y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, de modo no taxativo, aves, peces, y similares. En una modalidad de la presente descripción, el mamífero es un ser humano.

[0049] Los términos «administrado», «administración» o «administrar», tal como se usan en la presente descripción, hacen referencia a administrar directamente un compuesto descrito o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto descrito o una composición a un sujeto, o a administrar un derivado de profármaco o análogo del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o la composición al sujeto, que puede formar una cantidad equivalente de compuesto activo dentro del cuerpo del sujeto, incluido un animal, que lo necesita al poner en contacto a dicho individuo, o exponer de otro modo a dicho individuo, con dicho compuesto.

[0050] Tal como se usa en la presente, «alquilo» significa una cadena lineal o una cadena ramificada saturada que tiene de 1 a 40 átomos de carbono. Los grupos alquilo saturados representativos incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, y similares, y grupos alquilo más largos, tales como heptilo, y octilo, y similares. Un grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Los grupos alquilo que contienen tres o más átomos de carbono pueden ser lineales o ramificados. Tal como se usa en la presente, «alquilo inferior» significa un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

[0051] Tal como se usa en la presente, un «alquenilo» incluye una cadena de hidrocarburo ramificada o no ramificada que contiene 2-40 átomos de carbono. El grupo «alquenilo» contiene al menos un enlace doble. El enlace doble de un grupo alquenilo puede conjugarse o no conjugarse con otro grupo no saturado. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, de modo no taxativo, etilenilo, vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo, 2-etilhexenilo, 2-propil-2-butenilo, 4-(2-metil-3-butenio)-pentenilo, y similares. Un grupo alquenilo puede estar sustituido o no sustituido. El alquenilo, tal como se define en la presente, también puede ser ramificado o lineal.

[0052] Tal como se usa en la presente, un «alquinilo» incluye una cadena de hidrocarburo no saturada ramificada o no ramificada que contiene 2-40 átomos de carbono. El grupo «alquinilo» contiene al menos un enlace triple. El enlace triple de un grupo alquinilo puede estar conjugado o no conjugado con otro grupo no saturado. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, de modo no taxativo, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, metilpropinilo, 4-metil-1-butinilo, 4-propil-2-pentinilo, 4-butil-2-hexinilo, y similares. Un grupo alquinilo puede estar sustituido o no sustituido.

[0053] También debe tenerse en cuenta que se supone que cualquier carbono, así como heteroátomo con valencias insatisfechas en el texto, esquemas, ejemplos y tablas de la presente, tiene la cantidad suficiente de átomos de hidrógeno para satisfacer las valencias.

[0054] Tal como se usa en la presente, las referencias a hidrógeno también pueden hacer referencia a una sustitución de deuterio si se desea. El término «deuterio», tal como se usa en la presente, significa un isótopo estable de hidrógeno que tiene números impares de protones y neutrones.

[0055] El término «halo» o «halógeno» hace referencia a flúor, cloro, bromo o yodo.

[0056] Tal como se usa en la presente, el término «haloalquilo» hace referencia a un grupo alquilo, tal como se define en la presente, que se sustituye con uno o más halógenos. Los ejemplos de grupos haloalquilo incluyen, de modo no taxativo, trifluorometilo, difluorometilo, pentafluoroetilo, triclorometilo, etc.

[0057] A menos que se defina específicamente de otro modo, el término «arilo» hace referencia a grupos hidrocarburos aromáticos y cíclicos que tienen de 1 a 3 anillos aromáticos, que incluyen grupos bicíclicos o monocíclicos tales como fenilo, bifenilo o naftilo. Cuando contienen dos anillos aromáticos (bicíclicos, etc.), los anillos aromáticos del grupo arilo pueden unirse en un único punto (por ejemplo, bifenilo) o fusionarse (por ejemplo, naftilo). El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los propios sustituyentes también pueden estar opcionalmente sustituidos. Además, cuando contienen dos anillos fusionados, los grupos arilo definidos en la presente pueden tener un anillo no saturado o parcialmente saturado fusionado con un anillo completamente saturado. Los ejemplos de sistemas de anillos de estos grupos arilo incluyen, de modo no taxativo, fenilo, bifenilo, naftilo, antracenilo, fenalenilo, fenantrenilo, indanilo, indenilo, tetrahidronaftalenilo, tetrahidrobenzoannulenilo, y similares.

[0058] A menos que se defina específicamente de otro modo, «heteroarilo» significa un radical aromático monocíclico o policíclico monovalente de 5 a 18 átomos en el anillo o un radical aromático policíclico, que contiene uno o más heteroátomos en el anillo que se seleccionan de N, O o S, los átomos del anillo restantes son C. Heteroarilo, tal como se define en la presente, también significa un grupo heteroaromático bicíclico, en donde el heteroátomo se selecciona de N, O o S. El radical aromático está opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos en la presente. Los propios sustituyentes también pueden estar opcionalmente sustituidos. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, benzotiofeno, furilo, tienilo, pirrolilo, piridilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, pirazinilo, indolilo, tiofen-2-ilo, quinolilo, benzopirano, isotiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tieno[3,2-b]tiofeno, triazolilo, triazinilo, imidazo[1,2-b]pirazolilo, furo[2,3-c]piridinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, indazolilo, pirrolo[2,3-c]piridinilo, pirrolo[3,2-c]piridinilo, pirazolo[3,4-c]piridinilo, benzoimidazolilo, tieno[3,2-c]piridinilo, tieno[2,3-c]piridinilo, tieno[2,3-b]piridinilo, benzotiazolilo, indolilo, indolinilo, indolinonilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzofuranilo, benzofurano, cromanilo, tiocromanilo, tetrahidroquinolinilo, dihidrobenzotiazina, dihidrobenzoxanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, 1,6-naftiridinilo, benzo[de]isoquinolinilo, pirido[4,3-b][1,6]naftiridinilo, tieno[2,3-b]pirazinilo, quinazolinilo, tetrazolo[1,5-a]piridinilo, [1,2,4]triazolo[4,3-a]piridinilo, isoindolilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo, pirrolo[3,4-b]piridinilo, pirrolo[3,2-b]piridinilo, imidazo[5,4-b]piridinilo, pirrolo[1,2-a]pirimidinilo, tetrahidropirrolo[1,2-a]pirimidinilo, 3,4-dihidro-2H-1 λ ²-pirrolo[2,1-b]pirimidina, dibenzo[b,d] tiofeno, piridin-2-ona, furo[3,2-c]piridinilo, furo[2,3-c]piridinilo, 1H-pirido[3,4-b][1,4] tiazinilo, benzoaxazolilo, benzoisoxazolilo, furo[2,3-b]piridinilo, benzotiofenilo, 1,5-naftiridinilo, furo[3,2-b]piridina, [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridinilo, benzo [1,2,3]triazolilo, imidazo[1,2-a]pirimidinilo, [1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazinilo, benzo[c][1,2,5]tiadiazolilo, benzo[c][1,2,5]oxadiazol, 1,3-dihidro-2H-benzo[d]imidazol-2-ona, 3,4-dihidro-2H-pirazolo [1,5-b][1,2]oxazinilo, 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-

a]piridinilo, tiazolo[5,4-d]tiazolilo, imidazo[2,1-b][1,3,4]tiadiazolilo, tieno[2,3-b]pirrolilo, 3H-indolilo, y derivados de estos. Además, cuando contienen dos anillos fusionados, los grupos heteroarilo que se definen en la presente pueden tener un anillo parcialmente saturado o no saturado fusionado con un anillo completamente saturado.

5 **[0059]** Tal como se usa en la presente, el término «cicloalquilo» hace referencia a un carbociclo saturado o parcialmente saturado monocíclico, fusionado o espiro policíclico, que tiene de 3 a 18 átomos de carbono por anillo. El anillo cicloalquilo o carbociclo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, por ejemplo, 1 a 5 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los propios sustituyentes también pueden estar opcionalmente sustituidos. Los ejemplos de grupos cicloalquilo
10 incluyen, de modo no taxativo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptanilo, ciclooctanilo, norboranilo, norborenilo, biciclo[2.2.2]octanilo, biciclo[2.2.2]octenilo, decahidronaftalenilo, octahidro-1H-indenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexa-1,4-dienilo, ciclohexa-1,3-dienilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftalenilo, octahidropentalenilo, 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-indenilo, 1,2,3,3a-tetrahidropentalenilo, biciclo[3.1.0]hexanilo, biciclo[2.1.0]pentanilo, espiro[3.3]heptanilo,
15 biciclo[2.2.1]heptanilo, biciclo[2.2.1]hept-2-enilo, biciclo[2.2.2]octanilo, 6-metilbiciclo[3.1.1]heptanilo, 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptanilo, y derivados de estos.

[0060] Tal como se usa en la presente, el término «cicloalquenilo» hace referencia a un carbociclo parcialmente saturado, monocíclico, fusionado o espiro policíclico, que tiene de 3 a 18 átomos de carbono por anillo y contiene al menos un enlace doble. El anillo cicloalquenilo puede estar
20 opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los propios sustituyentes también pueden estar opcionalmente sustituidos.

[0061] Tal como se usa en la presente, el término «heterocicloalquilo» o «heterociclilo» hace referencia a una estructura de anillos saturado o parcialmente no saturado y no aromático monocíclico, fusionado o espiro policíclico de 4 a 18 átomos que contienen carbono y heteroátomos
25 tomados de oxígeno, nitrógeno o azufre, y en donde no hay electrones π deslocalizados (aromaticidad) compartidos entre el carbono del anillo o los heteroátomos. La estructura del anillo heterocicloalquilo o heterociclilo puede estar sustituida con uno o más sustituyentes. Los propios sustituyentes también pueden estar opcionalmente sustituidos. Los ejemplos de anillos heterocicloalquilo o heterociclilo incluyen, de modo no taxativo, oxetanilo, azetidino, tetrahidrofuranilo,
30 pirrolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, piranilo, tiopiranilo, tetrahidropiranilo, dioxalinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, azepinilo, oxepinilo, diazepinilo, tropanilo, homotropanilo, dihidrotiofen-2(3H)-onilo, 1,1-dióxido de tetrahidrotiofeno, 2,5-dihidro-1H-pirrolilo, imidazolidin-2-ona, pirrolidin-2-ona, dihidrofuran-2(3H)-ona, 1,3-dioxolan-2-ona, 1,1-dióxido de isotiazolidina, 4,5-dihidro-1H-imidazolilo, 4,5-

dihidrooxazolilo, oxiranilo, pirazolidinilo, 4H-1,4-tiazinilo, tiomorfolinilo, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidropirazinilo, 1,3-oxazinan-2-ona, 1,1-dióxido de tetrahydro-2H-tiopyrano, 7-oxabicyclo[2.2.1]heptanilo, 1,1-dióxido de 1,2-tiazepano, octahidro-2H-quinolizinilo, 1,3-diazabicyclo[2.2.2]octanilo, 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxina, 3-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 8-azaspiro[4.5]decano, 8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 2-azabicyclo[2.2.1]heptano, 2,8-diazaspiro[5.5]undecanilo, 2-azaspiro[5.5]undecanilo, 3-azaspiro[5.5]undecanilo, decahidroisoquinolinilo, 1-oxa-8-azaspiro[4.5]decanilo, 8-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 1,4'-bipiperidinilo, azepanilo, 8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oxazinilo, 5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridinilo, 1,4-diazepanilo, fenoxatiinilo, benzo[d][1,3]dioxolilo, 2,3-dihidrobenzofuranilo, 2,3-dihidrobenczo[b][1,4] dioxinilo, 4-(piperidin-4-il)morfolinilo, 3-azaspiro[5.5]undecanilo, decahidroquinolinilo, piperazin-2-ona, 1-(pirrolidin-2-ilmetil)pirrolidinilo, 1,3'-bipirrolidinilo, y 6,7,8,9-tetrahydro-1H,5H-pirazolo[1,2-a][1,2]diazepinilo.

[0062] Se pretende que los intervalos numéricos, tal como se usan en la presente, incluyan números enteros secuenciales, a menos que se indique de otro modo. Por ejemplo, un intervalo expresado como «de 0 a 5» podría incluir 0, 1, 2, 3, 4 y 5.

[0063] Tal como se usa en la presente, el término «sustituido» significa que el grupo o resto específico tiene uno o más sustituyentes adecuados, en donde los sustituyentes pueden conectarse al grupo o resto específico en una o más posiciones. Por ejemplo, un arilo sustituido con un cicloalquilo puede indicar que el cicloalquilo se conecta a un átomo del arilo con un enlace o al fusionarse con el arilo y al compartir dos o más átomos comunes.

[0064] Tal como se usa en la presente, el término «no sustituido» significa que el grupo específico no tiene sustituyentes.

[0065] Se entiende que el término «opcionalmente sustituido» significa que determinado resto químico (por ejemplo, un grupo alquilo) puede (pero no debe) estar unido a otros sustituyentes (por ejemplo, heteroátomos). Por ejemplo, un grupo alquilo opcionalmente sustituido puede ser una cadena de alquilo completamente saturada (es decir, un hidrocarburo puro). De manera alternativa, el mismo grupo alquilo opcionalmente sustituido puede tener sustituyentes que no sean hidrógeno. Por ejemplo, en cualquier punto de la cadena puede estar unido a un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o cualquier otro sustituyente descrito en la presente. Por lo tanto, el término «opcionalmente sustituido» significa que un resto químico dado puede contener otros grupos funcionales, pero no necesariamente tiene otros grupos funcionales adicionales. Si no se indica de otro modo, los sustituyentes adecuados usados en la sustitución opcional de los grupos descritos incluyen, de modo no taxativo, oxo, -halógeno, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, haloalcoxi C₁-C₆, -Oalquenilo C₁-C₆, -Oalquinilo C₁-C₆, -alquenilo C₁-C₆, -alquinilo C₁-C₆, -OH, CN (ciano), -CH₂CN, -OP(O)(OH)₂, -C(O)OH, -OC(O)alquilo C₁-C₆, -C(O)alquilo

C_1-C_6 , $-C(O)$ -alquilenilo C_0-C_6 -cicloalquilo, $-C(O)$ -alquilenilo C_0-C_6 -heterocicloalquilo, $-C(O)$ -alquilenilo C_0-C_6 -arilo, $-C(O)$ -alquilenilo C_0-C_6 -heteroarilo, $-OC(O)$ Oalquilo C_1-C_6 , NH_2 , NH (alquilo C_1-C_6), N (alquilo C_1-C_6)₂, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH$ (alquilo C_1-C_6), $-C(O)N$ (alquilo C_1-C_6)₂, $-C(O)NH$ cicloalquilo, $-C(O)N$ (alquilo C_1-C_6)cicloalquilo, $-C(O)NH$ heterocicloalquilo, $-C(O)N$ (alquilo C_1-C_6)heterocicloalquilo, $-C(O)NH$ arilo, -
 5 $C(O)N$ (alquilo C_1-C_6)arilo, $-C(O)NH$ heteroarilo, $-C(O)N$ (alquilo C_1-C_6)heteroarilo, $-S(O)_2$ -alquilo C_1-C_6 , $-S(O)_2$ -haloalquilo C_1-C_6 , $-S(O)_2$ -cicloalquilo, $-S(O)_2$ -heterocicloalquilo, $-S(O)_2$ -arilo, $-S(O)_2$ -heteroarilo -alquilenilo C_0-C_6 - $S(O)_2NH_2$, $-S(O)_2NH$ alquilo C_1-C_6 , $-S(O)_2N$ (alquilo C_1-C_6)₂, $-S(O)_2NH$ cicloalquilo, $-S(O)_2NH$ heterocicloalquilo, $-S(O)_2NH$ arilo, $-S(O)_2NH$ heteroarilo, $-NHS(O)_2$ alquilo C_1-C_6 , $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ (alquilo C_1-C_6), $-NHS(O)_2$ arilo, $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ arilo, $-NHS(O)_2$ heteroarilo, $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ heteroarilo, $-NHS(O)_2$ cicloalquilo, $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ cicloalquilo, $-NHS(O)_2$ heterocicloalquilo, $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ heterocicloalquilo, $-N$ (alquilo C_1-C_6) $S(O)_2$ arilo, -alquilenilo C_0-C_6 -arilo, -alquilenilo C_0-C_6 -heteroarilo, -alquilenilo C_0-C_6 -cicloalquilo, -alquilenilo C_0-C_6 -heterocicloalquilo, -O-arilo, -NH-arilo, y N (alquilo C_1-C_6)arilo. Los propios sustituyentes también pueden estar
 10 opcionalmente sustituidos. Cuando se muestra un resto multifuncional, el punto de unión al núcleo se indica mediante una línea, por ejemplo, (cicloalquiloxi)alquilo- hace referencia a que alquilo es el punto de unión al núcleo mientras que cicloalquilo está unido al alquilo mediante el grupo oxi. «Opcionalmente sustituido» también hace referencia a «sustituido» o «no sustituido», con los significados descritos anteriormente.

[0066] Tal como se usa en la presente, el término «enlazador» o «resto enlazador» hace referencia a
 20 un grupo que conecta dos grupos y tiene una estructura principal de entre 0 y 100 átomos. Un enlazador o enlace puede ser un enlace covalente (es decir, una cadena principal de 0 átomos) que conecta dos grupos o una cadena de entre 1 y 100 átomos de longitud, por ejemplo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, o 100 átomos de carbono de longitud,
 25 donde el enlazador puede ser lineal, ramificado, cíclico o de un solo átomo. En determinados casos, uno o más átomos de carbono de una cadena principal enlazadora pueden estar opcionalmente sustituidos con un heteroátomo de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los enlaces entre los átomos de la cadena principal pueden estar saturados o no saturados. El enlazador puede incluir uno o más grupos sustituyentes, por ejemplo, un grupo alquilo, arilo o alquienilo. Un enlazador puede incluir, de modo no taxativo,
 30 oligo(etilenglicol), éteres, tioéteres, aminas terciarias, alquilos, que pueden ser lineales o ramificados, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletil (iso-propilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil (t-butilo), y similares. La cadena principal enlazadora puede incluir un grupo cíclico, por ejemplo, un arilo, un heterociclo, o un grupo cicloalquilo, donde 2 o más átomos, por ejemplo, 2, 3, o 4 átomos, del grupo cíclico se incluyen en la cadena principal. Un enlazador puede ser escindible o no escindible.

[0067] A menos que se indique lo de otro modo, el término peso molecular hace referencia al peso molecular promedio en peso (M_w).

[0068] El término «heteroalquileno» hace referencia a un alquileno divalente que tiene uno o más átomos de carbono reemplazados con azufre, oxígeno o NR^d , donde R^d es hidrógeno o alquilo. Un heteroalquileno puede ser lineal, ramificado, cíclico, o combinaciones de estos.

[0069] El término «heteroalquenileno» hace referencia a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono, y uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, S u O) en la cadena principal de estos.

[0070] El término «heteroalquinileno» hace referencia a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un enlace triple carbono-carbono, y uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, S u O) en la cadena principal de estos.

[0071] El término «poliplejo», tal como se usa en la presente, hace referencia a un complejo entre un ácido nucleico y un polímero. El ácido nucleico se une al polímero a través de enlaces no covalentes, en particular, enlaces electrostáticos.

[0072] El término «plásmido» hace referencia a un elemento extracromosómico que, a menudo, porta un gen que no forma parte del metabolismo central de la célula y, usualmente tiene forma de moléculas de ADN de cadena doble circular. Dichos elementos pueden ser secuencias que de replicación autónoma, secuencias que integran genomas, secuencias de nucleótidos o fagos, lineales, circulares o superhelicoidales de un ADN o ARN de cadena simple o doble, derivadas de cualquier fuente, en las que se han unido o recombinado una cantidad de secuencias de nucleótidos en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' adecuada en una célula. Tal como se usa en la presente, el término «plásmido» hace referencia a una construcción compuesta por material genético (es decir, ácidos nucleicos). Normalmente, un plásmido contiene un origen de replicación que es funcional en células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *Escherichia coli*, y marcadores seleccionables para detectar células hospedadoras bacterianas que comprenden el plásmido.

[0073] El término «nanoplásmido» hace referencia a una secuencia de ADN circular que tiene una secuencia bacteriana reducida que proporciona un plásmido más pequeño con el inserto de gen deseado. Por ejemplo, los nanoplásmidos producidos por un sistema de selección de ARN-OUT libre de antibióticos y los métodos elaborarlos se describen en la patente estadounidense n.º 9,109,012, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia, patentada por Nature Technology.

[0074] El término «ácido nucleico» hace referencia a un polímero biológico de bases de nucleótidos, y puede incluir, de modo no taxativo, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), micro ARN (miARN), y ácido nucleico peptídico (PNA).

[0075] El término «minicírculo» hace referencia a ADN circular pequeño, de tamaño mínimo, derivado de un plásmido original mediante recombinación intramolecular para eliminar las secuencias de replicación bacteriana.

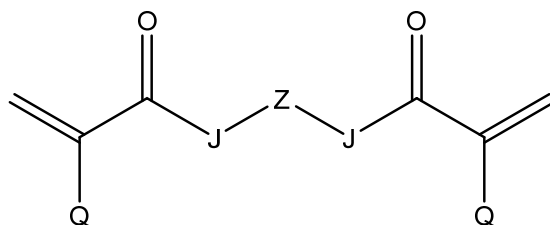
[0076] El término «sistema de edición génica» hace referencia a un sistema capaz de alterar un ácido nucleico diana mediante una de las muchas vías de reparación del ADN.

[0077] La presente descripción se refiere a una nueva clase de polímeros ramificados, incluidos los polímeros sintetizados mediante una estrategia de combinación de oligómeros lineales. En algunas modalidades, los oligómeros lineales de poli(β -amino éster) están conectados mediante unidades de ramificación para formar poli(β -amino éster) híbrido lineal-ramificado multifuncional (LBPAE). Los polímeros de la presente descripción se diseñan y preparan para una variedad de aplicaciones, que incluyen, de modo no taxativo, la transfección génica de fibroblastos de alto rendimiento. En fibroblastos dérmicos primarios humanos (HPDF) y fibroblastos de embriones de ratón (3T3), la expresión transgénica ultra alta se logra mediante LBPAE: se detecta una mejora de hasta 3292 veces en la expresión de gluciferasa (Gluc) y casi 100 % de la expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP). Los estudios mecanicistas en profundidad revelan que LBPAE puede navegar las múltiples barreras extra e intracelulares involucradas en la transfección génica de fibroblastos. Más importante aún, LBPAE puede administrar de manera eficaz una variedad de genes (por ejemplo, COL7A1) para regular por aumento sustancialmente una expresión deseada (por ejemplo, la proteínas de colágeno de tipo VII (C7) en HPDF), lo que demuestra su gran potencial en el tratamiento de enfermedades (por ejemplo, genodermatosis por deficiencia de C7, tal como epidermólisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB)).

Polímeros

[0078] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona polímeros elaborados mediante un proceso de:

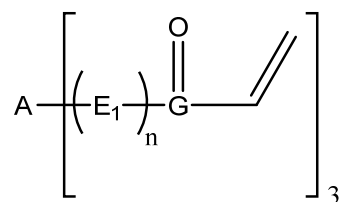
(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)



con una primera amina que tiene la fórmula $\text{R}_1\text{-NH}_2$ o $\text{R}_1\text{-N(H)-Z'-N(H)-R}_1$;

(b) hacer reaccionar el producto de la Etapa (a) con una segunda amina que tiene la fórmula $\text{R}_2\text{-NH}_2$ o $\text{R}_2\text{-N(H)-Z''-N(H)-R}_2$; y

(c) hacer reaccionar el producto de la Etapa (b) con un compuesto de la fórmula (B):



(B);

en donde

5 cada J es independientemente $-\text{O}-$ o $-\text{NH}-$;

Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

10 en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$, éter $\text{C}_1\text{-C}_6$, tioéter $\text{C}_1\text{-C}_6$, sulfona $\text{C}_1\text{-C}_6$, sulfóxido $\text{C}_1\text{-C}_6$, amida primaria $\text{C}_1\text{-C}_6$, amida secundaria $\text{C}_1\text{-C}_6$, haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$ alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$, heterociclilo $\text{C}_3\text{-C}_6$, heteroarilo $\text{C}_2\text{-C}_5$ o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{10}$; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;

15 G es $-\text{C}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{P}(\text{OR}_1)-$, o $-\text{P}(\text{OH})-$;

cada Q es H o un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ lineal o ramificado;

cada E_1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, $-\text{N}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

20 cada uno de R_1 y R_2 es independientemente alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{40}$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_{40}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, heteroalquenileno $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, cicloalquenilo $\text{C}_4\text{-C}_8$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, heteroalquinileno $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{40}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, cicloalquenilo $\text{C}_4\text{-C}_8$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{40}$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están

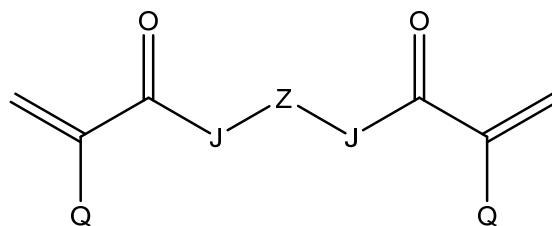
25 opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, $-\text{OH}$, $-\text{O}-$ alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_6)$, o $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_6)_2$; y R_1 no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupos sulfonamida, un tiol, un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, un alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$, un éter $\text{C}_1\text{-C}_6$, un tioéter $\text{C}_1\text{-C}_6$, una sulfona $\text{C}_1\text{-C}_6$, un sulfóxido $\text{C}_1\text{-C}_6$, una amida primaria $\text{C}_1\text{-C}_6$, una amida secundaria $\text{C}_1\text{-C}_6$, un haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro,

30 un grupo nitroso, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$ alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$,

heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y cada n es al menos 1.

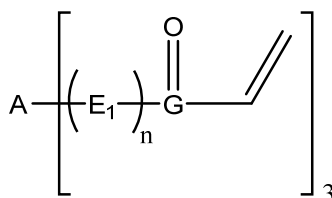
[0079] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona polímeros elaborados mediante un proceso de:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)



(A)

y un compuesto de la fórmula (B):



(B);

con una primera amina que tiene la fórmula R₁-NH₂ o R₁-N(H)-Z'-N(H)-R₁;

(b) hacer reaccionar el producto de la Etapa (a) con una segunda amina que tiene la fórmula R₂-NH₂ o R₂-N(H)-Z''-N(H)-R₂;

en donde

cada J es independientemente -O- o -NH-;

Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, éter C₁-C₆, tioéter C₁-C₆, sulfona C₁-C₆, sulfóxido C₁-C₆, amida primaria C₁-C₆, amida secundaria C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ o arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

G es -C-, -S-, -S(O)-, -P(OR₁)-, o -P(OH)-;

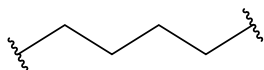
cada Q es H o un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado;

cada E₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, -N-, -O-, -S-, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

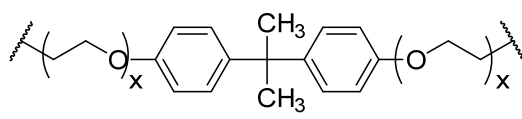
cada uno de R₁ y R₂ es independientemente alquilo C₁-C₄₀, heteroalquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀,

- 5 heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂; y R₁ no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupos sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y
- 10 cada n es al menos 1.

- [0080]** En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un
- 20 carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un alquileno-carbociclo contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos, o un alquileno-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. Z puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida
- 25 secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z puede ser un grupo alquileno que incluye, de modo no
- 30 taxativo, alquileno C₁-C₂₄, alquileno C₁-C₂₀, alquileno C₁-C₁₆, alquileno C₁-C₁₂, alquileno C₁-C₈, alquileno C₁-C₆, alquileno C₁-C₄, alquileno C₁-C₃, alquileno C₁-C₂, alquileno C₁. Los grupos alquileno representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o

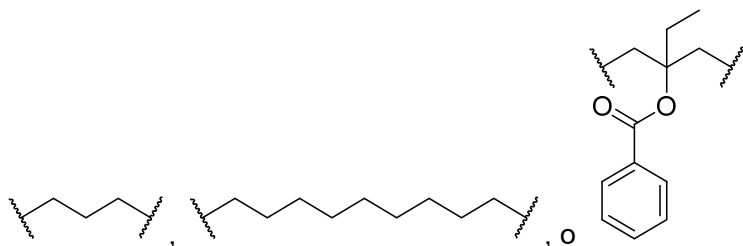
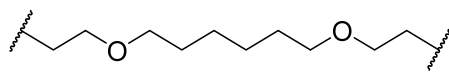
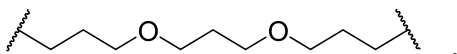
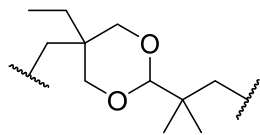
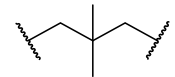
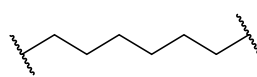
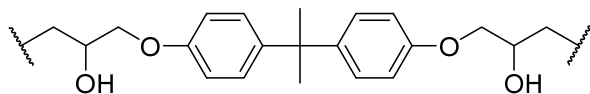
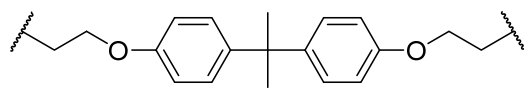
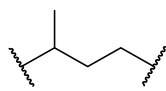


5



10

Z es uno de los siguientes



20

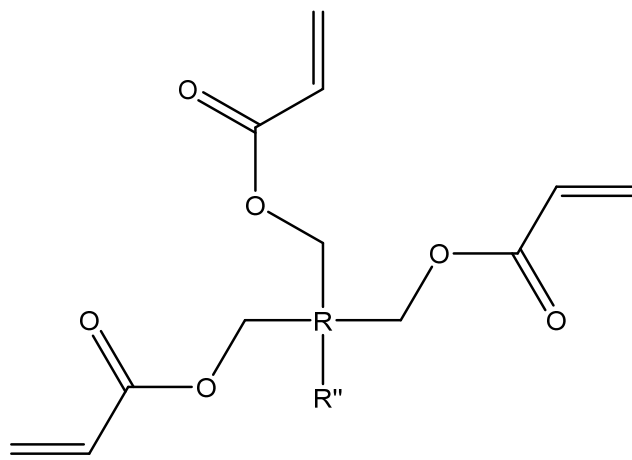
un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un

éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z' es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z' puede ser un grupo alquileo que incluye, de modo no taxativo, alquileo C₁-C₂₄, alquileo C₁-C₂₀, alquileo C₁-C₁₆, alquileo C₁-C₁₂, alquileo C₁-C₈, alquileo C₁-C₆, alquileo C₁-C₄, alquileo C₁-C₃, alquileo C₁-C₂, alquileo C₁. Los grupos alquileo representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos.

[0082] En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un alquileo-carbociclo contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos, o un alquileo-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. Z'' puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z'' puede ser un grupo alquileo que incluye, de modo no taxativo, alquileo C₁-C₂₄, alquileo C₁-C₂₀, alquileo C₁-C₁₆, alquileo C₁-C₁₂, alquileo C₁-C₈, alquileo C₁-C₆, alquileo C₁-C₄, alquileo C₁-C₃, alquileo C₁-C₂, alquileo C₁. Los grupos alquileo representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos.

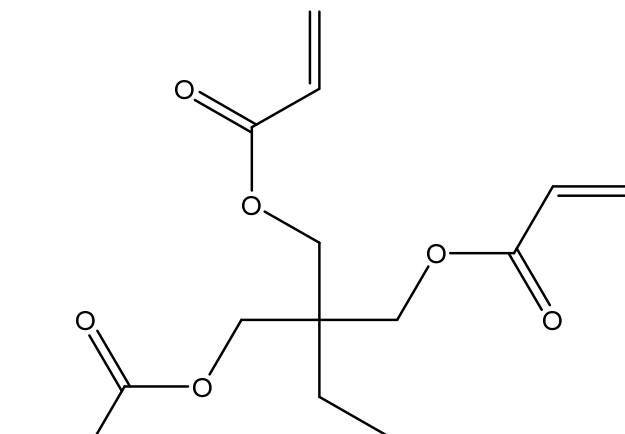
[0083] De acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, G es —C—, —S—, —S(O)—, —P(OR₁)—, o —P(OH)—, formando de ese modo un grupo carbonilo, sulfóxido, sulfona, y fosfono, respectivamente. Por lo tanto, en algunas modalidades, G es —C—. En algunas modalidades, G es —S—. En algunas modalidades, G es —S(O)—.

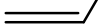
[0084] En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (B) es



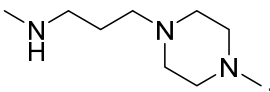
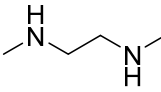
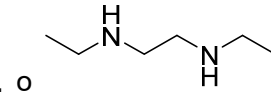
en donde

- R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos, y R no está sustituido o está sustituido con al menos un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y R'' es una cadena de carbono lineal o ramificada sustituida o no sustituida de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos. En algunas modalidades, R es 1 átomo de carbono. En algunas modalidades, R'' es una cadena de carbono lineal o ramificada tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo. Por ejemplo, en algunas



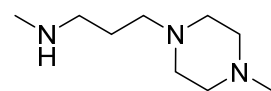
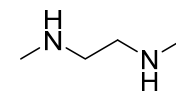
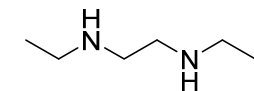
modalidades, el compuesto de la fórmula (B) es . En algunas modalidades, R es un carbocilo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono. Por ejemplo, R puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, fenilo o naftilo. En algunas modalidades, R es un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos.

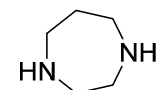
- 5 **[0085]** En determinadas modalidades, la primera amina tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$. En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula R_1-NH_2 . En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$. En algunas modalidades, la primera amina que tiene la

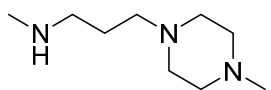
fórmula $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$ es , , o . En algunas modalidades, la primera

- 10 amina que tiene la fórmula $R_1-N(H)-Z'-N-(R_1)_2$ es

[0086] En determinadas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$. En algunas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula R_2-NH_2 . En algunas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$. En algunas modalidades, la segunda amina que

tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$ es , , , o

- 15 . En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N-(R_2)_2$. En algunas

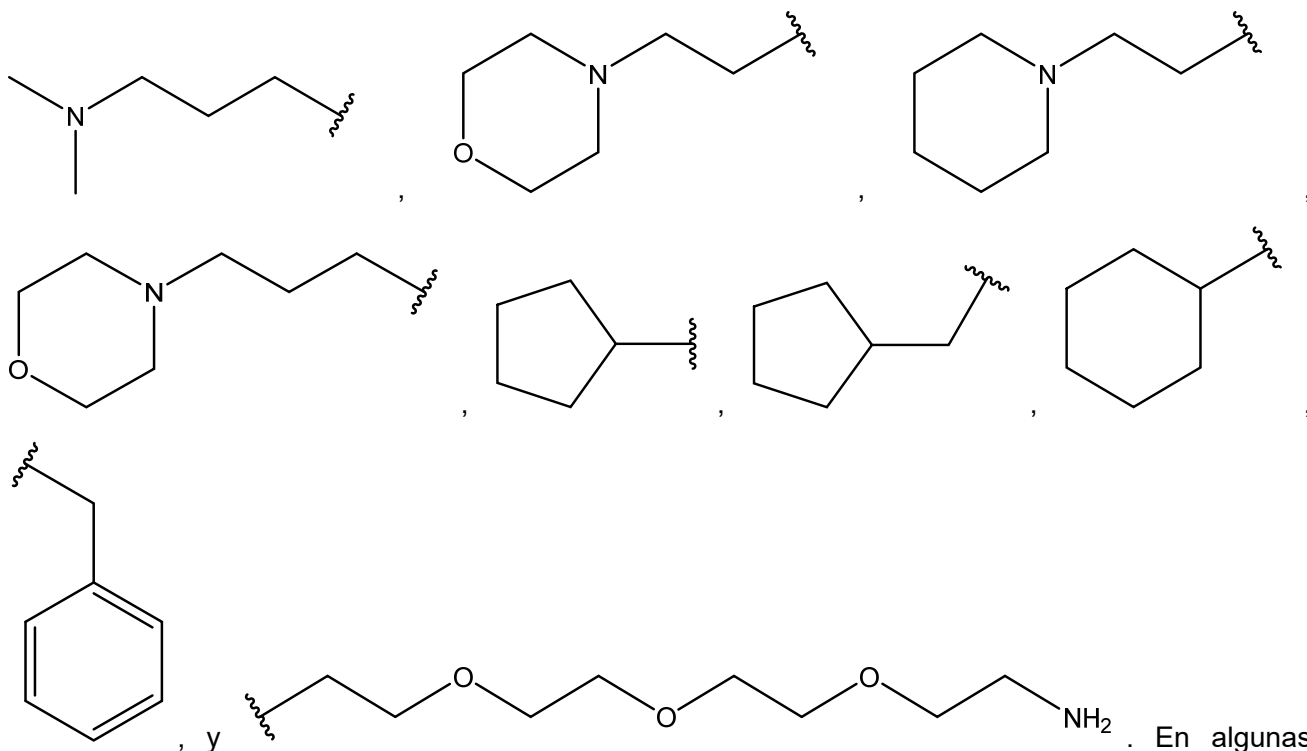
modalidades, la primera amina que tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N-(R_2)_2$ es .

[0087] En determinadas modalidades, R_1 es alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} , heteroalquenileno C_2-C_{40} , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , heteroalquinileno C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos

consiste

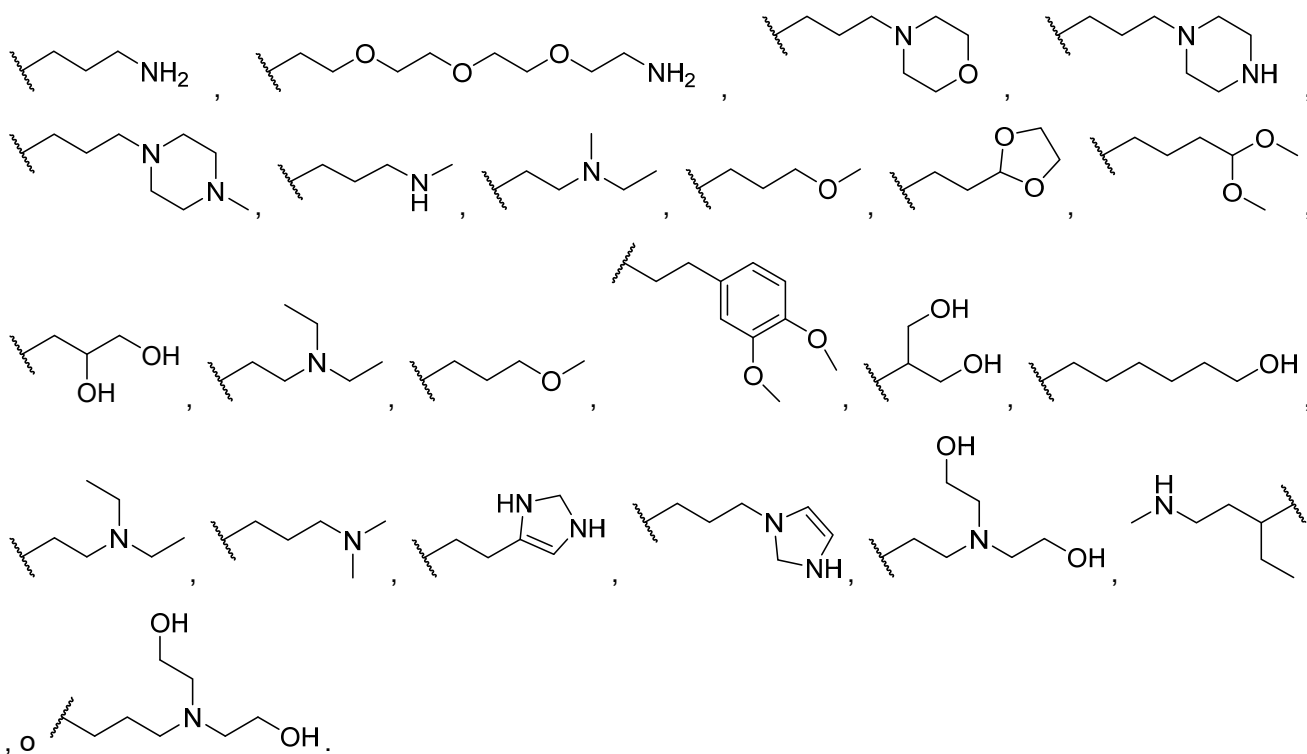


30



modalidades, R_1 es En algunas modalidades, R_1 es

5



10

[0088] En determinadas modalidades, R_2 es alquilo C_1 - C_{40} , heteroalquilo C_1 - C_{40} , alquenilo C_2 - C_{40} ,

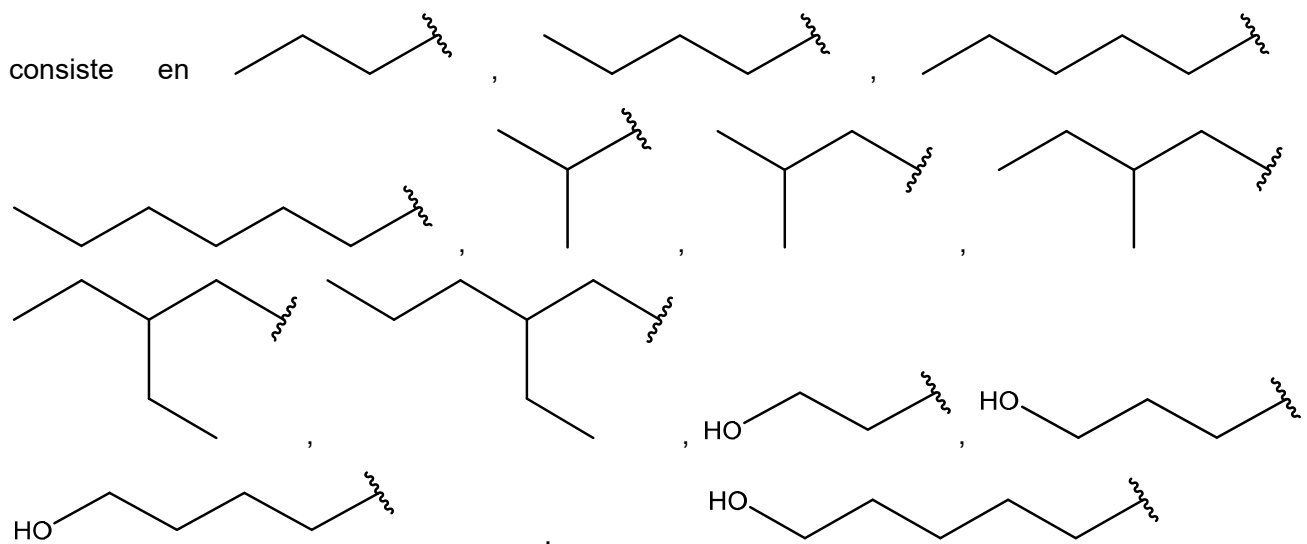
heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están

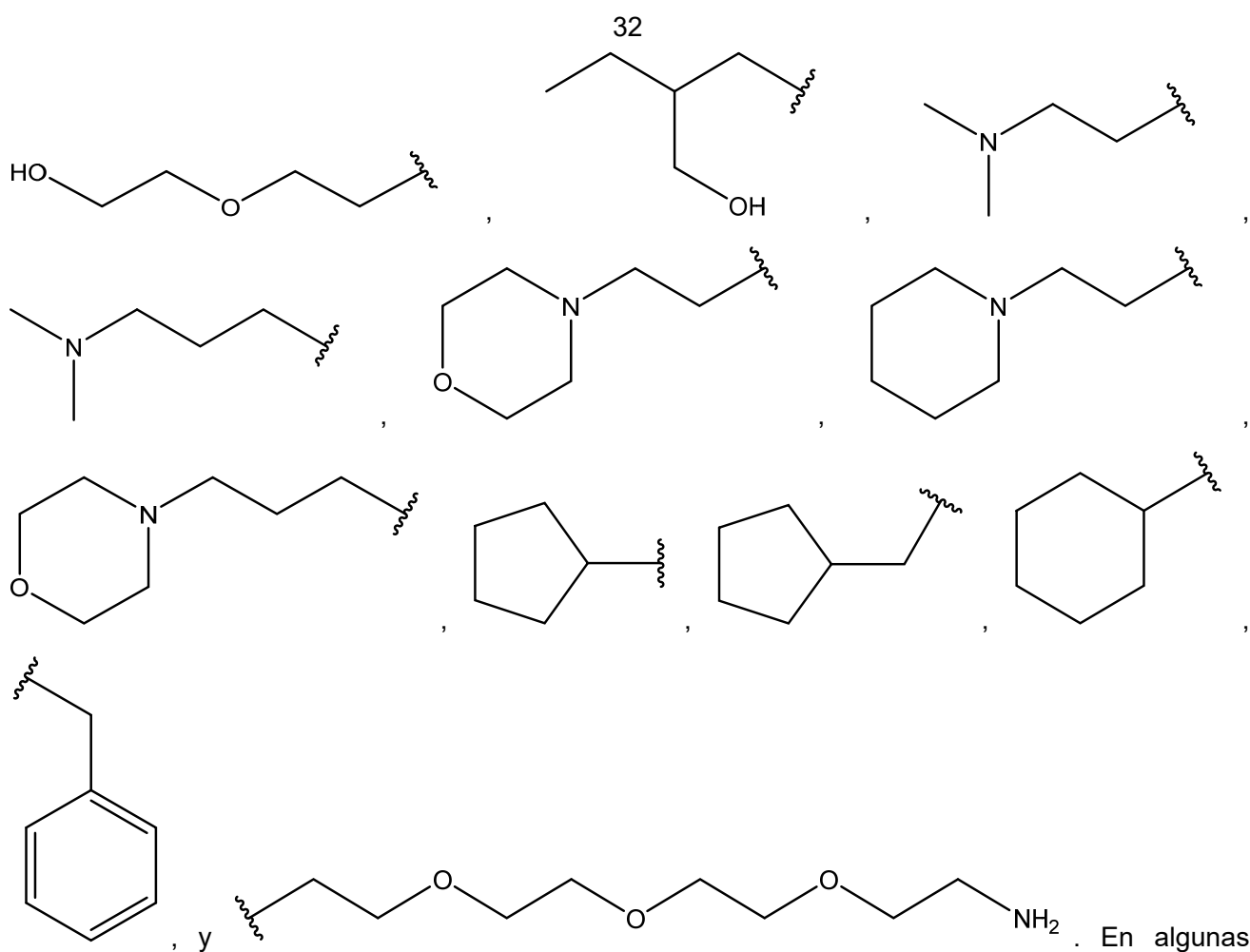
5 opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂. R₂ puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro,

10 un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, R₂ es —alquilo C₁-C₂₀. Por ejemplo, R₂ puede ser grupos alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, o C₂₀ tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-

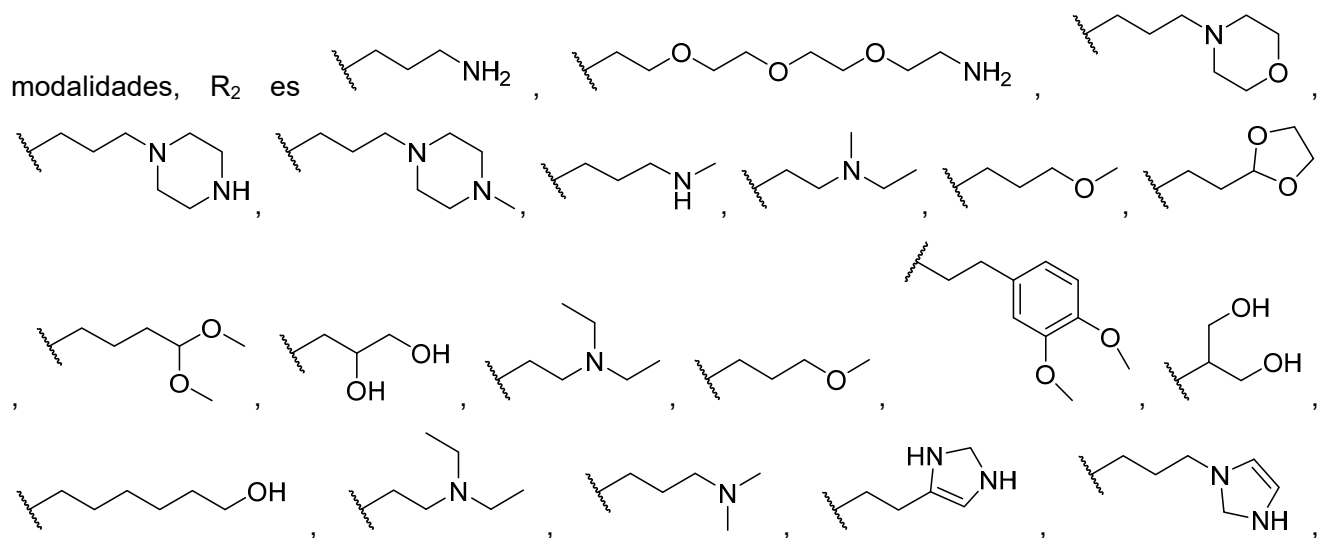
15 metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, n-undecilo, n-dodecilo, n-tridecilo, n-tetradecilo, n-pentadecilo, n-hexadecilo, n-heptadecilo, n-octadecilo, n-nonadecilo, o n-icosilo. En algunas modalidades, R₂ no está sustituido. En

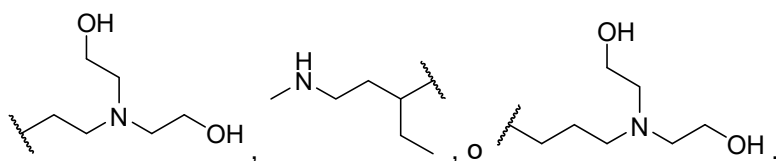
20 algunas modalidades, R₂ está sustituido. En algunas modalidades, R₂ se selecciona del grupo que





5 modalidades, R_2 es



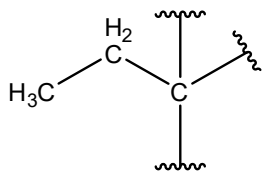


[0089] En algunas modalidades, cada Q es H o un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado. Por lo tanto, en algunas modalidades, cada Q es H. En otras modalidades, cada Q es un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado. Por ejemplo, cada Q puede ser metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, o n-decilo. En algunas modalidades, cada Q es metilo.

[0090] En algunas modalidades, cada J es -O-. En algunas modalidades, cada J es -NH-.

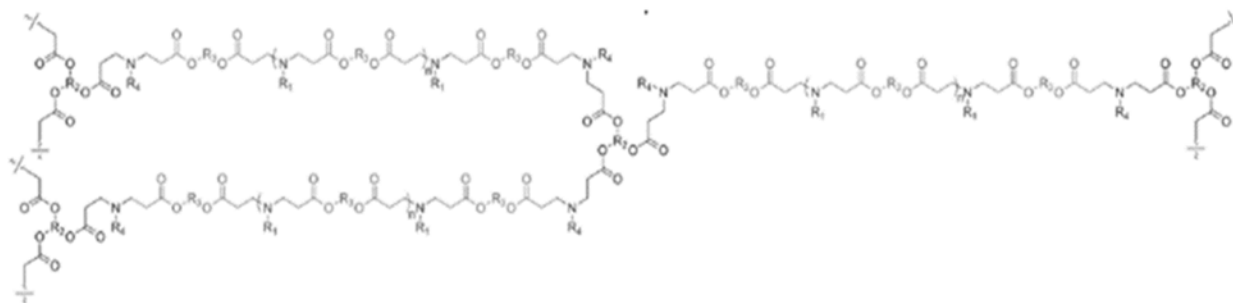
[0091] En algunas modalidades, cada E₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, -N-, -O-, -S-, alquileo, heteroalquileo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino. En algunas modalidades, cada E₁ es heteroalquileo. En algunas modalidades, cada E₁ es -CH₂-O-. En algunas modalidades, cada n es al menos 1. Por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n es 1.

[0092] En algunas modalidades, A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos.



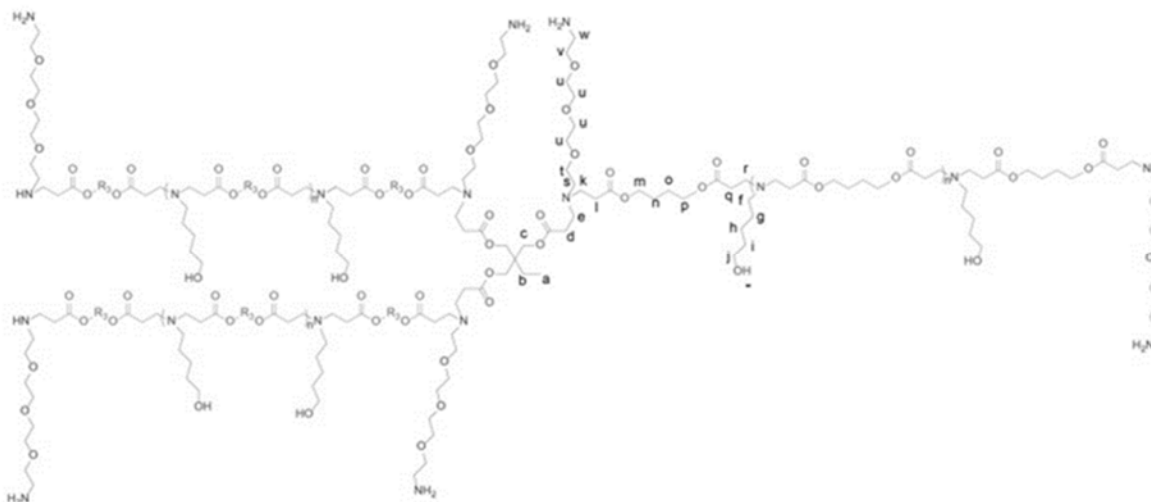
Por ejemplo, en algunas modalidades, A es

[0093] En algunas modalidades, el polímero de la presente descripción tiene la estructura general de



donde el enlace ondulado $\left(\sim \right)$ representa un enlace al resto del polímero, y en donde R₁, R₂, y R₄ tiene cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. Debido al crecimiento y la ramificación

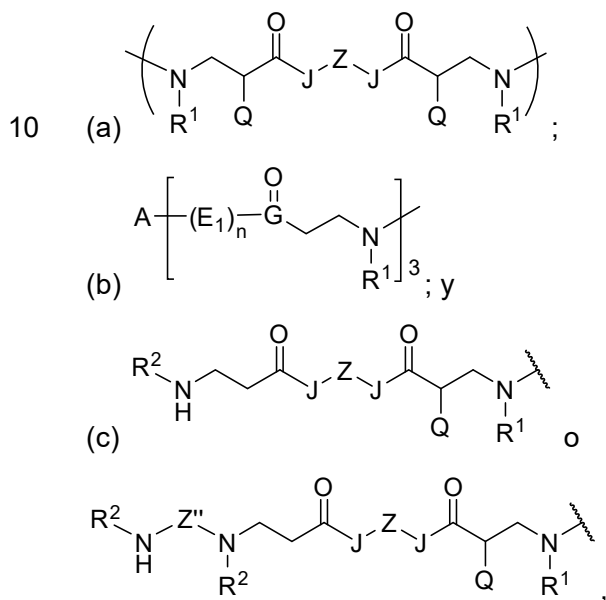
secuencial de oligómeros lineales altamente controlados, los polímeros resultantes tienen una distribución más uniforme de los segmentos lineales y las unidades de ramificación, tal como se ilustra en la estructura anterior. Tal como se describe en las secciones y los ejemplos posteriores, los polímeros poseen una fuerte afinidad de unión al ADN y pueden condensar el ADN para formular poliplejos de tamaño nanométrico con una eficiencia de absorción celular de casi 100 %. En algunas modalidades, el polímero de la presente descripción es



, en

donde los grupos R₂ tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente.

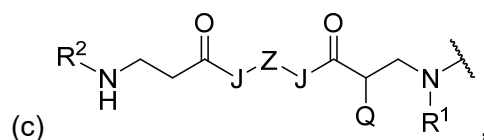
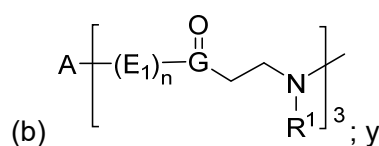
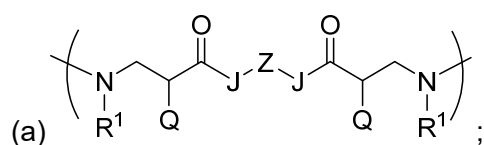
[0094] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero que comprende:



15 en donde R₁, R₂, A, E₁, G, J, Q, Z, Z'' y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a

alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

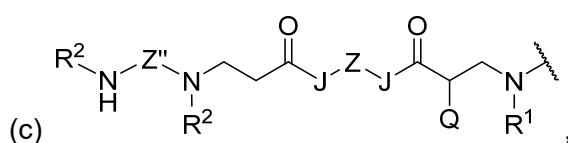
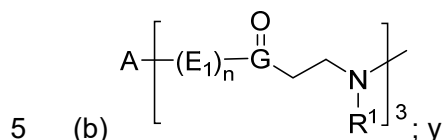
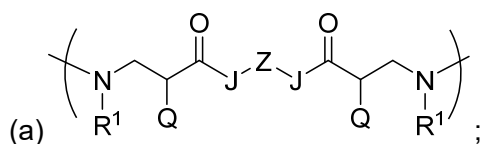
[0095] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero que comprende:



en donde R_1 , R_2 , A, E_1 , G, J, Q, Z, y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades

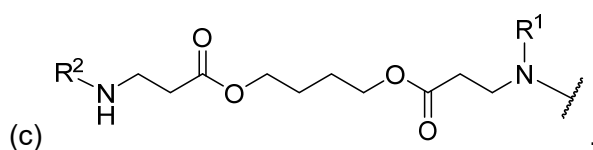
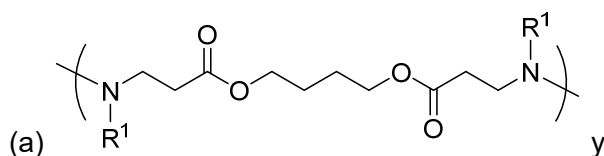
adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

[0096] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero que comprende:

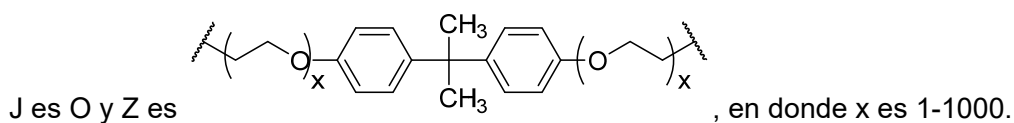
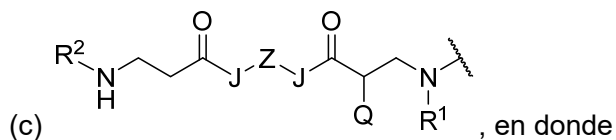
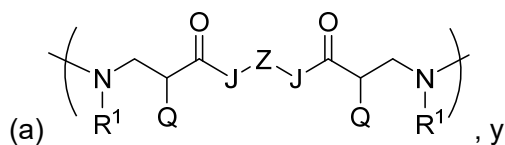


en donde R_1 , R_2 , A, E_1 , G, J, Q, Z, Z'' y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

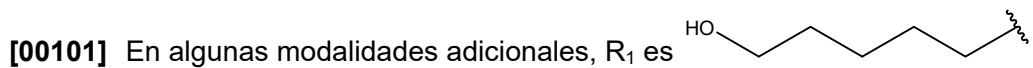
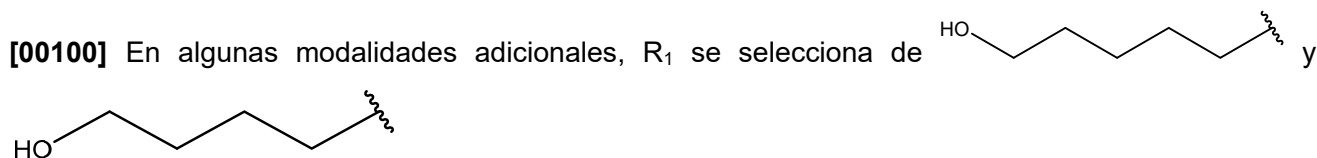
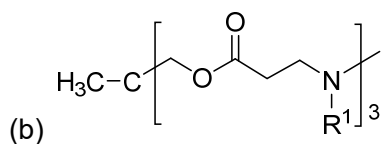
[0097] En algunas modalidades adicionales, el polímero comprende:



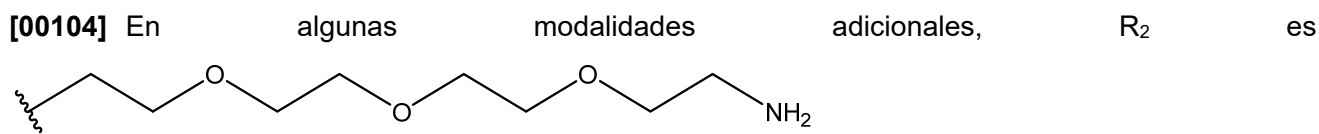
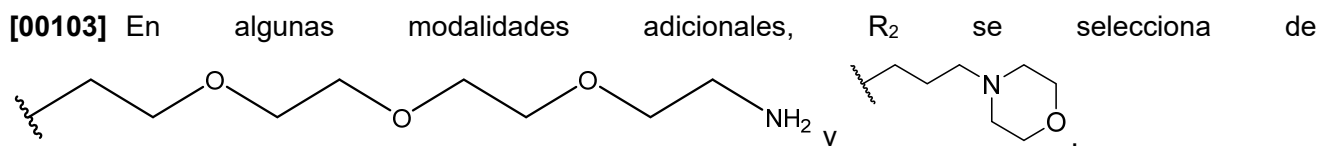
[0098] En algunas modalidades adicionales, el polímero comprende:



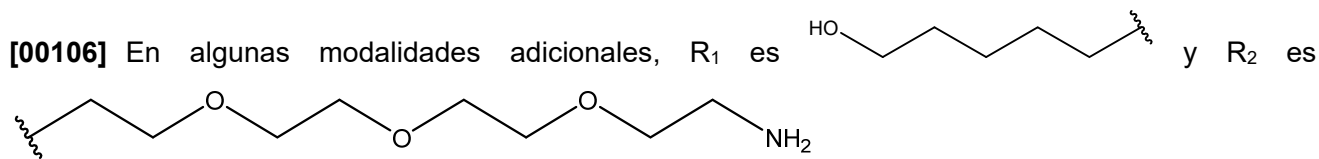
5 **[0099]** En algunas modalidades adicionales, el polímero comprende:



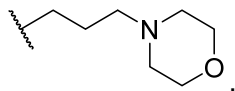
10 **[00102]** En algunas modalidades adicionales, R₁ es



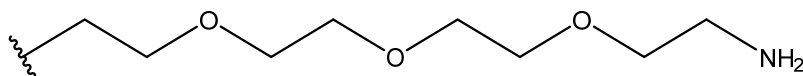
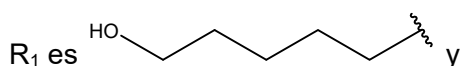
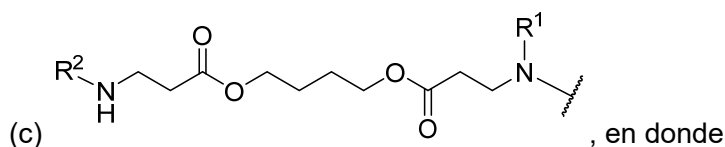
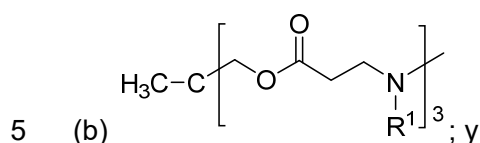
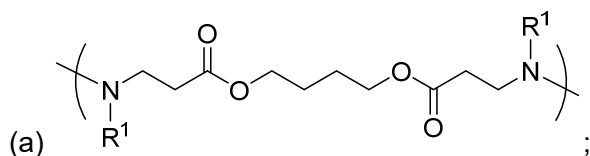
15 **[00105]** En algunas modalidades adicionales, R₂ es

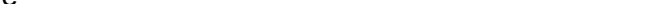


[00107] En algunas modalidades adicionales, R₁ es HO- y R₂ es



[00108] En algunas modalidades, el polímero comprende:



R_2 se selecciona de  NH_2 . En algunas

modalidades adicionales, el polímero tiene un M_W de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En

algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa.

En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa.

En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15

kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas

modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades

adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el

polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un

parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0.5. En algunas modalidades

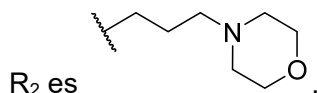
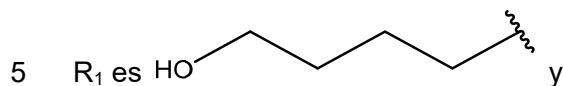
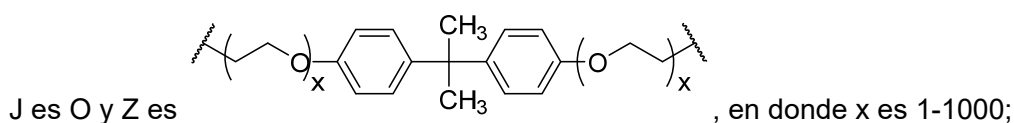
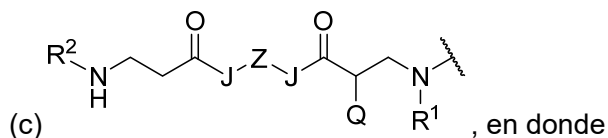
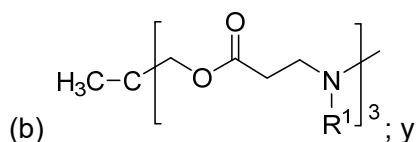
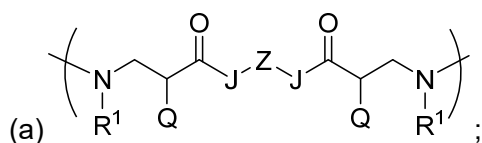
adicionales. el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el

intervalo de alrededor de 0.3 a alrededor de 0.5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene

un PDI de alrededor de 1.0 a alrededor de 8.0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene

un PDI de alrededor de 2.5

[00109] En algunas modalidades, el polímero comprende:



En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

20 **[00110]** En algunas modalidades, determinados polímeros de la presente descripción pueden describirse como polímeros lineales (oligómeros) de compuestos de la fórmula (A) y una primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$ (tal como se describe en la presente), reticulados con compuestos de la fórmula (B) (tal como se describe en la presente). Cuando los oligómeros lineales se preparan en condiciones en los cuales los compuestos de la fórmula (A) están presentes en exceso

molar en comparación con la primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$, las especies oligoméricas resultantes se terminan con grupos aceptores de Michael (por ejemplo, acrilato, metacrilato, acrilamida, u otro grupo similar), y pueden tener un casquete en el extremo en condiciones adecuadas con una segunda amina que tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$ (tal como se describe en la presente). Los uno o más oligómeros resultantes con casquetes en los extremos pueden hacerse reaccionar luego con un compuesto aceptor de Michael trifuncional de la fórmula (B) (tal como se describe en la presente) para proporcionar una estructura ramificada. Dichos polímeros reticulados pueden definirse alternativamente por la distribución del peso molecular de los segmentos oligoméricos (por ejemplo, valores de M_w en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 200, tal como se describe en la presente) y el porcentaje molar o en peso de las reticulaciones derivadas de la incorporación de compuestos aceptores de Michael de la fórmula (B).

[00111] En algunas modalidades, se hace reaccionar un exceso molar del compuesto de la fórmula (A) con la primera amina. Por ejemplo, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 10:1, lo que incluye alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00112] En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina es de alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 2:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina es de alrededor de 1,2:1. En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (A) se hace reaccionar con la primera amina en equivalencia molar (es decir, alrededor de 1:1).

[00113] En algunas modalidades, la etapa (a) se realiza en un solvente orgánico. Puede usarse una amplia variedad de solventes orgánicos en el contexto de la presente descripción, que incluye, de modo no taxativo, dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP) y similares; cetonas tales como acetona, metiletilcetona, metilisobutylcetona y similares; éteres tales como tetrahidrofurano (THF), dietiléter, butiléter terciario de metilo; hidrocarburos tales como tolueno, xileno, ciclohexano, y similares. En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza en DMSO.

[00114] En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 40 °C a alrededor de 120 °C, lo que incluye alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, o 120 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00115] En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, o 120 °C. En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza a alrededor de 90 °C.

[00116] En algunas modalidades, el producto de la Etapa (a) no se purifica antes de la Etapa (b). En otras modalidades, el producto de la Etapa (a) se purifica antes de la Etapa (b). El producto de la etapa (a) puede purificarse mediante una variedad de métodos y técnicas evidentes para un experto en la

técnica.

[00117] En algunas modalidades, se agrega un exceso molar de la segunda amina al producto de la Etapa (a). Por ejemplo, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la Etapa (a) puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 10:1, lo que incluye alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00118] En algunas modalidades, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la Etapa (a) es de alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la Etapa (a) es de alrededor de 5:1. En algunas modalidades, la segunda amina se hace reaccionar con el producto de la Etapa (a) en equivalencia molar (es decir, alrededor de 1:1).

[00119] En algunas modalidades, la Etapa (b) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 16 °C a alrededor de 40 °C. Por ejemplo, la Etapa (b) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, a alrededor de 40 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00120] En algunas modalidades, la Etapa (b) se realiza a una temperatura de alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, o alrededor de 40 °C.

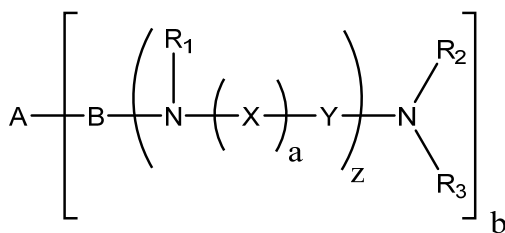
[00121] En algunas modalidades, el producto de la Etapa (b) no se purifica antes de la Etapa (c). En otras modalidades, el producto de la Etapa (b) se purifica antes de la Etapa (c). El producto de la etapa (b) puede purificarse mediante una variedad de métodos y técnicas evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, el producto de la Etapa (b) puede purificarse mediante diálisis.

[00122] En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a una temperatura superior a la de la Etapa

(b). Por ejemplo, la Etapa (c) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 21 °C a alrededor de 200 °C. Por ejemplo, la Etapa (c) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00123] En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101 alrededor de, 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, o alrededor de 200 °C. En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a alrededor de 90 °C.

[00124] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero de la fórmula (I):

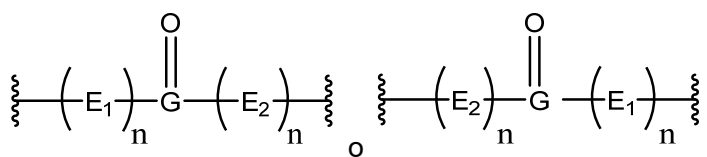


(I)

en donde

cada A es independientemente una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, éter C₁-C₆, tioéter C₁-C₆, sulfona C₁-C₆, sulfóxido C₁-C₆, amida primaria C₁-C₆, amida secundaria C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ o arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

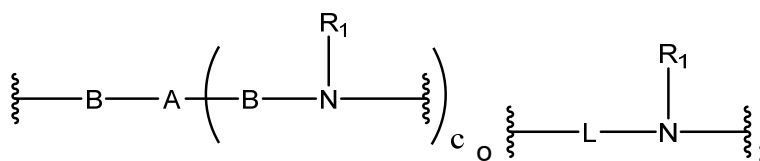


cada B es independientemente

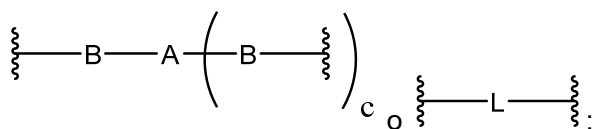
G es —C—, —S—, —S(O)—, —P(OR₁)—, o —P(OH)—; n es al menos 1;

cada E₁ se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, —N—, —O—, —S—, alquilenilo, heteroalquilenilo, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

cada E₂ se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, —N—, —O—, —S—, alquilenilo, heteroalquilenilo, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;



cada X es independientemente



cada Y es independientemente

cada L es independientemente un segundo resto de enlace;

en cada aparición, cada R₁, R₂ y R₃ es independientemente H, alquilo C₁-C₄₀, heteroalquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-

C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₈, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂; o

en donde R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar heterociclilo o heteroarilo que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O;

a es 1-1000;

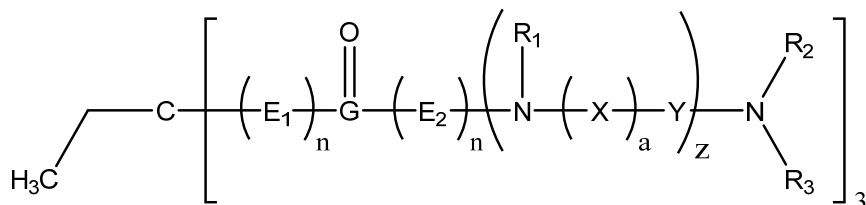
b es 3 o 4;

c es 1-3; y

z es 1-100;

con la condición de que al menos uno de R₂ y R₃ no sea H, y cuando G sea C, entonces E₁ no sea -CH₂-O-.

[00125] En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero de la fórmula (II):



(II)

en donde,

cada E₁ se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, -N-, -O-, -S-, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

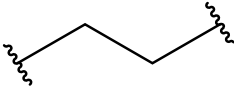
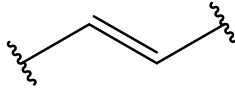
cada E₂ se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, -N-, -O-, -S-, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

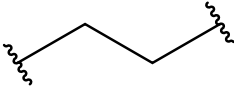
G es -C-, -S-, -S(O)-, -P(OR₁)-, o -P(OH)-; y

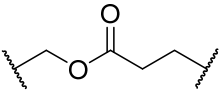
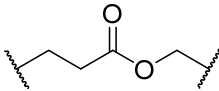
n es al menos 1,

con la condición de que, cuando G sea C, entonces E₁ no sea -CH₂-O-.

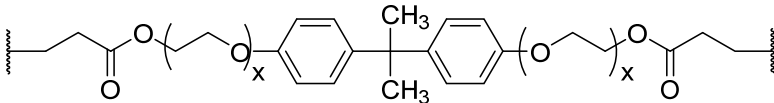
[00126] En algunas modalidades, cada E₁ y E₂ se seleccionan del grupo que consiste en un enlace covalente, -N-, -S-, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno. En algunas modalidades, cada E₁ es heteroalquileno. En algunas modalidades, cada E₁ es -CH₂-N-. En algunas modalidades, cada E₂ es alquileno. En algunas modalidades, cada E₂ es

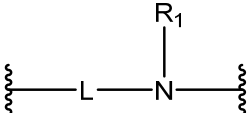
, , o . En algunas modalidades, cada E₂ es

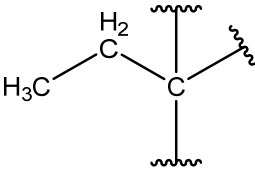
. En algunas modalidades, cada n es al menos 1. Por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n es 1. En algunas modalidades, G es –C–. En algunas

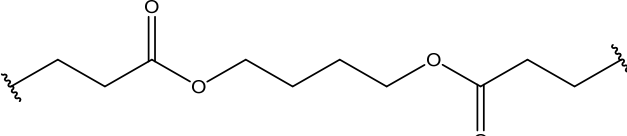
modalidades, cada B es  o .

5 **[00127]** En algunas modalidades, cada L es

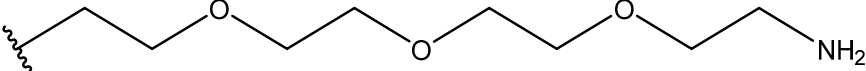
 en donde x es 1-1000. En algunas

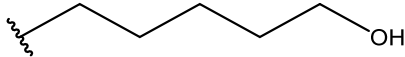
modalidades, a es al menos 2, b es 3, y cada X es . En algunas modalidades, cada

A es . En algunas modalidades, cada L es

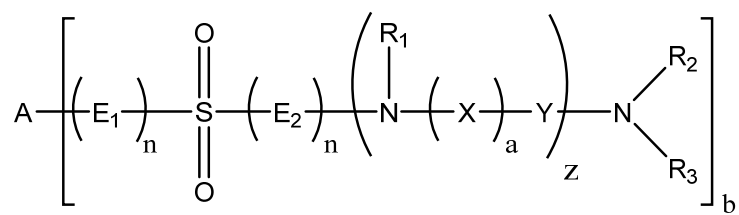
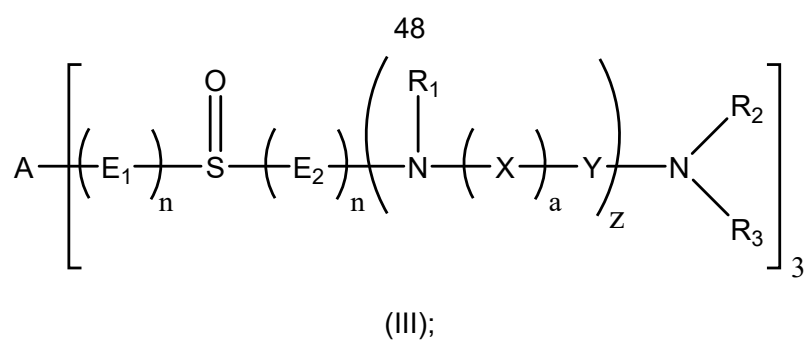
.

10 **[00128]** En algunas modalidades, cada R₂ y/o R₃ es

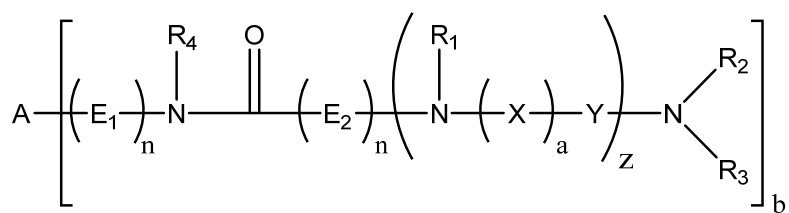
.

[00129] En algunas modalidades, cada R₁ es .

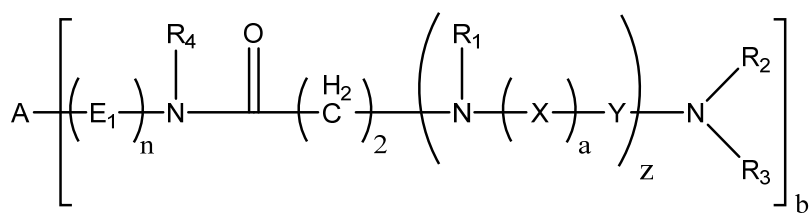
[00130] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polímero de las fórmulas (III) a (VIIe):



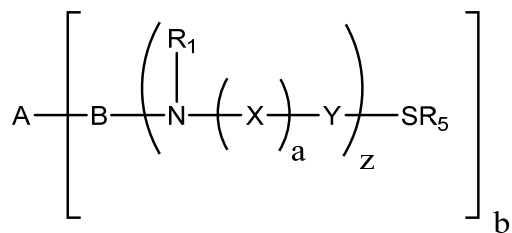
(IV);



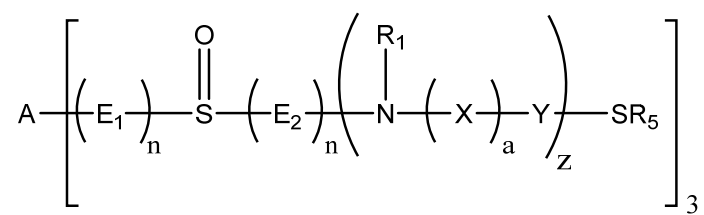
(V);



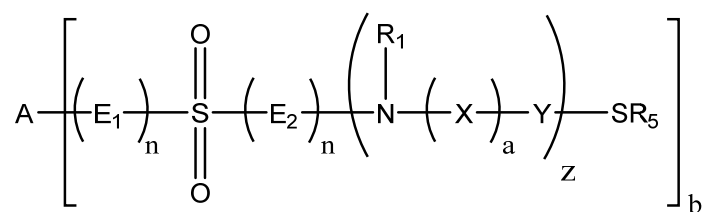
(Va);



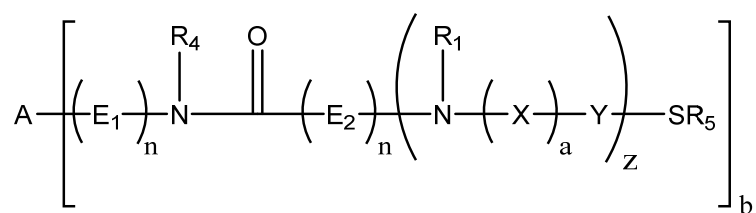
(VI);



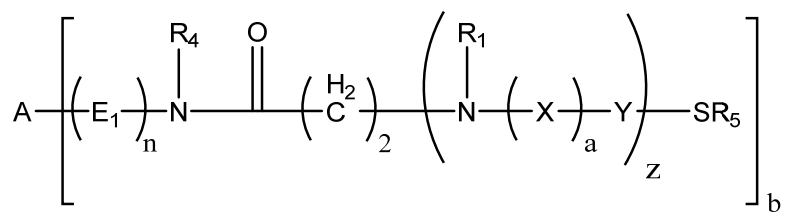
(VIb);



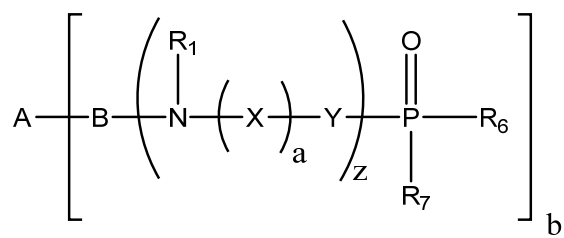
(VIc);



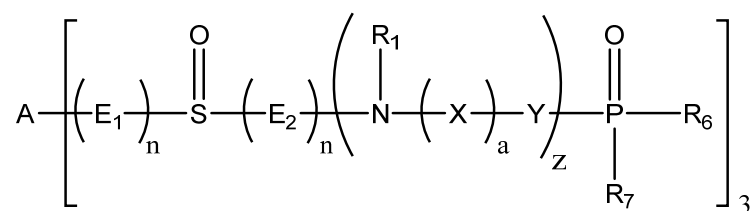
(VIId);



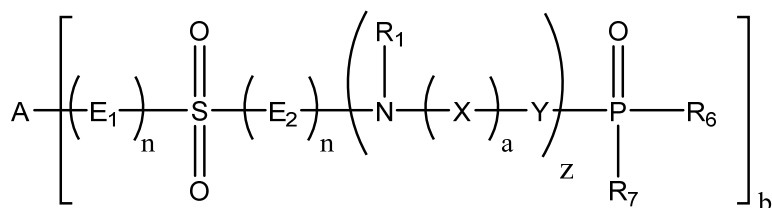
(VIe);



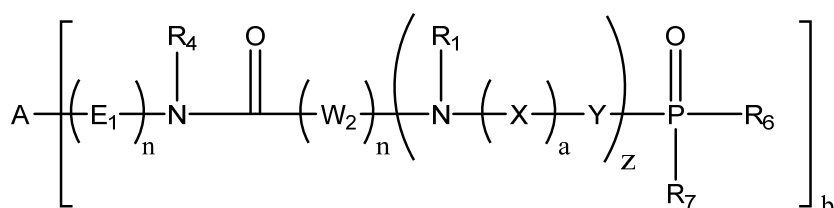
(VII);



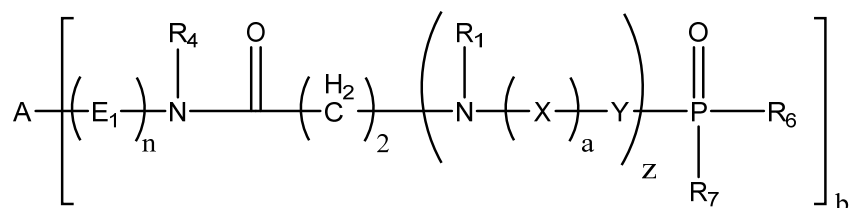
(VIIb);



(VIIc);



(VIId);



(VIIe);

en donde, en cada aparición, cada R_5 , R_6 y R_7 es independientemente H, alquilo C_1 - C_{40} , heteroalquilo C_1 - C_{40} , alquenilo C_2 - C_{40} , heteroalquenileno C_2 - C_{40} , cicloalquenilo C_4 - C_8 , alquinilo C_2 - C_{40} , heteroalquinileno C_2 - C_{40} , cicloalquilo C_3 - C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C_1 - C_6 , alquenilo C_2 - C_8 , cicloalquenilo C_4 - C_8 , alquinilo C_2 - C_6 , cicloalquilo C_3 - C_8 , heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C_1 - C_6 , -OH, -O-alquilo C_1 - C_6 , -NH₂, -NH(alquilo C_1 - C_6), o -N(alquilo C_1 - C_6)₂; y las variables restantes son tal como se definieron

anteriormente.

[00131] En algunas modalidades, z es 1, 2, o 3. En algunas modalidades, z es 1.

[00132] El parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink se refiere al gráfico de Mark-Houwink. Un gráfico de Mark-Houwink es una herramienta poderosa para investigar la estructura de un polímero en solución, ya que revela claramente la relación de estructura-peso molecular con alta sensibilidad. Se genera al graficar el peso molecular (MW) en función de la viscosidad intrínseca (IV) en un gráfico logarítmico. El peso molecular, por supuesto, indica la longitud de las cadenas de polímero (o el grado de polimerización), pero por sí solo no puede proporcionar ninguna indicación de la estructura. La viscosidad intrínseca (expresada en dL/g) es una medida de la densidad molecular de las cadenas de polímero en solución. Cuanto más apretadas se pliegan o se enrollan las cadenas en solución, mayor es la densidad y menor es la viscosidad intrínseca. Esta medida es independiente del peso molecular, por lo que dos estructuras diferentes que tienen el mismo peso molecular pueden tener viscosidades intrínsecas diferentes; por ejemplo, un polímero lineal (no ramificado) y un polímero ramificado del mismo peso molecular tendrán viscosidades intrínsecas diferentes. Además, si el polímero cambia de estructura a lo largo de su distribución de peso molecular (por ejemplo, se vuelve más sustituido), los cambios de viscosidad intrínseca se detectarán fácilmente. Esto es lo que hace que el gráfico de Mark-Houwink sea tan útil y poderoso. Los datos brutos para el gráfico de Mark-Houwink se obtienen de manera conveniente y sencilla a partir de datos de GPC/SEC de detección múltiple de alta calidad al combinar el peso molecular de un detector de dispersión de luz con la viscosidad intrínseca de un detector de viscosímetro. Ambos conjuntos de datos se miden en cada punto del perfil de elución de la muestra. El gráfico resultante puede utilizarse de muchas maneras, desde simplemente evaluar qué tan cerca están dos estructuras hasta realizar mediciones cuantitativas complejas de la ramificación del polímero. En general: $\alpha < 0,5$: Cadenas compactas/esféricas; $0,5 < \alpha < 0,8$: Cadenas flexibles/enrolladas de forma aleatoria; $0,5 < \alpha < 0,8$: Cadenas rígidas/tipo varilla rígida.

[00133] En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. Por ejemplo, los polímeros de la presente descripción tienen parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,49. Por ejemplo, los polímeros de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,01, alrededor de 0,02, alrededor de 0,03, alrededor de 0,04, alrededor de 0,05, alrededor de 0,06, alrededor de 0,07, alrededor de 0,08, alrededor de 0,09, alrededor de 0,10, alrededor de 0,11, alrededor de 0,12, alrededor de 0,13, alrededor de 0,14, alrededor de 0,15, alrededor de 0,16, alrededor de 0,17, alrededor de 0,18, alrededor de 0,19, alrededor de 0,20, alrededor de 0,21, alrededor de 0,22, alrededor de 0,23, alrededor de 0,24, alrededor de 0,25, alrededor de 0,26, alrededor de 0,27, alrededor de 0,28,

alrededor de 0,29, alrededor de 0,30, alrededor de 0,31, alrededor de 0,32, alrededor de 0,33, alrededor de 0,34, alrededor de 0,35, alrededor de 0,36, alrededor de 0,37, alrededor de 0,38, alrededor de 0,39, alrededor de 0,40, alrededor de 0,41, alrededor de 0,42, alrededor de 0,43, alrededor de 0,44, alrededor de 0,45, alrededor de 0,46, alrededor de 0,47, alrededor de 0,48, alrededor de a alrededor de 0,49, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink de alrededor de 0,2 a alrededor de 0,5.

[00134] En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink de alrededor de 0,01, alrededor de 0,02, alrededor de 0,03, alrededor de 0,04, alrededor de 0,05, alrededor de 0,06, alrededor de 0,07, alrededor de 0,08, alrededor de 0,09, alrededor de 0,10, alrededor de 0,11, alrededor de 0,12, alrededor de 0,13, alrededor de 0,14, alrededor de 0,15, alrededor de 0,16, alrededor de 0,17, alrededor de 0,18, alrededor de 0,19, alrededor de 0,20, alrededor de 0,21, alrededor de 0,22, alrededor de 0,23, alrededor de 0,24, alrededor de 0,25, alrededor de 0,26, alrededor de 0,27, alrededor de 0,28, alrededor de 0,29, alrededor de 0,30, alrededor de 0,31, alrededor de 0,32, alrededor de 0,33, alrededor de 0,34, alrededor de 0,35, alrededor de 0,36, alrededor de 0,37, alrededor de 0,38, alrededor de 0,39, alrededor de 0,40, alrededor de 0,41, alrededor de 0,42, alrededor de 0,43, alrededor de 0,44, alrededor de 0,45, alrededor de 0,46, alrededor de 0,47, alrededor de 0,48, o alrededor de 0,49.

[00135] El término «índice de polidispersión» (PDI) hace referencia a una medición de la distribución de la masa molecular en una muestra de polímero dada. El índice de polidispersión se calcula al dividir el peso molecular promedio en peso (M_w) entre el peso molecular promedio en número (M_n). Tal como se usa en la presente, el término «peso molecular promedio en peso», generalmente, hace referencia a una medición de peso molecular que depende de las contribuciones de las moléculas de polímero de acuerdo con sus tamaños. Tal como se usa en la presente, el término «peso molecular promedio en número», generalmente, hace referencia a una medición de peso molecular que se calcula al dividir el peso total de todas las moléculas de polímero en una muestra entre la cantidad total de moléculas de polímero en la muestra. Estos términos son conocidos para los expertos en la técnica.

[00136] En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 1,01 a alrededor de 8,0. Por ejemplo, el PDI puede variar de alrededor de 1,01, alrededor de 1,02, alrededor de 1,03, alrededor de 1,04, alrededor de 1,05, alrededor de 1,06, alrededor de 1,07, alrededor de 1,08, alrededor de 1,09, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor

de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,1, alrededor de 4,2, alrededor de 4,3, alrededor de 4,4, alrededor de 4,5, alrededor de 4,6, alrededor de 4,7, alrededor de 4,8, alrededor de 4,9, alrededor de 5,0, alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, alrededor de 5,5, alrededor de 5,6, alrededor de 5,7, alrededor de 5,8, alrededor de 5,9, alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, a alrededor de 8,0, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

10 **[00137]** En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 1,01, alrededor de 1,02, alrededor de 1,03, alrededor de 1,04, alrededor de 1,05, alrededor de 1,06, alrededor de 1,07, alrededor de 1,08, alrededor de 1,09, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,1, alrededor de 4,2, alrededor de 4,3, alrededor de 4,4, alrededor de 4,5, alrededor de 4,6, alrededor de 4,7, alrededor de 4,8, alrededor de 4,9, alrededor de 5,0, alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, alrededor de 5,5, alrededor de 5,6, alrededor de 5,7, alrededor de 5,8, alrededor de 5,9, alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, o alrededor de 8,0. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 2,5.

[00138] En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un M_w de al menos 3 kDa. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. Por consiguiente, los polímeros de la presente descripción tienen un M_w en el intervalo de alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37,

alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 kDa, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 5 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa.

[00139] En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un M_w de alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15,

alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101 alrededor de, 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 5 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de

10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_W de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_W de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_W de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_W de alrededor de 40 kDa.

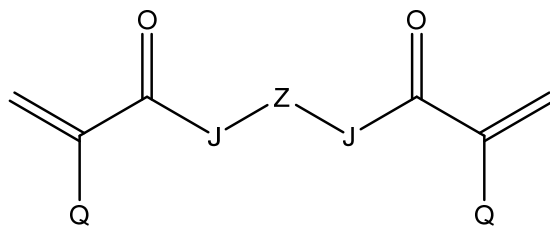
- 5 **[00140]** En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 3 kDa. En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 40 kDa.

10

Métodos de elaboración

[00141] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para elaborar polímeros, que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)



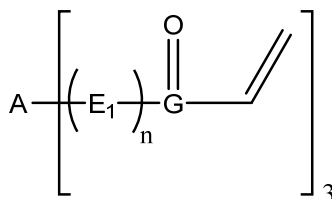
15

(A)

con una primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$;

(b) hacer reaccionar el producto de la Etapa (a) con una segunda amina que tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$; y

- 20 (c) hacer reaccionar el producto de la Etapa (b) con un compuesto de la fórmula (B):



(B);

en donde

cada J es independientemente $-O-$ o $-NH-$;

- 25 Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono

lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, éter C₁-C₆, tioéter C₁-C₆, sulfona C₁-C₆, sulfóxido C₁-C₆, amida primaria C₁-C₆, amida secundaria C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ o arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

G es —C—, —S—, —S(O)—, —P(OR₁)—, o —P(OH)—;

10 cada Q es H o un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado;

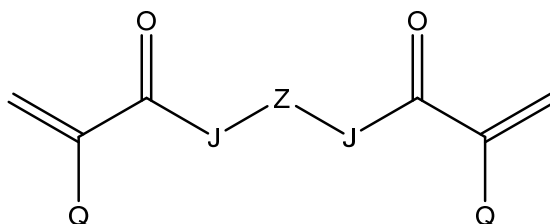
cada E₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, —N—, —O—, —S—, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

15 cada uno de R₁ y R₂ es independientemente alquilo C₁-C₄₀, heteroalquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, —OH, —O—alquilo C₁-C₆, —NH₂, —NH(alquilo C₁-C₆), o —N(alquilo C₁-C₆)₂; y R₁ no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y

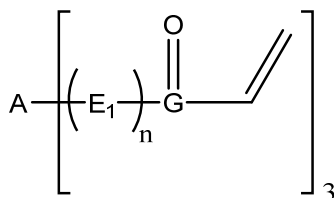
25 cada n es al menos 1.

[00142] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para elaborar polímeros, que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (A)



y un compuesto de la fórmula (B):



(B);

5

con una primera amina que tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$;

(b) hacer reaccionar el producto de la Etapa (a) con una segunda amina que tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$;

en donde

10 cada J es independientemente $-O-$ o $-NH-$;

Z, Z', y Z'' son restos de enlace;

A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

15 en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , éter C_1-C_6 , tioéter C_1-C_6 , sulfona C_1-C_6 , sulfóxido C_1-C_6 , amida primaria C_1-C_6 , amida secundaria C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , grupo carboxilo, grupo ciano, grupo nitro, grupo nitroso, $-OC(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)NR'R'$, $-N(R')C(O)O-$ alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 o arilo C_6-C_{10} ; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ;

G es $-C-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-P(OR_1)-$, o $-P(OH)-$;

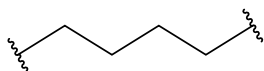
cada Q es H o un grupo alquilo C_1-C_{10} lineal o ramificado;

cada E_1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$, alquileno, heteroalquileno, alquenilo, heteroalquenileno, alquinilo, heteroalquinileno;

25 cada uno de R_1 y R_2 es independientemente alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} , heteroalquenileno C_2-C_{40} , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , heteroalquinileno C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, y heteroarilo están
30 opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , $-OH$, $-O$ -alquilo C_1-C_6 , $-NH_2$, $-NH$ (alquilo C_1-

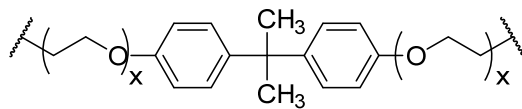
C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂; y R₁ no está sustituido o está sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y cada n es al menos 1.

[00143] En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un alquileo-carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos, o un alquileo-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. Z puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z puede ser un grupo alquileo que incluye, de modo no taxativo, alquileo C₁-C₂₄, alquileo C₁-C₂₀, alquileo C₁-C₁₆, alquileo C₁-C₁₂, alquileo C₁-C₈, alquileo C₁-C₆, alquileo C₁-C₄, alquileo C₁-C₃, alquileo C₁-C₂, alquileo C₁. Los grupos alquileo representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono. Por ejemplo, en algunas modalidades, Z es



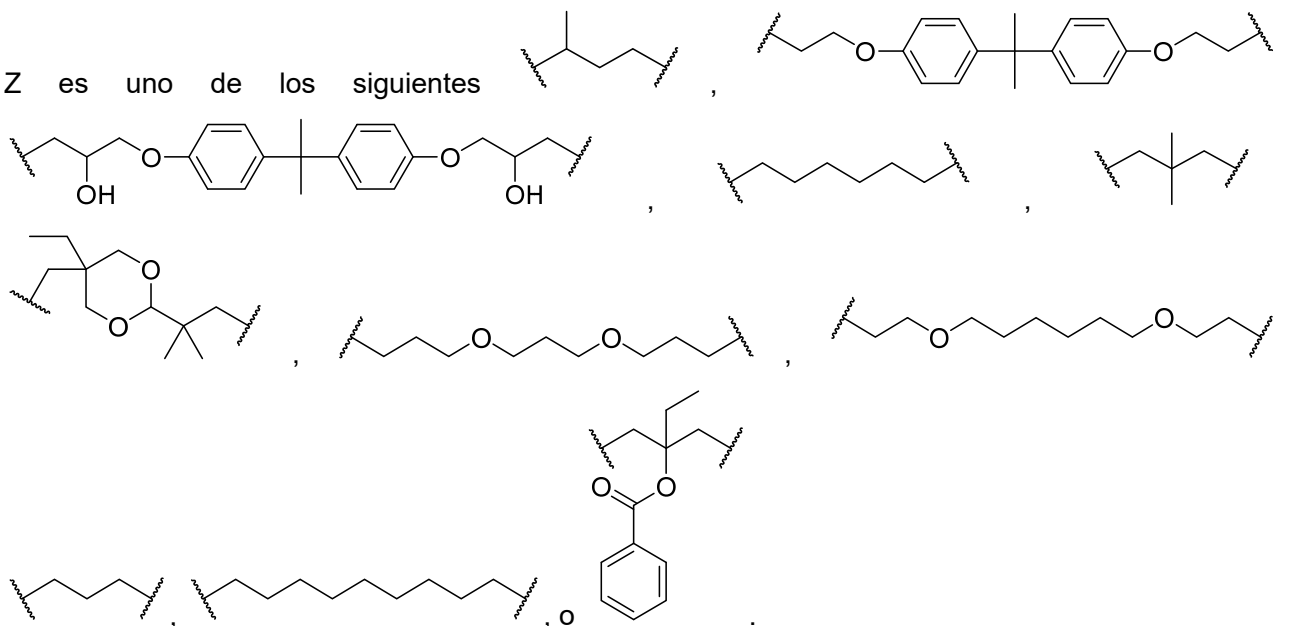
. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono ramificada de 1 a 30 átomos de carbono. En algunas modalidades, Z es una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos. Por ejemplo, Z puede ser una cadena de carbono lineal o ramificada con uno o más de los átomos de carbono sustituidos con un heteroátomo, que incluye, de modo no taxativo, O, N, S o P. En algunas modalidades, Z es un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono. En algunas modalidades, Z es un alquileo-carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos

de carbono. Por ejemplo, en algunas modalidades, Z es



donde x es 1-1000. En algunas modalidades, Z es un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. En algunas modalidades, Z es un alquileo-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. En algunas modalidades, Z no está sustituido. En algunas modalidades, Z está sustituido. En algunas modalidades,

5 Z es uno de los siguientes



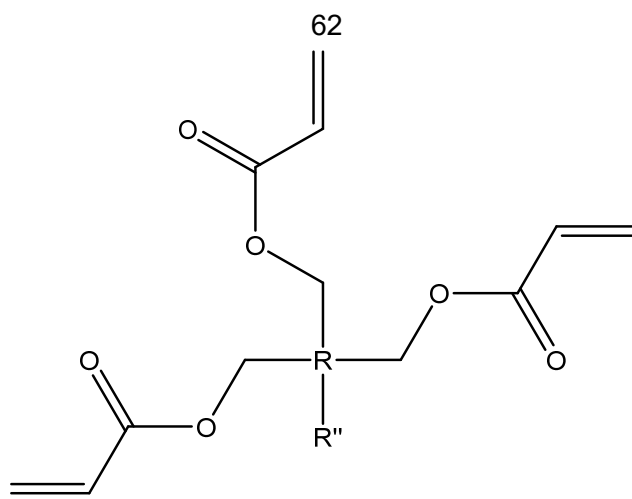
[00144] En algunas modalidades, Z' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un alquileo-carbociclo contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos, o un alquileo-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. Z' puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z' es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z' puede ser un grupo alquileo que incluye, de modo no taxativo, alquileo C₁-C₂₄, alquileo C₁-C₂₀, alquileo C₁-C₁₆, alquileo C₁-C₁₂, alquileo C₁-C₈, alquileo C₁-C₆, alquileo C₁-C₄, alquileo C₁-C₃, alquileo C₁-C₂, alquileo C₁. Los grupos alquileo representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno,

propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos.

[00145] En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un alquileo-carbociclo contiene de 3 a 30 átomos de carbono, un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos, o un alquileo-heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos. Z'' puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal de 1 a 30 átomos de carbono. Por ejemplo, Z'' puede ser un grupo alquileo que incluye, de modo no taxativo, alquileo C₁-C₂₄, alquileo C₁-C₂₀, alquileo C₁-C₁₆, alquileo C₁-C₁₂, alquileo C₁-C₈, alquileo C₁-C₆, alquileo C₁-C₄, alquileo C₁-C₃, alquileo C₁-C₂, alquileo C₁. Los grupos alquileo representativos incluyen, de modo no taxativo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. En algunas modalidades, Z'' es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono o una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 30 átomos.

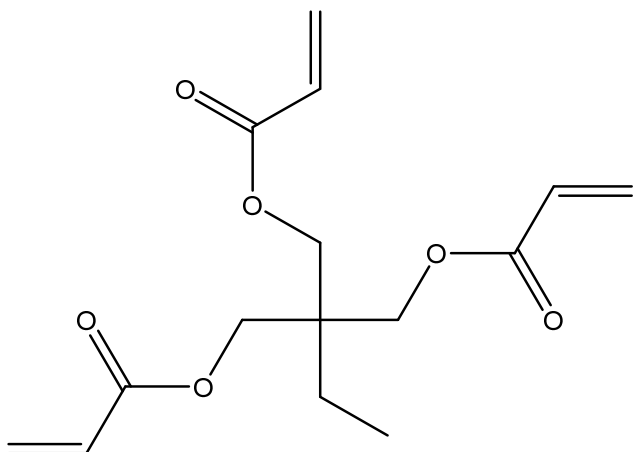
[00146] De acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, G puede ser —C—, —S—, —S(O)—, —P(OR₁)—, o —P(OH)—, formando de ese modo un grupo carbonilo, sulfóxido, sulfona, y fosfona, respectivamente. Por lo tanto, en algunas modalidades, G es —C—. En algunas modalidades, G es —S—. En algunas modalidades, G es —S(O)—.

[00147] En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (B) es



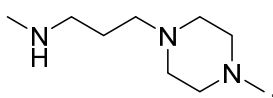
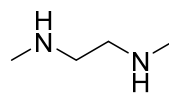
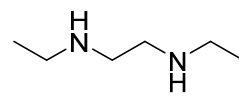
en donde

- R es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos, y R no está sustituido o está sustituido con al menos un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀; en donde cada R' se selecciona independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆; y R'' es una cadena de carbono lineal o ramificada sustituida o no sustituida de 1 a 10 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada que contiene heteroátomos de 1 a 10 átomos, un carbociclo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono, o un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos.
- En algunas modalidades, R es 1 átomo de carbono. En algunas modalidades, R'' es una cadena de carbono lineal o ramificada tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo. Por ejemplo, en algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (B) es



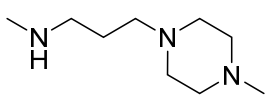
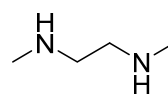
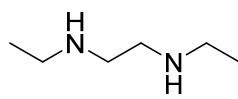
. En algunas modalidades, R es un carbocilo que contiene de 3 a 10 átomos de carbono. Por ejemplo, R puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, fenilo o naftilo. En algunas modalidades, R es un heterociclo que contiene de 3 a 10 átomos.

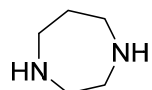
- 5 **[00148]** En determinadas modalidades, la primera amina tiene la fórmula R_1-NH_2 o $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$. En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula R_1-NH_2 . En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$. En algunas modalidades, la primera amina que tiene la

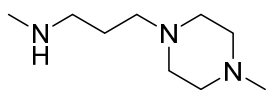
fórmula $R_1-N(H)-Z'-N(H)-R_1$ es , , o . En algunas modalidades, la primera

- 10 amina que tiene la fórmula $R_1-N(H)-Z'-N-(R_1)_2$ es

[00149] En determinadas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula R_2-NH_2 o $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$. En algunas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula R_2-NH_2 . En algunas modalidades, la segunda amina tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$. En algunas modalidades, la segunda amina que

tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N(H)-R_2$ es , , , o

- 15 . En algunas modalidades, la primera amina tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N-(R_2)_2$. En algunas

modalidades, la primera amina que tiene la fórmula $R_2-N(H)-Z''-N-(R_2)_2$ es .

[00150] En determinadas modalidades, R_1 es alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alqueno C_2-C_{40} , heteroalqueno C_2-C_{40} , cicloalqueno C_4-C_8 , alquino C_2-C_{40} , heteroalquino C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos

consiste en



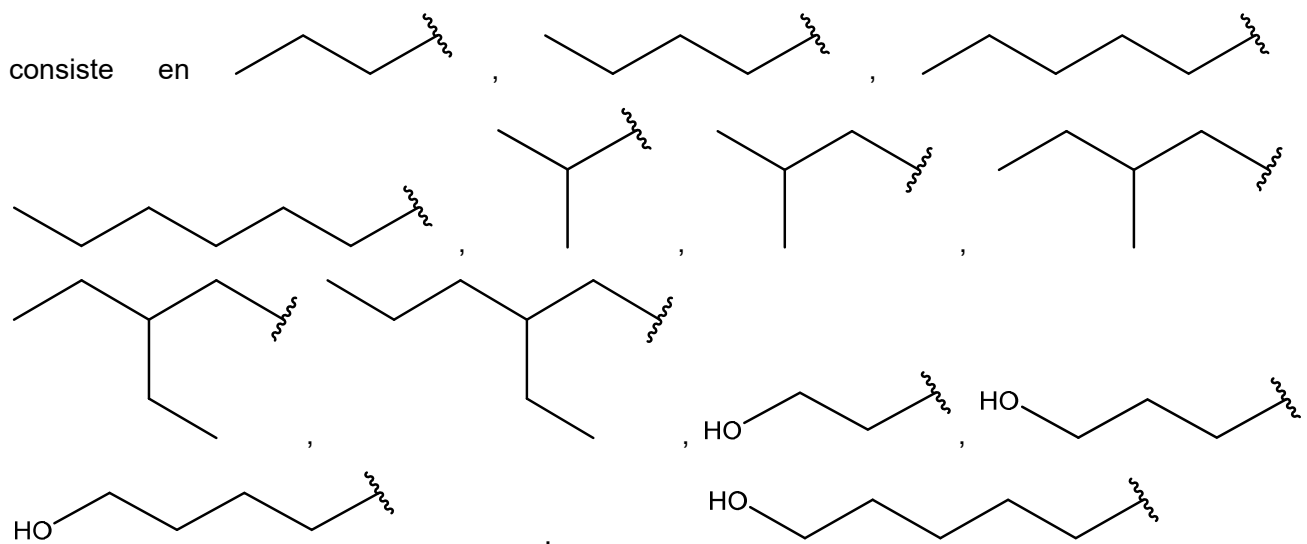
heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están

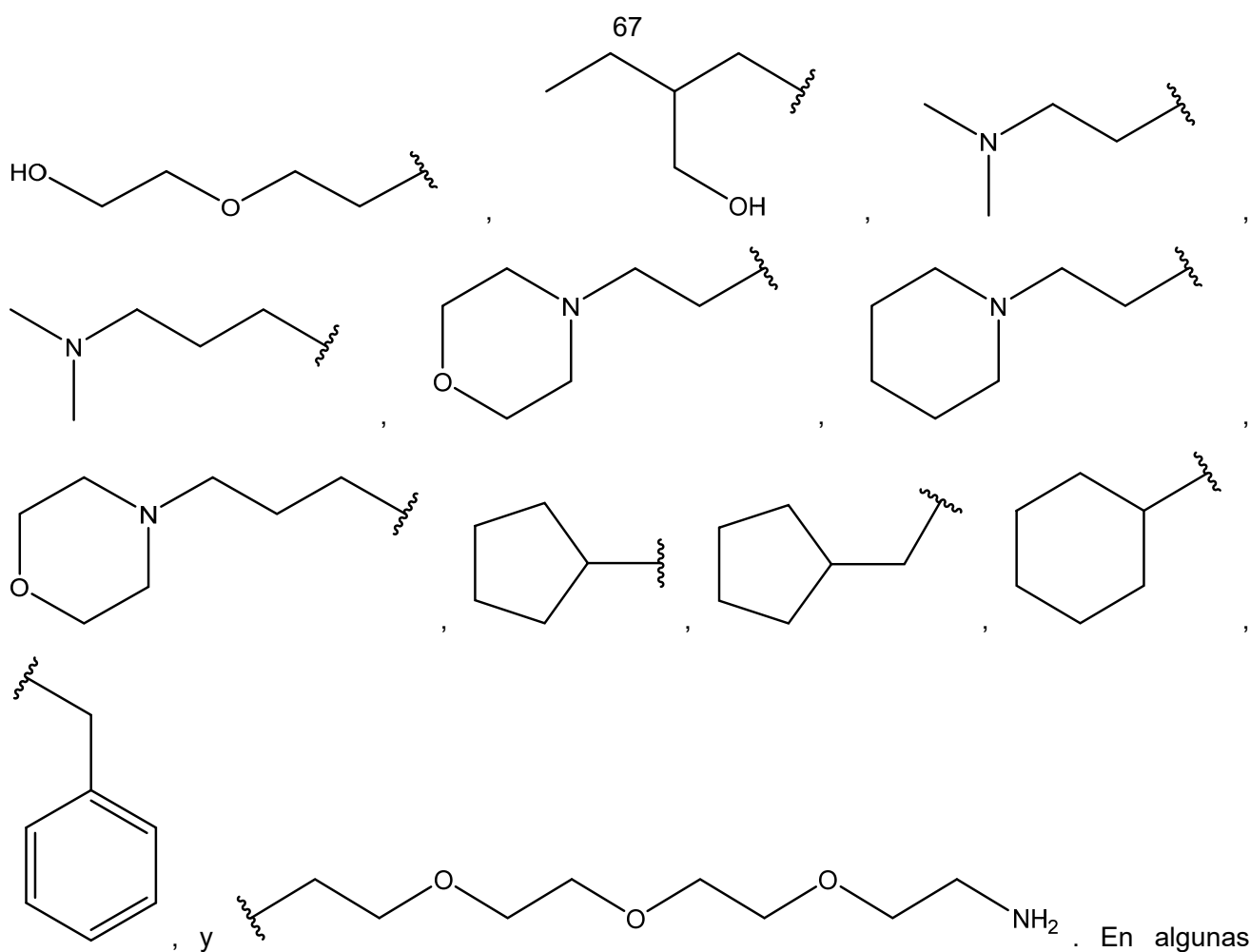
5 opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂. R₂ puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C₁-C₆, un alcoxi C₁-C₆, un éter C₁-C₆, un tioéter C₁-C₆, una sulfona C₁-C₆, un sulfóxido C₁-C₆, una amida primaria C₁-C₆, una amida secundaria C₁-C₆, un haloalquilo C₁-C₆, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro,

10 un grupo nitroso, —OC(O)NR'R', —N(R')C(O)NR'R', —N(R')C(O)O—alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterociclilo C₃-C₆, heteroarilo C₂-C₅ y arilo C₆-C₁₀); en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆. En algunas modalidades, R₂ es —alquilo C₁-C₂₀. Por ejemplo, R₂ puede ser grupos alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, o C₂₀ tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-

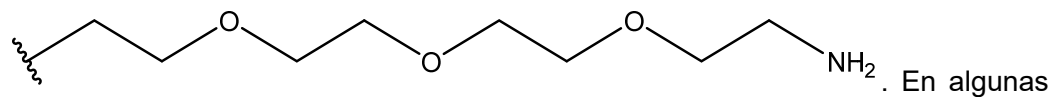
15 metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, n-undecilo, n-dodecilo, n-tridecilo, n-tetradecilo, n-pentadecilo, n-hexadecilo, n-heptadecilo, n-octadecilo, n-nonadecilo, o n-icosilo. En algunas modalidades, R₂ no está sustituido. En

20 algunas modalidades, R₂ está sustituido. En algunas modalidades, R₂ se selecciona del grupo que

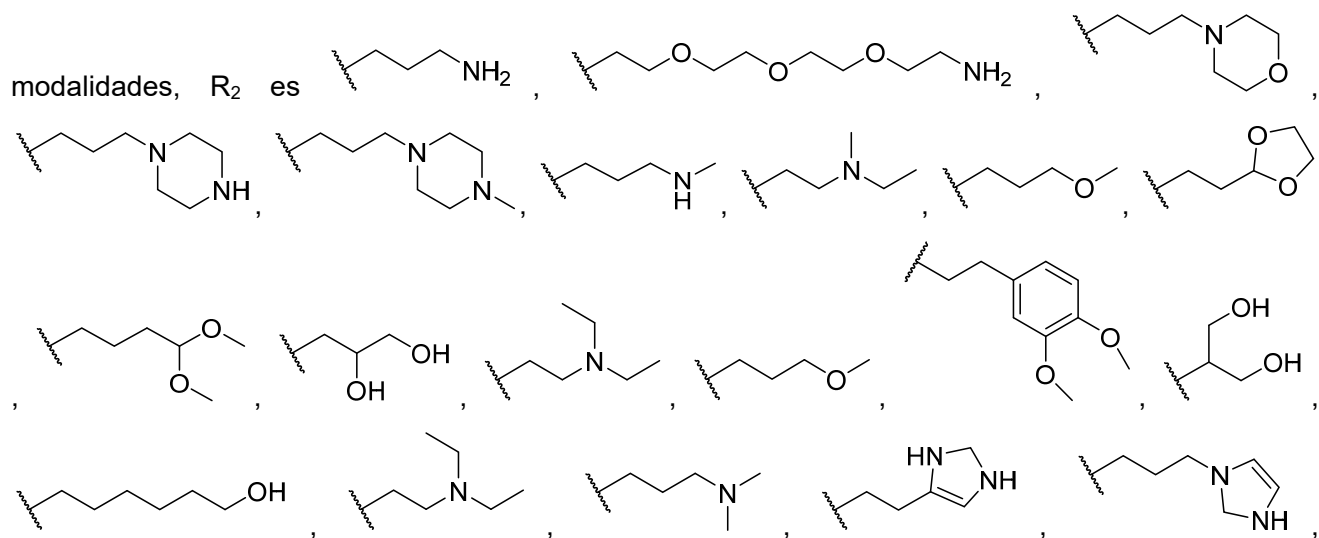


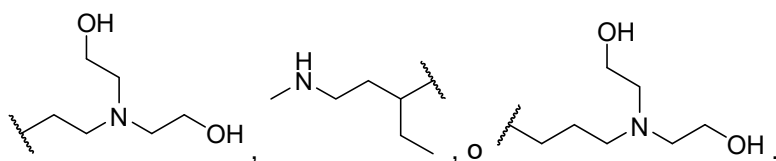


5 modalidades, R_2 es



modalidades, R_2 es



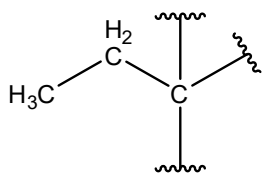


[00152] En algunas modalidades, cada Q es H o un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado. Por lo tanto, en algunas modalidades, cada Q es H. En otras modalidades, cada Q es un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado. Por ejemplo, cada Q puede ser metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, o n-decilo. En algunas modalidades, cada Q es metilo.

[00153] En algunas modalidades, cada J es -O-. En algunas modalidades, cada J es -NH-.

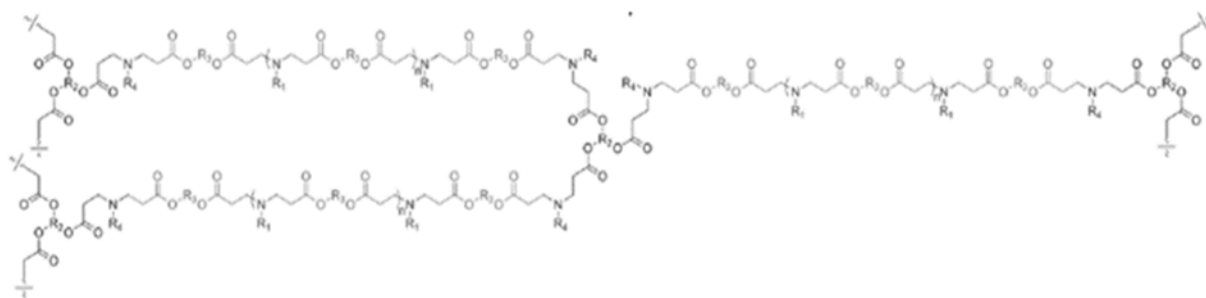
[00154] En algunas modalidades, cada E₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en enlace covalente, -N-, -O-, -S-, alquileo, heteroalquileo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino. En algunas modalidades, cada E₁ es heteroalquileo. En algunas modalidades, cada E₁ es -CH₂-O-. En algunas modalidades, cada n es al menos 1. Por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n es 1.

[00155] En algunas modalidades, A es una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 2 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos.



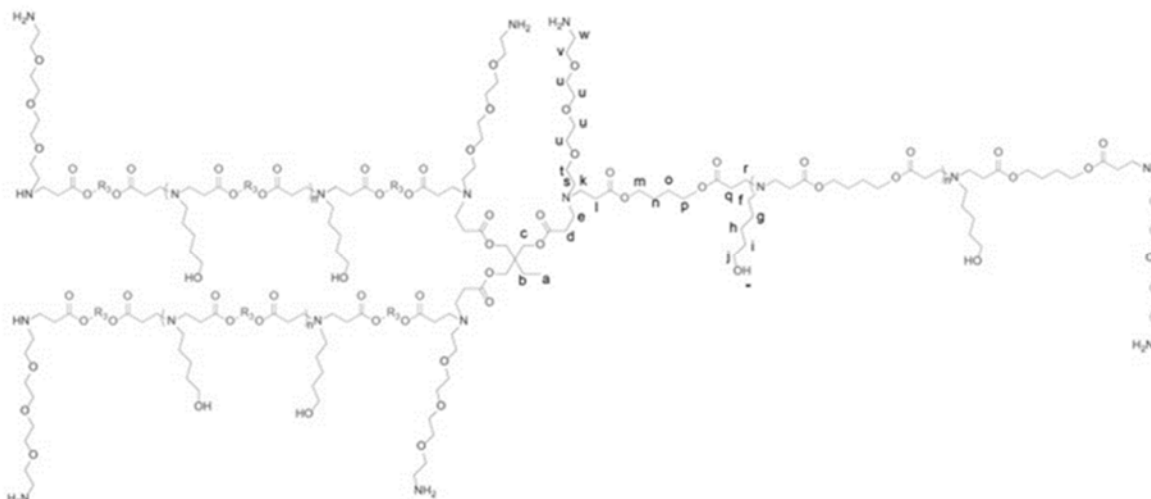
Por ejemplo, en algunas modalidades, A es

[00156] En algunas modalidades, el polímero de la presente descripción tiene la estructura general de



donde el enlace ondulado representa un enlace al resto del polímero. Debido al crecimiento y la ramificación secuencial de oligómeros lineales altamente controlados, los polímeros resultantes tienen una distribución más uniforme de los segmentos lineales y las unidades de ramificación, tal como se

ilustra en la estructura anterior. Tal como se describe en las secciones y los ejemplos posteriores, los polímeros poseen una fuerte afinidad de unión al ADN y pueden condensar el ADN para formular poliplejos de tamaño nanométrico con una eficiencia de absorción celular de casi 100 %. En algunas modalidades, el polímero de la presente descripción es



[00157] En algunas modalidades, se hace reaccionar un exceso molar del compuesto de la fórmula (A) con la primera amina. Por ejemplo, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 10:1, lo que incluye alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00158] En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina es de alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 2:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica del compuesto de la fórmula (A) con respecto a la primera amina es de alrededor de 1,2:1. En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (A) se hace reaccionar con la primera amina en equivalencia molar (es decir, alrededor de 1:1).

[00159] En algunas modalidades, la etapa (a) se realiza en un solvente orgánico. Puede usarse una amplia variedad de solventes orgánicos en el contexto de la presente descripción, que incluye, de modo

no taxativo, dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP) y similares; cetonas tales como acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona y similares; éteres tales como tetrahidrofurano (THF), dietiléter, butiléter terciario de metilo; hidrocarburos tales como tolueno, xileno, ciclohexano, y similares. En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza en DMSO.

- 5 **[00160]** En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 40 °C a alrededor de 120 °C, lo que incluye alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, o 120 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

- 20 **[00161]** En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, o 120 °C.

En algunas modalidades, la Etapa (a) se realiza a alrededor de 90 °C.

[00162] En algunas modalidades, el producto de la Etapa (a) no se purifica antes de la Etapa (b). En otras modalidades, el producto de la Etapa (a) se purifica antes de la Etapa (b). El producto de la etapa (a) puede purificarse mediante una variedad de métodos y técnicas evidentes para un experto en la técnica.

[00163] En algunas modalidades, se agrega un exceso molar de la segunda amina al producto de la Etapa (a). Por ejemplo, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la Etapa (a) puede variar de alrededor de 1,1:1 a alrededor de 10:1, lo que incluye alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00164] En algunas modalidades, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la Etapa (a) es de alrededor de 1,1:1, alrededor de 1,2:1, alrededor de 1,3:1, alrededor de 1,4:1, alrededor de 1,5:1, alrededor de 1,6:1, alrededor de 1,7:1, alrededor de 1,8:1, alrededor de 1,9:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1. En algunas modalidades, la relación estequiométrica de la segunda amina con respecto al producto de la etapa (a) es de alrededor de 5:1. En algunas modalidades, la segunda amina se hace reaccionar con el producto de la Etapa (a) en equivalencia molar (es decir, alrededor de 1:1).

[00165] En algunas modalidades, la Etapa (b) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 16 °C a alrededor de 40 °C. Por ejemplo, la Etapa (b) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, a alrededor de 40 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00166] En algunas modalidades, la Etapa (b) se realiza a una temperatura de alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, o alrededor de 40 °C.

[00167] En algunas modalidades, el producto de la Etapa (b) no se purifica antes de la Etapa (c). En

otras modalidades, el producto de la Etapa (b) se purifica antes de la Etapa (c). El producto de la etapa (b) puede purificarse mediante una variedad de métodos y técnicas evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, el producto de la Etapa (b) puede purificarse mediante diálisis.

[00168] En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a una temperatura superior a la de la Etapa

5 (b). Por ejemplo, la Etapa (c) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 21 °C a alrededor de 200 °C. Por ejemplo, la Etapa (c) se realiza a una temperatura en el intervalo de alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101 alrededor de, 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181,

alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 °C, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

- 5 **[00169]** En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101 alrededor de, 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de

189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, o alrededor de 200 °C. En algunas modalidades, la Etapa (c) se realiza a alrededor de 90 °C.

5 **[00170]** En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. Por ejemplo, los polímeros de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,01, alrededor de 0,02, alrededor de 0,03, alrededor de 0,04, alrededor de 0,05, alrededor de 0,06, alrededor de 0,07, alrededor de 0,08, alrededor de 0,09, alrededor de 0,10, alrededor de 0,11, alrededor de 0,12, alrededor de 0,13, 10 alrededor de 0,14, alrededor de 0,15, alrededor de 0,16, alrededor de 0,17, alrededor de 0,18, alrededor de 0,19, alrededor de 0,20, alrededor de 0,21, alrededor de 0,22, alrededor de 0,23, alrededor de 0,24, alrededor de 0,25, alrededor de 0,26, alrededor de 0,27, alrededor de 0,28, alrededor de 0,29, alrededor de 0,30, alrededor de 0,31, alrededor de 0,32, alrededor de 0,33, alrededor de 0,34, alrededor de 0,35, alrededor de 0,36, alrededor de 0,37, alrededor de 0,38, alrededor de 0,39, alrededor de 0,40, alrededor de 15 de 0,41, alrededor de 0,42, alrededor de 0,43, alrededor de 0,44, alrededor de 0,45, alrededor de 0,46, alrededor de 0,47, alrededor de 0,48, alrededor de a alrededor de 0,49, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink de alrededor de 0,2 a alrededor de 0,5.

20 **[00171]** En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink de alrededor de 0,01, alrededor de 0,02, alrededor de 0,03, alrededor de 0,04, alrededor de 0,05, alrededor de 0,06, alrededor de 0,07, alrededor de 0,08, alrededor de 0,09, alrededor de 0,10, alrededor de 0,11, alrededor de 0,12, alrededor de 0,13, alrededor de 0,14, alrededor de 0,15, alrededor de 0,16, alrededor de 0,17, 25 alrededor de 0,18, alrededor de 0,19, alrededor de 0,20, alrededor de 0,21, alrededor de 0,22, alrededor de 0,23, alrededor de 0,24, alrededor de 0,25, alrededor de 0,26, alrededor de 0,27, alrededor de 0,28, alrededor de 0,29, alrededor de 0,30, alrededor de 0,31, alrededor de 0,32, alrededor de 0,33, alrededor de 0,34, alrededor de 0,35, alrededor de 0,36, alrededor de 0,37, alrededor de 0,38, alrededor de 0,39, alrededor de 0,40, alrededor de 0,41, alrededor de 0,42, alrededor de 0,43, alrededor de 0,44, alrededor de 30 de 0,45, alrededor de 0,46, alrededor de 0,47, alrededor de 0,48, o alrededor de 0,49.

[00172] En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 1,01 a alrededor de 8,0. Por ejemplo, el PDI puede variar de alrededor de 1,01, alrededor de 1,02, alrededor de 1,03, alrededor de 1,04, alrededor de 1,05, alrededor de 1,06, alrededor de 1,07, alrededor de 1,08, alrededor de 1,09, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2,

alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,1, alrededor de 4,2, alrededor de 4,3, alrededor de 4,4, alrededor de 4,5, alrededor de 4,6, alrededor de 4,7, alrededor de 4,8, alrededor de 4,9, alrededor de 5,0, alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, alrededor de 5,5, alrededor de 5,6, alrededor de 5,7, alrededor de 5,8, alrededor de 5,9, alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, a alrededor de 8,0, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

[00173] En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 1,01, alrededor de 1,02, alrededor de 1,03, alrededor de 1,04, alrededor de 1,05, alrededor de 1,06, alrededor de 1,07, alrededor de 1,08, alrededor de 1,09, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,1, alrededor de 4,2, alrededor de 4,3, alrededor de 4,4, alrededor de 4,5, alrededor de 4,6, alrededor de 4,7, alrededor de 4,8, alrededor de 4,9, alrededor de 5,0, alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, alrededor de 5,5, alrededor de 5,6, alrededor de 5,7, alrededor de 5,8, alrededor de 5,9, alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, o alrededor de 8,0. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 2,5. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 3,5. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 6,5. En algunas modalidades, los polímeros de la presente descripción tienen un PDI de alrededor de 8,5.

[00174] En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un M_w de al menos 3 kDa. En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de

200 kDa. Por consiguiente, los polímeros de la presente descripción tienen un M_w en el intervalo de alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de

193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 5 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa.

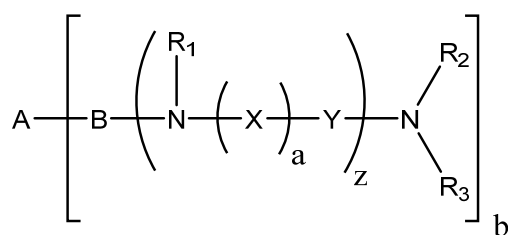
- 5 **[00175]** En algunas modalidades, los polímeros elaborados mediante los métodos de la presente descripción tienen un M_w de alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101 alrededor de, 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de 146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de

169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades, el polímero elaborado mediante el método de la presente descripción tiene un M_W de entre alrededor de 5 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades, el polímero elaborado mediante el método de la presente descripción tiene un M_W de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades, el polímero elaborado mediante el método de la presente descripción tiene un M_W de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades, el polímero elaborado mediante el método de la presente descripción tiene un M_W de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades, el polímero elaborado mediante el método de la presente descripción tiene un M_W de alrededor de 40 kDa.

[00176] En algunas modalidades, el producto después de la Etapa (b) tiene un M_W de alrededor de 3 kDa.

Poliplejos

[00177] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un poliplejo que comprende un componente de ácido nucleico, tal como se describe en la presente, y cualquiera de los polímeros ramificados descritos en la presente, por ejemplo, un polímero preparado mediante cualquiera de los procesos descritos en la presente o un polímero de la fórmula (I):



(I)

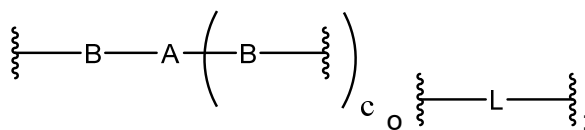
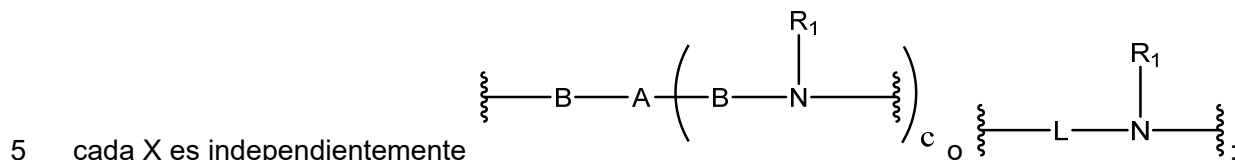
en donde

cada A es independientemente una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos de carbono, una cadena de carbono lineal o ramificada de 1 a 30 átomos que contiene heteroátomos, un carbociclo que contiene de 3 a 30 átomos de carbono o un heterociclo que contiene de 3 a 30 átomos;

en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, hidroxilo, grupo amino, grupo sulfonilo, grupo sulfonamida, tiol, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, éter C₁-C₆, tioéter C₁-C₆, sulfona C₁-C₆, sulfóxido C₁-C₆, amida primaria C₁-C₆, amida secundaria C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, grupo carboxilo, grupo

ciano, grupo nitro, grupo nitroso, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$ alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterociclilo C_3-C_6 , heteroarilo C_2-C_5 o arilo C_6-C_{10} ; en donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_6 ;

cada B es independientemente un primer resto de enlace;



cada Y es independientemente

cada L es independientemente un segundo resto de enlace;

en cada aparición, cada R_1 , R_2 y R_3 es independientemente H, alquilo C_1-C_{40} , heteroalquilo C_1-C_{40} , alquenilo C_2-C_{40} , heteroalquenileno C_2-C_{40} , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_{40} , heteroalquinileno C_2-C_{40} , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_8 , cicloalquenilo C_4-C_8 , alquinilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , $-\text{OH}$, $-\text{O}-$ alquilo C_1-C_6 , $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{alquilo } \text{C}_1-\text{C}_6)$, o $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_1-\text{C}_6)_2$; o

15 en donde R_2 y R_3 , junto con el átomo al que están unidos, pueden formar heterociclilo o heteroarilo que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O;

a es 1-1000;

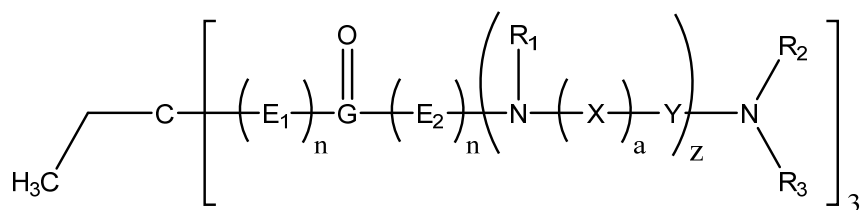
b es 1-4;

c es 1-3; y

20 z es 1-100;

con la condición de que al menos uno de R_2 y R_3 no sea H.

[00178] En determinadas modalidades, el poliplego comprende un componente de ácido nucleico y un polímero de la fórmula (II):



(II)

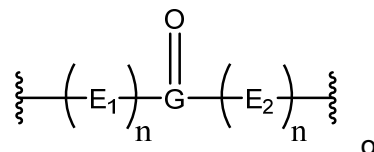
en donde,

cada E_1 se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$, alquileo, heteroalquileo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino;

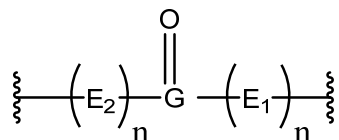
- 5 cada E_2 se selecciona del grupo que consiste en enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$, alquileo, heteroalquileo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino;

G es $-C-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-P(OR_1)-$, o $-P(OH)-$; y

n es al menos 1.

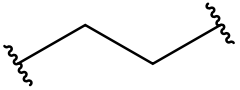
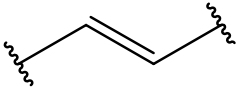
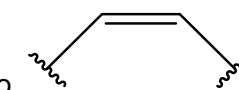


[00179] En algunas modalidades, cada B es independientemente

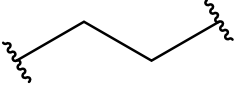


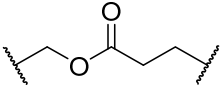
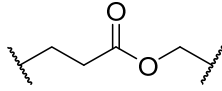
10

. En algunas modalidades, cada E_1 y E_2 se seleccionan del grupo que consiste en un enlace covalente, $-N-$, $-O-$, $-S-$, alquileo, heteroalquileo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino. En algunas modalidades, cada E_1 es heteroalquileo. En algunas modalidades, cada E_1 es $-\text{CH}_2\text{O}-$. En algunas modalidades, cada E_2 es alquileo. En algunas

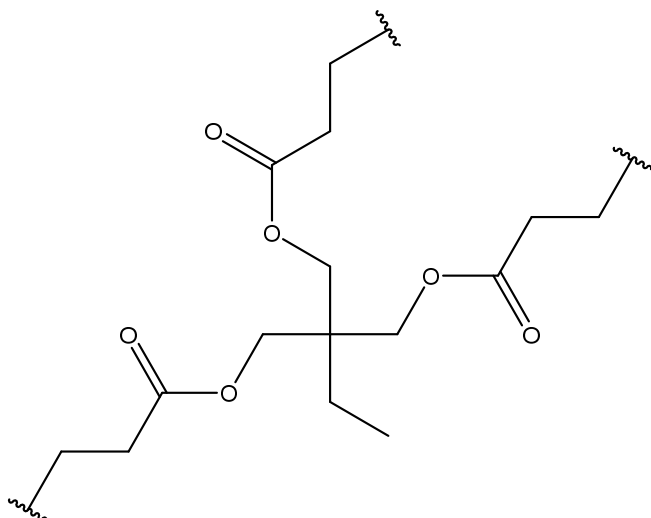
modalidades, cada E_2 es , , o . En algunas

15

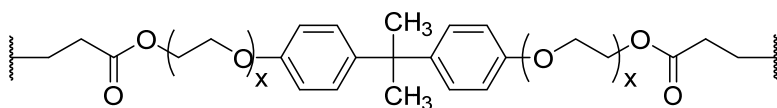
modalidades, cada E_2 es . En algunas modalidades, cada n es al menos 1. Por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n es 1. En algunas

modalidades, G es $-C-$. En algunas modalidades, cada B es  o .

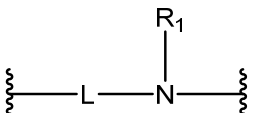
[00180] En algunas modalidades, B y A se combinan para formar

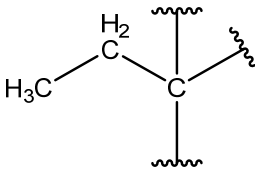


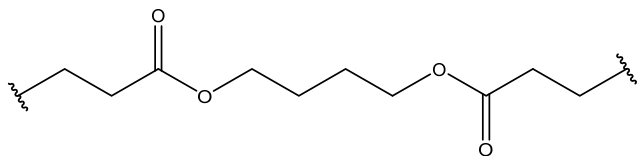
[00181] En algunas modalidades, cada L es

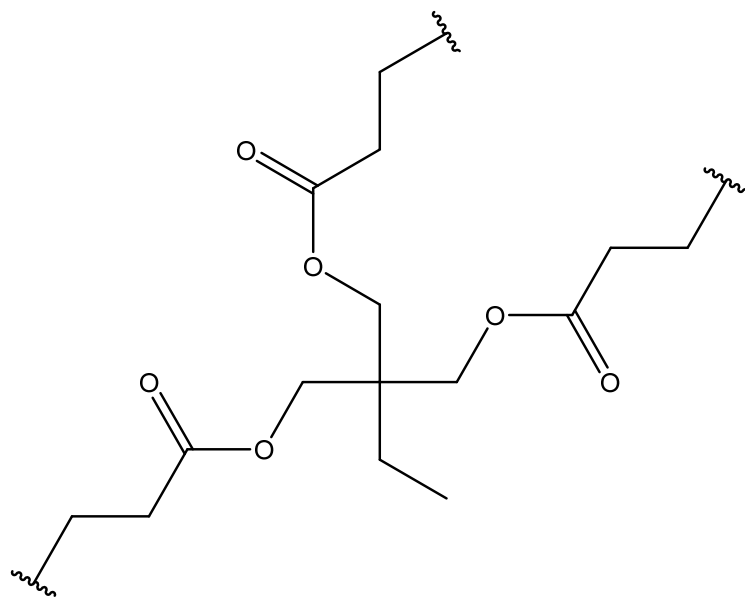


en donde x es 1-1000. En algunas

modalidades, a es al menos 2, b es 3, y cada X es . En algunas modalidades, cada

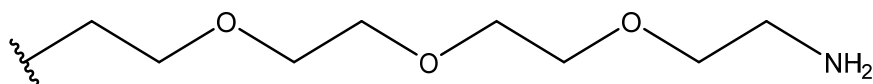
5 A es . En algunas modalidades, cada L es



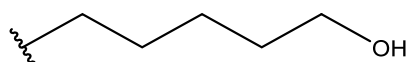


[00182] En algunas modalidades, Y es

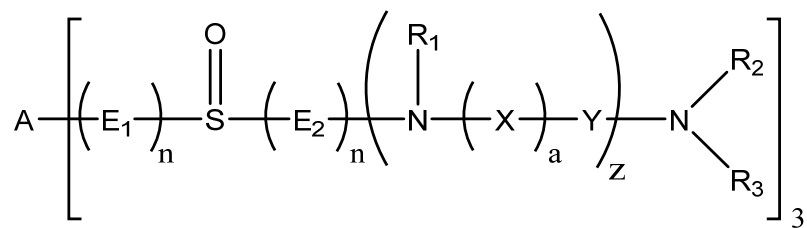
[00183] En algunas modalidades, cada R_2 y/o R_3 es



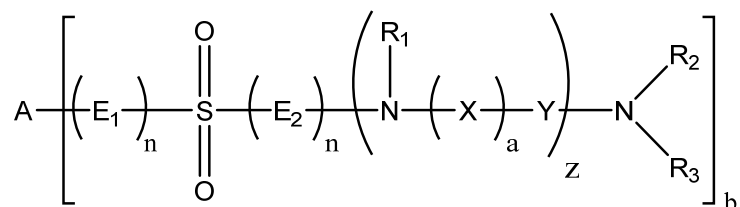
[00184] En algunas modalidades, cada R_1 es



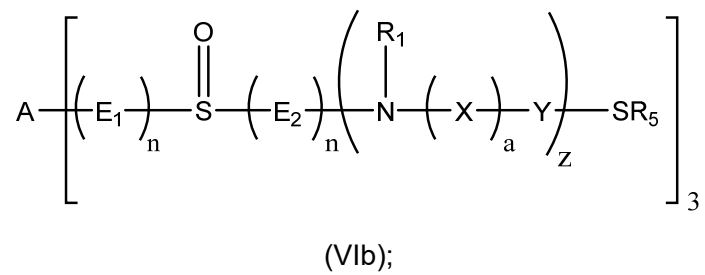
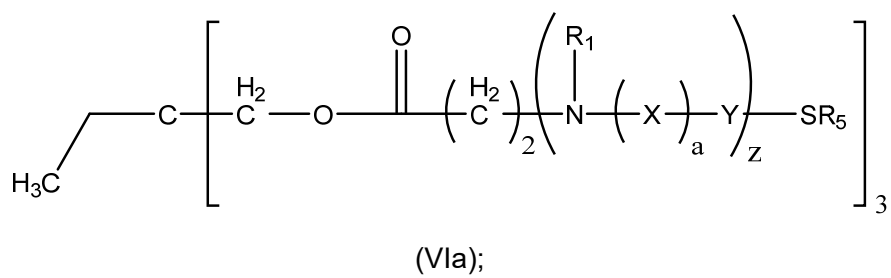
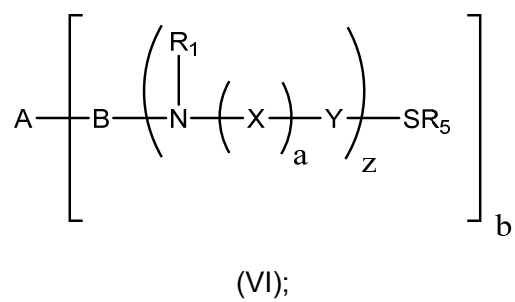
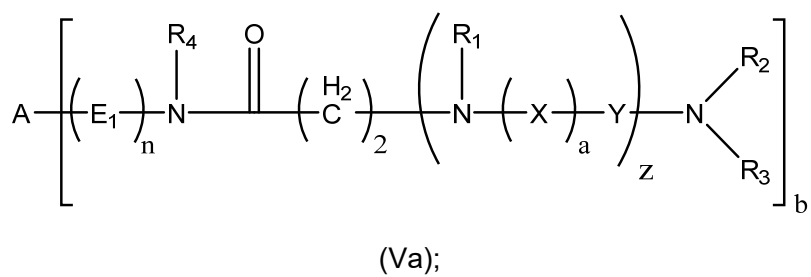
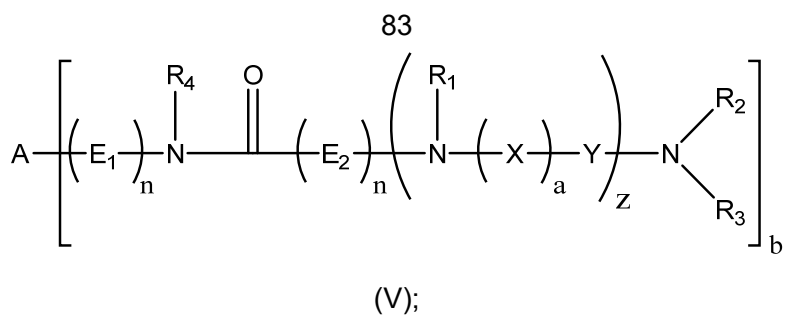
- 5 **[00185]** En algunas modalidades, el poliplego comprende un componente de ácido nucleico y un polímero de las fórmulas (III) a (VIIe):



(III);



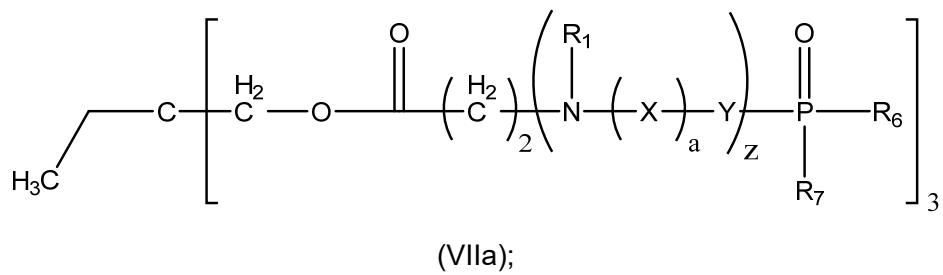
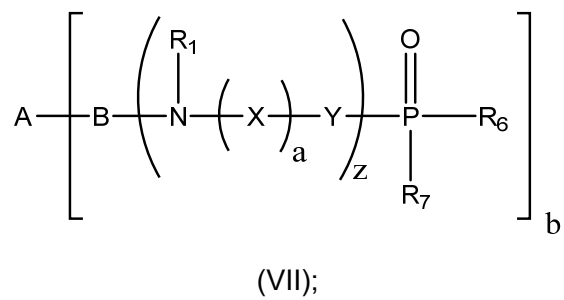
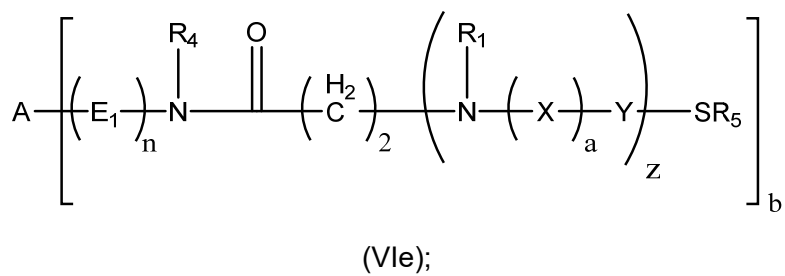
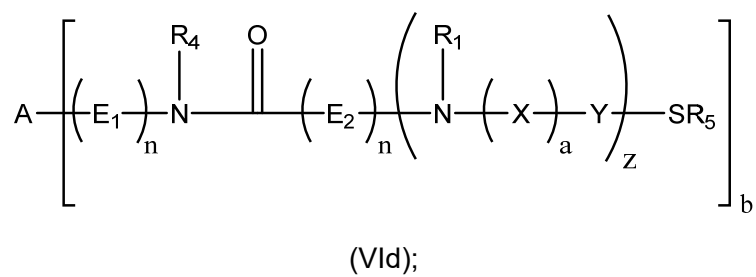
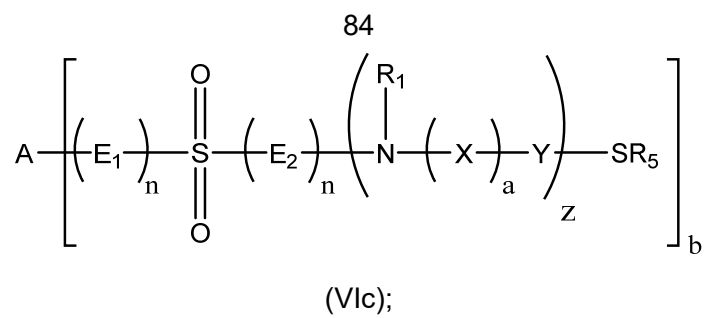
(IV);



5

10

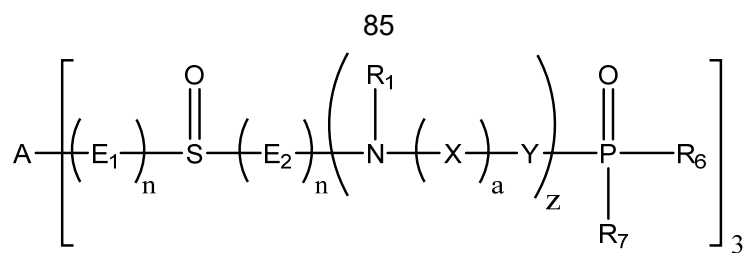
15



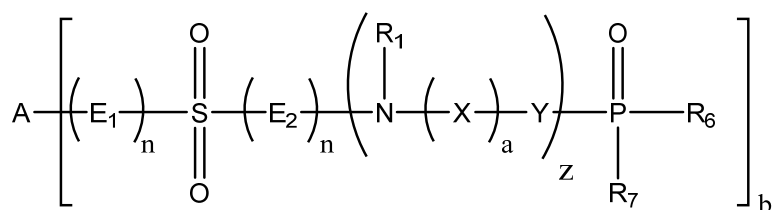
5

10

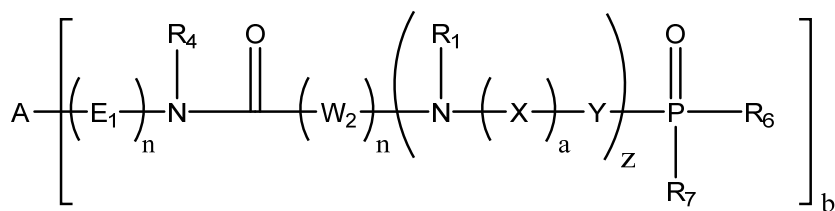
15



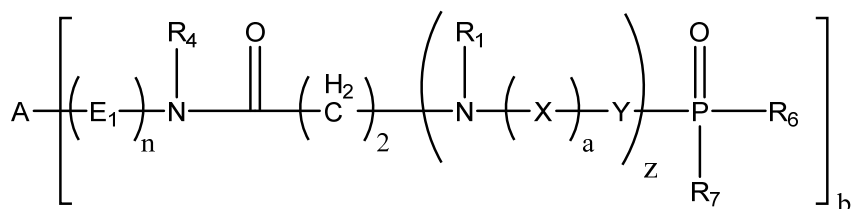
(VIIb);



(VIIc);



(VIId);

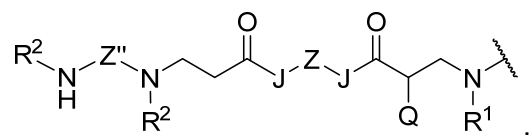
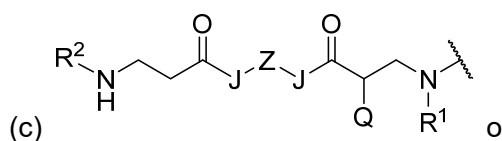
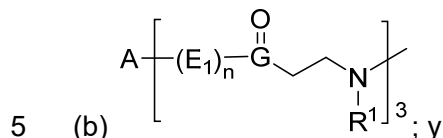
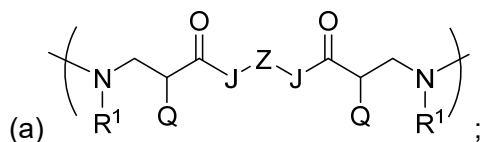


(VIIe);

en donde, en cada aparición, cada R₅, R₆ y R₇ es independientemente H, alquilo C₁-C₄₀, heteroalquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, heteroalquenileno C₂-C₄₀, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₄₀, heteroalquinileno C₂-C₄₀, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, o heteroarilo; en donde el heterociclilo y heteroarilo contienen 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, S, P y O; en donde el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₈, cicloalquenilo C₄-C₈, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterociclilo, arilo, y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con D, halógeno, alquilo C₁-C₆, -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), o -N(alquilo C₁-C₆)₂; y las variables restantes son tal como se definieron anteriormente.

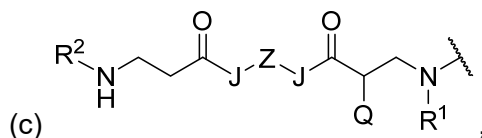
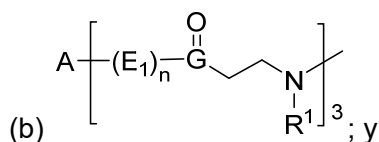
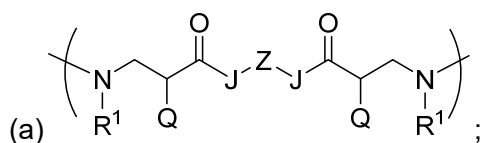
[00186] En algunas modalidades, z es 1, 2, o 3. En algunas modalidades, z es 1.

[00187] En algunas modalidades, el políplejo comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



[00188] en donde R_1 , R_2 , A , E_1 , G , J , Q , Z , Z'' y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

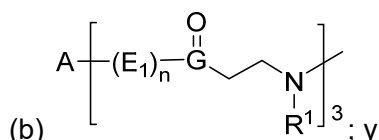
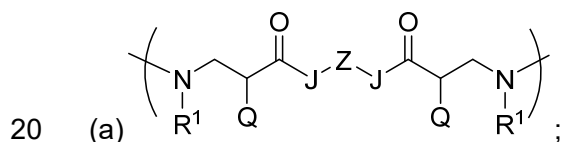
[00189] En algunas modalidades, el políplejo comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:

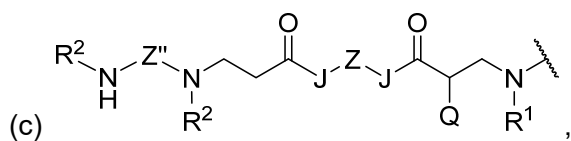


en donde R_1 , R_2 , A, E_1 , G, J, Q, Z, y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente.

- 5 En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de
- 15 Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

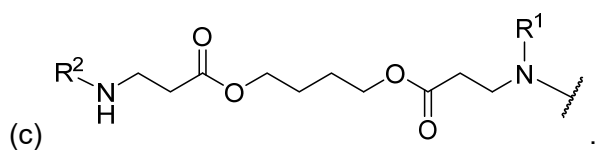
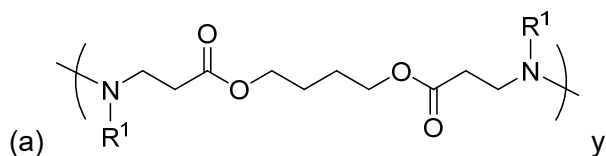
[00190] En algunas modalidades, el poliplego comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



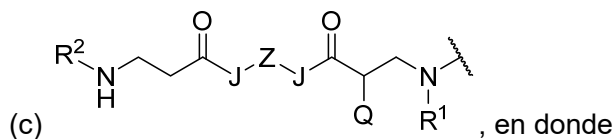
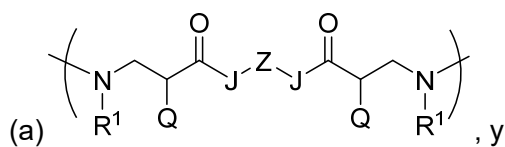


en donde R_1 , R_2 , A, E₁, G, J, Q, Z, Z'' y n tienen cualquiera de las definiciones proporcionadas en la presente. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

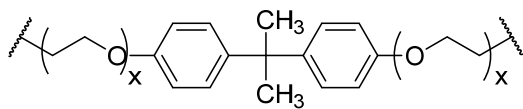
[00191] En algunas modalidades adicionales, el poliplego comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



[00192] En algunas modalidades adicionales, el poliplego comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:

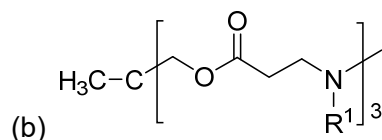


J es O y Z es



, en donde x es 1-1000.

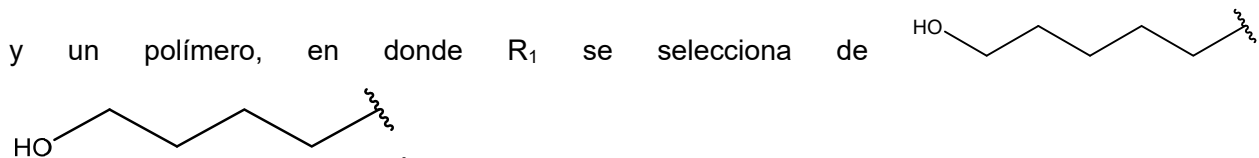
[00193] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



5

[00194] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

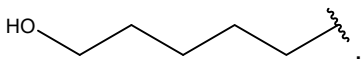
y un polímero, en donde R_1 se selecciona de



[00195] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

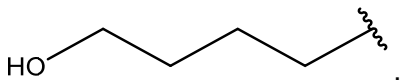
10

y un polímero, en donde R_1 es



[00196] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

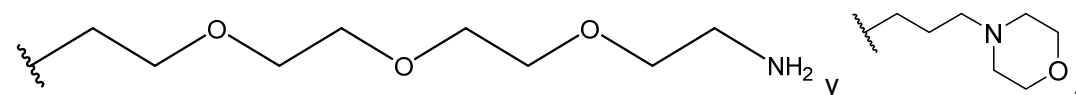
y un polímero, en donde R_1 es



[00197] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

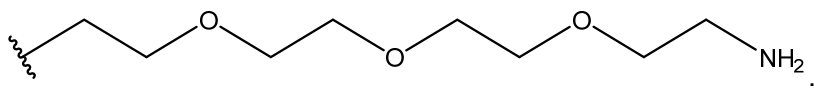
y un polímero, en donde R_2 se selecciona de

15



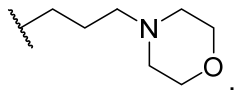
[00198] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

y un polímero, en donde R_2 es



[00199] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

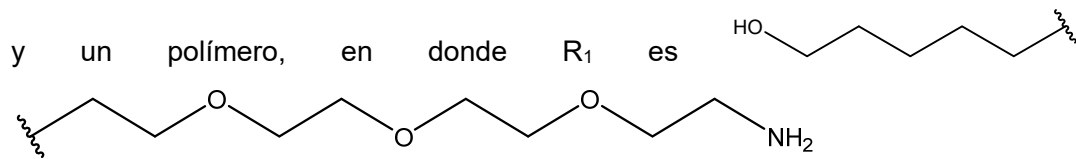
y un polímero, en donde R_2 es



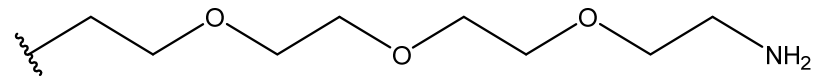
20

[00200] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

y un polímero, en donde R_1 es



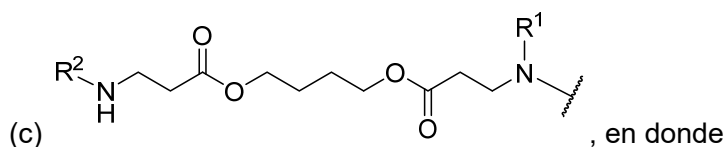
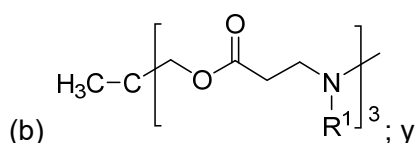
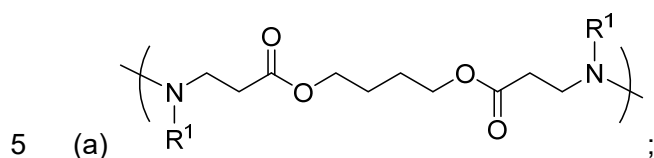
y R_2 es



[00201] En algunas modalidades adicionales, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico

y un polímero, en donde R_1 es $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y R_2 es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

[00202] En algunas modalidades, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



R_1 es $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y

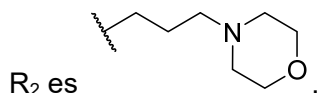
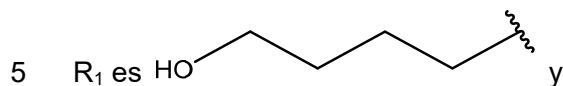
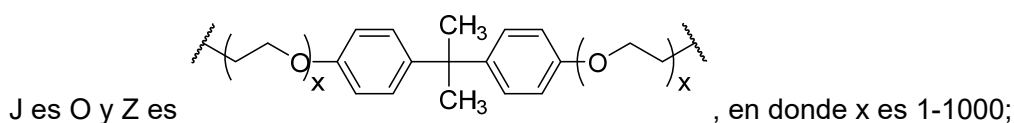
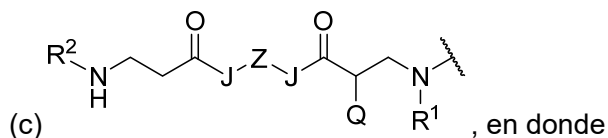
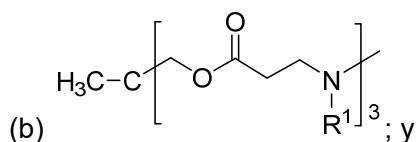
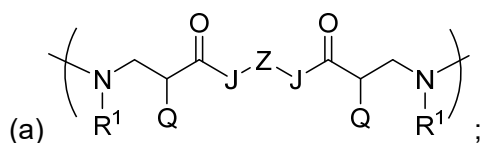
R_2 se selecciona de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. En algunas

10 modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas

15 modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el

20 intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

[00203] En algunas modalidades, el poliplejo comprende un componente de ácido nucleico y un polímero que comprende:



En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 3 kDa a alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de entre alrededor de 10 kDa y 50 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 5 kDa a alrededor de 15 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 10 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 20 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 30 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un M_w de alrededor de 40 kDa. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de Mark-Houwink menor que alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un parámetro alfa definido a partir de la ecuación de Mark-Houwink en el intervalo de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 1,0 a alrededor de 8,0. En algunas modalidades adicionales, el polímero tiene un PDI de alrededor de 2,5.

20 **[00204]** En algunas modalidades, el polímero y el componente de ácido nucleico están presentes en una relación de alrededor de 0,1:1 a alrededor de 200:1 (p/p). Por ejemplo, el polímero y el componente de ácido nucleico están presentes en una relación en el intervalo de alrededor de 0,1:1, alrededor de 0,2:1, alrededor de 0,3:1, alrededor de 0,4:1, alrededor de 0,5:1, alrededor de 0,6:1, alrededor de 0,7:1, alrededor de 0,8:1, alrededor de 0,9:1, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor

de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1, alrededor
de 10:1 alrededor de 11:1, alrededor de 12:1, alrededor de 13:1, alrededor de 14:1, alrededor de 15:1,
alrededor de 16:1, alrededor de 17:1, alrededor de 18:1, alrededor de 19:1, alrededor de 20:1, alrededor
de 21:1, alrededor de 22:1, alrededor de 23:1, alrededor de 24:1, alrededor de 25:1, alrededor de 26:1,
5 alrededor de 27:1, alrededor de 28:1, alrededor de 29:1, alrededor de 30:1, alrededor de 31:1, alrededor
de 32:1, alrededor de 33:1, alrededor de 34:1, alrededor de 35:1, alrededor de 36:1, alrededor de 37:1,
alrededor de 38:1, alrededor de 39:1, alrededor de 40:1, alrededor de 41:1, alrededor de 42:1, alrededor
de 43:1, alrededor de 44:1, alrededor de 45:1, alrededor de 46:1, alrededor de 47:1, alrededor de 48:1,
alrededor de 49:1, alrededor de 50:1, alrededor de 51:1, alrededor de 52:1, alrededor de 53:1, alrededor
10 de 54:1, alrededor de 55:1, alrededor de 56:1, alrededor de 57:1, alrededor de 58:1, alrededor de 59:1,
alrededor de 60:1, alrededor de 61:1, alrededor de 62:1, alrededor de 63:1, alrededor de 64:1, alrededor
de 65:1, alrededor de 66:1, alrededor de 67:1, alrededor de 68:1, alrededor de 69:1, alrededor de 70:1,
alrededor de 71:1, alrededor de 72:1, alrededor de 73:1, alrededor de 74:1, alrededor de 75:1, alrededor
de 76:1, alrededor de 77:1, alrededor de 78:1, alrededor de 79:1, alrededor de 80:1, alrededor de 81:1,
15 alrededor de 82:1, alrededor de 83:1, alrededor de 84:1, alrededor de 85:1, alrededor de 86:1, alrededor
de 87:1, alrededor de 88:1, alrededor de 89:1, alrededor de 90:1, alrededor de 91:1, alrededor de 92:1,
alrededor de 93:1, alrededor de 94:1, alrededor de 95:1, alrededor de 96:1, alrededor de 97:1, alrededor
de 98:1, alrededor de 99:1, alrededor de 100:1 alrededor de 101:1, alrededor de 102:1, alrededor de
103:1, alrededor de 104:1, alrededor de 105:1, alrededor de 106:1, alrededor de 107:1, alrededor de
20 108:1, alrededor de 109:1, alrededor de 110:1, alrededor de 111:1, alrededor de 112:1, alrededor de
113:1, alrededor de 114:1, alrededor de 115:1, alrededor de 116:1, alrededor de 117:1, alrededor de
118:1, alrededor de 119:1, alrededor de 120:1, alrededor de 121:1, alrededor de 122:1, alrededor de
123:1, alrededor de 124:1, alrededor de 125:1, alrededor de 126:1, alrededor de 127:1, alrededor de
128:1, alrededor de 129:1, alrededor de 130:1, alrededor de 131:1, alrededor de 132:1, alrededor de
25 133:1, alrededor de 134:1, alrededor de 135:1, alrededor de 136:1, alrededor de 137:1, alrededor de
138:1, alrededor de 139:1, alrededor de 140:1, alrededor de 141:1, alrededor de 142:1, alrededor de
143:1, alrededor de 144:1, alrededor de 145:1, alrededor de 146:1, alrededor de 147:1, alrededor de
148:1, alrededor de 149:1, alrededor de 150:1, alrededor de 151:1, alrededor de 152:1, alrededor de
153:1, alrededor de 154:1, alrededor de 155:1, alrededor de 156:1, alrededor de 157:1, alrededor de
30 158:1, alrededor de 159:1, alrededor de 160:1, alrededor de 161:1, alrededor de 162:1, alrededor de
163:1, alrededor de 164:1, alrededor de 165:1, alrededor de 166:1, alrededor de 167:1, alrededor de
168:1, alrededor de 169:1, alrededor de 170:1, alrededor de 171:1, alrededor de 172:1, alrededor de
173:1, alrededor de 174:1, alrededor de 175:1, alrededor de 176:1, alrededor de 177:1, alrededor de
178:1, alrededor de 179:1, alrededor de 180:1, alrededor de 181:1, alrededor de 182:1, alrededor de

183:1, alrededor de 184:1, alrededor de 185:1, alrededor de 186:1, alrededor de 187:1, alrededor de 188:1, alrededor de 189:1, alrededor de 190:1, alrededor de 191:1, alrededor de 192:1, alrededor de 193:1, alrededor de 194:1, alrededor de 195:1, alrededor de 196:1, alrededor de 197:1, alrededor de 198:1, alrededor de 199:1 a alrededor de 200:1, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En
 5 algunas modalidades, el polímero y el componente de ácido nucleico están presentes en una relación de alrededor de 20:1 a alrededor de 80:1 (p/p).

[00205] En algunas modalidades, el polímero y el componente de ácido nucleico están presentes en una relación de alrededor de 0,1:1, alrededor de 0,2:1, alrededor de 0,3:1, alrededor de 0,4:1, alrededor de 0,5:1, alrededor de 0,6:1, alrededor de 0,7:1, alrededor de 0,8:1, alrededor de 0,9:1, alrededor de 1:1,
 10 alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1, alrededor de 10:1 alrededor de 11:1, alrededor de 12:1, alrededor de 13:1, alrededor de 14:1, alrededor de 15:1, alrededor de 16:1, alrededor de 17:1, alrededor de 18:1, alrededor de 19:1, alrededor de 20:1, alrededor de 21:1, alrededor de 22:1, alrededor de 23:1, alrededor de 24:1, alrededor de 25:1, alrededor de 26:1, alrededor de 27:1, alrededor de 28:1, alrededor de 29:1,
 15 alrededor de 30:1, alrededor de 31:1, alrededor de 32:1, alrededor de 33:1, alrededor de 34:1, alrededor de 35:1, alrededor de 36:1, alrededor de 37:1, alrededor de 38:1, alrededor de 39:1, alrededor de 40:1, alrededor de 41:1, alrededor de 42:1, alrededor de 43:1, alrededor de 44:1, alrededor de 45:1, alrededor de 46:1, alrededor de 47:1, alrededor de 48:1, alrededor de 49:1, alrededor de 50:1, alrededor de 51:1, alrededor de 52:1, alrededor de 53:1, alrededor de 54:1, alrededor de 55:1, alrededor de 56:1, alrededor de 57:1, alrededor de 58:1, alrededor de 59:1, alrededor de 60:1, alrededor de 61:1, alrededor de 62:1,
 20 alrededor de 63:1, alrededor de 64:1, alrededor de 65:1, alrededor de 66:1, alrededor de 67:1, alrededor de 68:1, alrededor de 69:1, alrededor de 70:1, alrededor de 71:1, alrededor de 72:1, alrededor de 73:1, alrededor de 74:1, alrededor de 75:1, alrededor de 76:1, alrededor de 77:1, alrededor de 78:1, alrededor de 79:1, alrededor de 80:1, alrededor de 81:1, alrededor de 82:1, alrededor de 83:1, alrededor de 84:1, alrededor de 85:1, alrededor de 86:1, alrededor de 87:1, alrededor de 88:1, alrededor de 89:1, alrededor de 90:1, alrededor de 91:1, alrededor de 92:1, alrededor de 93:1, alrededor de 94:1, alrededor de 95:1, alrededor de 96:1, alrededor de 97:1, alrededor de 98:1, alrededor de 99:1, alrededor de 100:1 alrededor de 101:1, alrededor de 102:1, alrededor de 103:1, alrededor de 104:1, alrededor de 105:1, alrededor de 106:1, alrededor de 107:1, alrededor de 108:1, alrededor de 109:1, alrededor de 110:1, alrededor de
 30 111:1, alrededor de 112:1, alrededor de 113:1, alrededor de 114:1, alrededor de 115:1, alrededor de 116:1, alrededor de 117:1, alrededor de 118:1, alrededor de 119:1, alrededor de 120:1, alrededor de 121:1, alrededor de 122:1, alrededor de 123:1, alrededor de 124:1, alrededor de 125:1, alrededor de 126:1, alrededor de 127:1, alrededor de 128:1, alrededor de 129:1, alrededor de 130:1, alrededor de 131:1, alrededor de 132:1, alrededor de 133:1, alrededor de 134:1, alrededor de 135:1, alrededor de

136:1, alrededor de 137:1, alrededor de 138:1, alrededor de 139:1, alrededor de 140:1, alrededor de 141:1, alrededor de 142:1, alrededor de 143:1, alrededor de 144:1, alrededor de 145:1, alrededor de 146:1, alrededor de 147:1, alrededor de 148:1, alrededor de 149:1, alrededor de 150:1, alrededor de 151:1, alrededor de 152:1, alrededor de 153:1, alrededor de 154:1, alrededor de 155:1, alrededor de 156:1, alrededor de 157:1, alrededor de 158:1, alrededor de 159:1, alrededor de 160:1, alrededor de 161:1, alrededor de 162:1, alrededor de 163:1, alrededor de 164:1, alrededor de 165:1, alrededor de 166:1, alrededor de 167:1, alrededor de 168:1, alrededor de 169:1, alrededor de 170:1, alrededor de 171:1, alrededor de 172:1, alrededor de 173:1, alrededor de 174:1, alrededor de 175:1, alrededor de 176:1, alrededor de 177:1, alrededor de 178:1, alrededor de 179:1, alrededor de 180:1, alrededor de 181:1, alrededor de 182:1, alrededor de 183:1, alrededor de 184:1, alrededor de 185:1, alrededor de 186:1, alrededor de 187:1, alrededor de 188:1, alrededor de 189:1, alrededor de 190:1, alrededor de 191:1, alrededor de 192:1, alrededor de 193:1, alrededor de 194:1, alrededor de 195:1, alrededor de 196:1, alrededor de 197:1, alrededor de 198:1, alrededor de 199:1 o alrededor de 200:1. En algunas modalidades, el polímero y el componente de ácido nucleico están presentes en una relación de alrededor de 30:1 (p/p).

[00206] En algunas modalidades, el tamaño de partícula es menor que 2 μm . En algunas modalidades, el tamaño de partícula del poliplejo es menor que alrededor de 300 nm. Por ejemplo, el tamaño de partícula del poliplejo puede ser de alrededor de 50, 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99, alrededor de 100, alrededor de 101, alrededor de 102, alrededor de 103, alrededor de 104, alrededor de 105, alrededor de 106, alrededor de 107, alrededor de 108, alrededor de 109, alrededor de 110, alrededor de 111, alrededor de 112, alrededor de 113, alrededor de 114, alrededor de 115, alrededor de 116, alrededor de 117, alrededor de 118, alrededor de 119, alrededor de 120, alrededor de 121, alrededor de 122, alrededor de 123, alrededor de 124, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 131, alrededor de 132, alrededor de 133, alrededor de 134, alrededor de 135, alrededor de 136, alrededor de 137, alrededor de 138, alrededor de 139, alrededor de 140, alrededor de 141, alrededor de 142, alrededor de 143, alrededor de 144, alrededor de 145, alrededor de

146, alrededor de 147, alrededor de 148, alrededor de 149, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 156, alrededor de 157, alrededor de 158, alrededor de 159, alrededor de 160, alrededor de 161, alrededor de 162, alrededor de 163, alrededor de 164, alrededor de 165, alrededor de 166, alrededor de 167, alrededor de 168, alrededor de 169, alrededor de 170, alrededor de 171, alrededor de 172, alrededor de 173, alrededor de 174, alrededor de 175, alrededor de 176, alrededor de 177, alrededor de 178, alrededor de 179, alrededor de 180, alrededor de 181, alrededor de 182, alrededor de 183, alrededor de 184, alrededor de 185, alrededor de 186, alrededor de 187, alrededor de 188, alrededor de 189, alrededor de 190, alrededor de 191, alrededor de 192, alrededor de 193, alrededor de 194, alrededor de 195, alrededor de 196, alrededor de 197, alrededor de 198, alrededor de 199, alrededor de 200, alrededor de 201, alrededor de 202, alrededor de 203, alrededor de 204, alrededor de 205, alrededor de 206, alrededor de 207, alrededor de 208, alrededor de 209, alrededor de 210, alrededor de 211, alrededor de 212, alrededor de 213, alrededor de 214, alrededor de 215, alrededor de 216, alrededor de 217, alrededor de 218, alrededor de 219, alrededor de 220, alrededor de 221, alrededor de 222, alrededor de 223, alrededor de 224, alrededor de 225, alrededor de 226, alrededor de 227, alrededor de 228, alrededor de 229, alrededor de 230, alrededor de 231, alrededor de 232, alrededor de 233, alrededor de 234, alrededor de 235, alrededor de 236, alrededor de 237, alrededor de 238, alrededor de 239, alrededor de 240, alrededor de 241, alrededor de 242, alrededor de 243, alrededor de 244, alrededor de 245, alrededor de 246, alrededor de 247, alrededor de 248, alrededor de 249, alrededor de 250, alrededor de 251, alrededor de 252, alrededor de 253, alrededor de 254, alrededor de 255, alrededor de 256, alrededor de 257, alrededor de 258, alrededor de 259, alrededor de 260, alrededor de 261, alrededor de 262, alrededor de 263, alrededor de 264, alrededor de 265, alrededor de 266, alrededor de 267, alrededor de 268, alrededor de 269, alrededor de 270, alrededor de 271, alrededor de 272, alrededor de 273, alrededor de 274, alrededor de 275, alrededor de 276, alrededor de 277, alrededor de 278, alrededor de 279, alrededor de 280, alrededor de 281, alrededor de 282, alrededor de 283, alrededor de 284, alrededor de 285, alrededor de 286, alrededor de 287, alrededor de 288, alrededor de 289, alrededor de 290, alrededor de 291, alrededor de 292, alrededor de 293, alrededor de 294, alrededor de 295, alrededor de 296, alrededor de 297, alrededor de 298, alrededor de 299, o alrededor de 300 nm. En algunas modalidades, los poliplejos de la presente descripción tienen un tamaño de partícula de alrededor de 60 nm a alrededor de 250 nm. En algunas modalidades, los poliplejos de la presente descripción tienen un tamaño de partícula de alrededor de 175 nm a alrededor de 250 nm.

[00207] En algunas modalidades, los poliplejos de la presente descripción tienen un potencial zeta de alrededor de 0 mV a alrededor de 100 mV. Por ejemplo, los poliplejos de la presente descripción pueden tener un potencial zeta en el intervalo de alrededor de 0, alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3,

alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89, alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99 a alrededor de 100 mV. En algunas modalidades, el potencial zeta es de alrededor de 30 mV a alrededor de 34 mV.

[00208] En algunas modalidades, los poliplejos de la presente descripción tienen un potencial zeta de alrededor de 0, alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20, alrededor de 21, alrededor de 22, alrededor de 23, alrededor de 24, alrededor de 25, alrededor de 26, alrededor de 27, alrededor de 28, alrededor de 29, alrededor de 30, alrededor de 31, alrededor de 32, alrededor de 33, alrededor de 34, alrededor de 35, alrededor de 36, alrededor de 37, alrededor de 38, alrededor de 39, alrededor de 40, alrededor de 41, alrededor de 42, alrededor de 43, alrededor de 44, alrededor de 45, alrededor de 46, alrededor de 47, alrededor de 48, alrededor de 49, alrededor de 50, alrededor de 51, alrededor de 52, alrededor de 53, alrededor de 54, alrededor de 55, alrededor de 56, alrededor de 57, alrededor de 58, alrededor de 59, alrededor de 60, alrededor de 61, alrededor de 62, alrededor de 63, alrededor de 64, alrededor de 65, alrededor de 66, alrededor de 67, alrededor de 68, alrededor de 69, alrededor de 70, alrededor de 71, alrededor de 72, alrededor de 73, alrededor de 74, alrededor de 75, alrededor de 76, alrededor de 77, alrededor de 78, alrededor de 78, alrededor de 79, alrededor de 80, alrededor de 81, alrededor de 82, alrededor de 83, alrededor de 84, alrededor de 85, alrededor de 86, alrededor de 87, alrededor de 88, alrededor de 89,

alrededor de 90, alrededor de 91, alrededor de 92, alrededor de 93, alrededor de 94, alrededor de 95, alrededor de 96, alrededor de 97, alrededor de 98, alrededor de 99 o alrededor de 100 mV.

[00209] En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico del poliplejo es un plásmido, nanoplásmido, ácido nucleico, minicírculo o sistema de edición génica. En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico del poliplejo es un plásmido. En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico del poliplejo es un nanoplásmido. En algunas modalidades, el nanoplásmido comprende un transgén eucariota y una cadena principal bacteriana con un tamaño menor que 0,5 kb. En algunas modalidades, el plásmido o nanoplásmido es un plásmido sin marcador de resistencia a antibióticos o un nanoplásmido sin marcador de resistencia a antibióticos. En algunas modalidades, el plásmido o nanoplásmido comprende un marcador de selección de sacarosa o un marcador supresor sin sentido.

[00210] En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico del poliplejo es un sistema de edición génica. En algunas modalidades, el sistema de edición génica es un (i) sistema asociado a repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) (Cas); (ii) un sistema de nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN); o (iii) un sistema de nucleasas de dedos de zinc (ZFN).

[00211] En una modalidad, el ácido nucleico es una molécula inductora de iARN. La molécula inductora de iARN puede seleccionarse del grupo que consiste en ARNip, ARNcd, ARNhc y microARN.

[00212] En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico comprende un promotor específico del tejido.

[00213] En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico comprende un gen asociado con una enfermedad o un trastorno genético. La enfermedad o el trastorno genético puede ser causado por una mutación en uno o más genes que da como resultado una expresión de proteína baja, ausente o disfuncional. El gen puede seleccionarse del grupo que consiste en COL7A1, LAMB3, ADA, SERPINA1, CFTR, HTT, NF1, PHA, HBS, FERMT1, KRT14, DSP, SPINK5, y FLG. En algunas modalidades, el gen es COL7A1 y la enfermedad o el trastorno genético es una forma de epidermólisis ampullosa. La epidermólisis ampullosa incluye epidermólisis ampullosa distrófica (autosómica recesiva), epidermólisis ampullosa distrófica (variante localizada), epidermólisis ampullosa pruriginosa, epidermólisis ampullosa (pretibial), epidermólisis ampullosa simple (tipo Dowling-Meara), epidermólisis ampullosa simple (tipo Koebner), epidermólisis ampullosa simple (recesiva 1), epidermólisis ampullosa simple (tipo Weber-Cockayne), epidermólisis ampullosa (acantolítica letal). En algunas modalidades, el trastorno genético o la enfermedad genética es deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), deficiencia de antitripsina alfa-1, fibrosis quística, enfermedad de Huntington, neurofibromatosis tipo 1, fenilcetonuria, anemia de células falciformes, miositis por cuerpos de inclusión esporádica, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Kindler, epidermólisis ampullosa articular, dermatopatía pigmentosa reticularis, síndrome

de Naegeli-Franceschetti-Jadassohn, síndrome de Netherton, ictiosis vulgar, dermatitis atópica, síndrome de Usher, síndrome de Ehlers-Danlos, hipercolesterolemia familiar homocigota (HoFH) o enfermedad de Crohn.

[00214] En algunas modalidades, la secuencia del gen se optimiza para la máxima expresión de proteínas tras la administración del poliplego a una célula.

Composiciones farmacéuticas

[00215] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de uno o más poliplegos de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

[00216] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de uno o más poliplegos descritos en la presente, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en uno o más agentes espesantes, agentes amortiguadores, agentes de tonicidad y crioprotectores. En algunas modalidades, el agente espesante se selecciona del grupo que consiste en almidón de hidroxietilo, trehalosa, manitol, lactosa y glicina. En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona del grupo que consiste en un amortiguador de fosfato, un amortiguador de tris y HCl, un amortiguador de citrato, e histidina. En algunas modalidades, el agente de tonicidad se selecciona del grupo que consiste en manitol, sacarosa, glicina, glicerol, y cloruro de sodio.

[00217] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de uno o más poliplegos descritos en la presente, en combinación con un crioprotector. En algunas modalidades, el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, manitol, sorbitol, aerosil (dióxido de silicio coloidal), maltosa, poli(vinilpirrolidona), fructosa, dextrano, glicerol, alcohol poli(vinílico), glicerina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, y gelatina. En determinadas modalidades, el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, glucosa y manitol. En algunas modalidades, el crioprotector es sacarosa.

[00218] En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración oral, parenteral, por inhalación, tópica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraocular o intradérmica. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como una loción seleccionada del grupo que consiste en loción no acuosa, loción de agua en aceite y loción de aceite en agua. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se liofiliza para su uso posterior. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se congela en una solución acuosa.

[00219] En algunas modalidades, la composición farmacéutica es un liófilo. En algunas modalidades, el liófilo comprende una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos descritos en la presente, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas modalidades, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un crioprotector. En determinadas modalidades, el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, glucosa y manitol. En algunas modalidades, el crioprotector es sacarosa.

[00220] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para elaborar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos descritos en la presente, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el método comprende combinar uno o más polipéptidos descritos en la presente con un solvente adecuado. En algunas modalidades, el solvente adecuado se selecciona del grupo que consiste en agua, dimetilsulfóxido, y combinaciones de estos. En determinadas modalidades, el solvente adecuado comprende agua.

[00221] En algunas modalidades, el método comprende:

- (a) combinar uno o más polipéptidos descritos en la presente con un solvente adecuado;
- (b) agregar uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables a la mezcla de la Etapa (a) y
- (c) liofilizar la mezcla de la Etapa (b) para proporcionar un liófilo.

[00222] En algunas modalidades, los uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables de la etapa (b) comprenden un crioprotector. En determinadas modalidades, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 % a alrededor de 20 %, lo que incluye alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, y alrededor de 19 %, lo que incluye todos los intervalos intermedios, en peso de la mezcla de la Etapa (b). En determinadas modalidades, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, o alrededor de 20 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 3 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 5 % en peso de la mezcla de la Etapa (b).

[00223] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas

preparadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

[00224] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas preparadas mediante un método que comprende:

(a) combinar uno o más poliplejos descritos en la presente con un solvente adecuado;

5 (b) agregar uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables a la mezcla de la Etapa (a) y

(c) liofilizar la mezcla de la Etapa (b) para proporcionar un liófilo.

[00225] En algunas modalidades, los uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables de la Etapa (b) comprenden un crioprotector. En determinadas modalidades, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 % a alrededor de 20 %, lo que incluye alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, y alrededor de 19 %, lo que incluye todos los intervalos intermedios, en peso de la mezcla de la Etapa (b). En determinadas modalidades, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, o alrededor de 20 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 1 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 3 % en peso de la mezcla de la Etapa (b). En modalidades particulares, la concentración del crioprotector es de alrededor de 5 % en peso de la mezcla de la Etapa (b).

Métodos de transfección de células

[00226] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método de transfección de células que comprende poner en contacto una o más células diana con una composición farmacéutica de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en condiciones adecuadas para transfectar la célula diana con un poliplejo. En algunas modalidades, las una o más células diana son células eucariotas. En algunas modalidades, las una o más células diana son uno o más de linfocitos T, linfocitos B, células sanguíneas, células alveolares, neumocitos, neuronas cerebrales, neuronas cutáneas, células epiteliales, queratinocitos, células iPS, fibroblastos y células de las glándulas sudoríparas.

Métodos de tratamiento

[00227] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una

enfermedad en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, de modo que una o más de las células del paciente se transfectan con el componente de ácido nucleico del poliplejo.

- 5 **[00228]** En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, en donde la administración de la composición corrige una traducción defectuosa de un gen diana en el sujeto.
- 10 **[00229]** En algunas modalidades, el gen diana se selecciona del grupo que consiste en COL7A1, LAMB3, ADA, SERPINA1, CFTR, HTT, NF1, PHA, HBS, FERMT1, KRT14, DSP, SPINK5, y FLG. En algunas modalidades, el gen es COL7A1 y la enfermedad o el trastorno genético es una forma de epidermólisis ampullosa. La epidermólisis ampullosa incluye epidermólisis ampullosa distrófica (autosómica recesiva), epidermólisis ampullosa distrófica (variante localizada), epidermólisis ampullosa pruriginosa, epidermólisis ampullosa (pretibial), epidermólisis ampullosa simple (tipo Dowling-Meara),
- 15 epidermólisis ampullosa simple (tipo Koebner), epidermólisis ampullosa simple (recesiva 1), epidermólisis ampullosa simple (tipo Weber-Cockayne), epidermólisis ampullosa (acantolítica letal). En algunas modalidades, el trastorno genético o la enfermedad genética es deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), deficiencia de antitripsina alfa-1, fibrosis quística, enfermedad de Huntington,
- 20 neurofibromatosis tipo 1, fenilcetonuria, anemia de células falciformes, miositis por cuerpos de inclusión esporádica, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Kindler, epidermólisis ampullosa articular, dermatopatía pigmentosa reticularis, síndrome de Naegeli-Franceschetti-Jadassohn, síndrome de Netherton, ictiosis vulgar, dermatitis atópica, síndrome de Usher, síndrome de Ehlers-Danlos, hipercolesterolemia familiar homocigota (HoFH) o enfermedad de Crohn.

25

Ejemplos

- [00230]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente descripción, y no deben interpretarse como limitantes de esta. En estos ejemplos, todas las partes y los porcentajes se presentan en peso, a menos que se indique de otro modo. A continuación, se indican las abreviaturas en los
- 30 ejemplos.

Ejemplo 1: LBPAE preparado mediante combinación de oligómeros lineales

[00231] La administración de genes de fibroblastos aún tiene que mostrar la eficiencia requerida para las aplicaciones terapéuticas. Tal como se describe en la presente, para superar esta limitación, se preparó un nuevo material de administración de genes LBPAE multifuncional de acuerdo con

determinadas modalidades de la presente descripción mediante una nueva estrategia de combinación de oligómeros lineales. El LBPAE de acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción logra una eficiencia de transfección superior y una toxicidad reducida en fibroblastos HPDF difíciles de transfectar y 3T3 utilizado comúnmente, tiene resultados sustancialmente mejores que los reactivos comercialmente disponibles, PEI y SuperFect ramificados. Los valores altos de LC_{50} de los poliplexos de LBPAE demuestran su biocompatibilidad favorable en las transfecciones de fibroblastos. Los estudios de mecanismos indican que LBPAE equipado con cantidades adecuadas de aminas primarias, secundarias y terciarias es capaz de condensar el ADN en partículas nanométricas con morfología esférica uniforme, lo que facilita la absorción celular y media una fuerte capacidad de amortiguación para realizar el escape endosomal eficiente. La hidrólisis de los enlaces éster en el LBPAE facilita la liberación de ADN y aumenta significativamente la biocompatibilidad, lo que permite un diseño flexible y el ajuste de las relaciones de polímero/ADN p/p. Junto con el alto rendimiento de LBPAE en las administraciones de genes indicadores, LBPAE puede administrar de manera eficiente el gen del minicírculo COL7A1 a HPDF y mejorar significativamente la expresión de C7, que es fundamental para mantener la integridad de la piel. Estos resultados demuestran que LBPAE es un vector no viral de alto rendimiento en la administración de genes basados en fibroblastos, lo que destaca su enorme potencial en el tratamiento de la genodermatosis y medicamentos regenerativos.

[00232] El crecimiento y la ramificación secuencial del oligómero lineal imparte a LBPAE resultante una distribución más uniforme de los segmentos lineales y las unidades de ramificación. Sorprendentemente, en el HPDF difícil de transfectar y en el fibroblasto de embrión de ratón (3T3) de uso común, el LBPAE recientemente desarrollado presenta una sólida capacidad de transfección génica, la expresión de gluciferasa (Gluc) tiene resultados mucho mejores que los reactivos comerciales de transfección génica PEI y SuperFect de hasta tres órdenes de magnitud y se logró una expresión de proteína de fluorescencia verde (GFP) de casi 100 %, sin inducir una citotoxicidad obvia. Para descifrar los posibles mecanismos detrás de la capacidad de transfección génica ultrapotente de LBPAE en fibroblastos, se investigaron las múltiples barreras extra e intracelulares asociadas con el proceso de transfección génica. Los resultados ilustran que LBPAE muestra una fuerte afinidad de unión al ADN y pueden condensar el ADN para formular poliplexos de tamaño nanométrico con una eficiencia de absorción celular de casi 100 %. La fuerte capacidad de amortiguación de protones junto con la biodegradabilidad de LBPAE también podría facilitar el escape del poliplexo de LBPAE/ADN de los endo/lisosomas y la liberación de ADN en el citoplasma. Además, se usó LBPAE para administrar un plásmido en minicírculo que codifica el gen COL7A1 (MCC7) a HPDF, y se detectó una regulación por aumento significativa de la expresión de C7, lo que muestra una gran promesa de LBPAE para el tratamiento de la genodermatosis por deficiencia de C7, tal como el trastorno genético de la piel devastador y debilitante,

RDEB.

[00233] Este Ejemplo describe una estrategia de combinación de oligómeros lineales para sintetizar LBPAE. Tal como se ilustra en la **FIGURA 8**, esta estrategia implica dos etapas secuenciales: formación de oligómeros lineales y ramificación. En la primera etapa, la amina de tipo A2 reacciona con el diacrilato de tipo C2 para generar el oligómero de base terminado en acrilato, que tiene, adicionalmente, un casquete en el extremo con una segunda amina. Después de la purificación para eliminar los monómeros sin reaccionar y el exceso de agente del casquete del extremo, se forma el oligómero lineal A2-C2. En la segunda etapa, se introduce triacrilato de tipo B3 para combinar el oligómero lineal A2-C2 y producir el LBPAE. Los beneficios de los LBPAE son dobles: 1) La longitud de los segmentos lineales en los LBPAE obtenidos podría ser predeterminada y, por lo tanto, puede adaptarse fácilmente; 2) Las unidades de ramificación en los LBPAE se podrían distribuir de forma más uniforme entre los segmentos lineales.

[00234] Para validar esta hipótesis, 5-amino-1-pentanol (AP), triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA), diacrilato de 1,4-butanodiol (BDA) y 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (DATOU), que se ha demostrado que son monómeros eficaces en la síntesis de PAE para la transfección génica, se usaron como monómeros de los tipos A2, B3, C2 y agente de casquete del extremo para la síntesis de LBPAE, respectivamente. AP y BDA con una relación estequiométrica de 1,2 : 1 se hicieron reaccionar en dimetilsulfóxido (DMSO) a 90 °C y se monitoreó el peso molecular promedio en peso (M_w) con cromatografía de permeación en gel (GPC). Después de 24 horas, cuando el M_w de la mezcla de reacción alcanzó 3000 Da, la reacción se detuvo al enfriarla hasta temperatura ambiente y diluirla con DMSO, luego, se agregó un exceso de DATOU como casquete del extremo de los oligómeros de base terminados en acrilato durante 48 horas a 25 °C. Después de eliminar los monómeros sin reaccionar, el agente de casquete del extremo junto con los oligómeros de un $M_w < 3000$ Da mediante diálisis en acetona, se obtuvo el oligómero lineal A2-C2 con un M_w de alrededor de 3500 Da y un índice de polidispersión (PDI) de 1,69 (**FIGURA 10**). Para generar LBPAE, el oligómero lineal A2-C2 y TMPTA se disolvieron en DMSO (la relación molar de A2-C2 : TMPTA se fijó en 3 : 1) y se hicieron reaccionar a 90 °C. Cuando el M_w fue de alrededor de 10 kDa, la reacción se detuvo y se incorporó un exceso de DATOU para consumir todos los grupos vinilo sin reaccionar. Y luego, el polímero se precipitó en éter dietílico y se secó en un horno de vacío para proporcionar el producto LBPAE final. La medición de GPC muestra que LBPAE tiene un M_w de 9,4 kDa con un PDI de 2,5 (**FIGURA 19**). El valor de alfa del gráfico de Mark-Houwink (MH) de 0,36 valida su estructura altamente ramificada (**FIGURA 10**). La composición química de LBPAE se confirma mediante ^1H NMR (**FIGURA 11**).

Ejemplo 2: LBPAE logra una gran eficiencia de transfección génica y una excelente viabilidad celular en fibroblastos

[00235] Un vector de administración de genes viable no solo puede lograr una gran eficiencia de transfección de genes, sino que también puede inducir una citotoxicidad mínima. Sin embargo, en la práctica, la mejora de la eficiencia de transfección de un vector génico suele ser a costa de su biocompatibilidad, o viceversa. Para evaluar la capacidad de transfección génica del LBPAE sintetizado e identificar los parámetros más óptimos para la transfección de fibroblastos, se evaluó primero una serie de poliplejos de LBPAE/ADN con diferentes relaciones de p/p para la transfección de HPDF y 3T3. Se utilizó ADN de Gluc como gen indicador y se cuantificó la eficiencia de transfección génica mediante mediciones de la actividad de Gluc después de la transfección. Se usaron ensayos de Alamarblue y evaluaciones de concentración letal 50 (LC₅₀) para medir la citotoxicidad y el perfil toxicológico de los fibroblastos después de la transfección. Y luego, la potencia de transfección de LBPAE se validó adicionalmente mediante citometría de flujo mediante el uso de ADN con GFP como gen indicador.

[00236] Expresión de Gluc y viabilidad celular de los fibroblastos después de la transfección con LBPAE

[00237] Para el vector de administración de genes basado en polímeros catiónicos, la relación en peso de polímero/ADN (p/p) es un parámetro útil para determinar tanto la eficiencia de transfección como la citotoxicidad,^[5,11] por lo tanto, primero se optimizó la relación de p/p de forma sistemática. Teniendo en cuenta que las células primarias (por ejemplo, HPDF) son usualmente frágiles a los polímeros catiónicos, La relación de LBPAE/ADN p/p usada para la transfección de HPDF se aumentó gradualmente de 10 : 1 a 50 : 1. Con el fin de establecer un punto de referencia sólido para la comparación, también se optimizaron las relaciones de p/p usadas para los dos reactivos de transfección de genes comerciales dendríticos PEI y SuperFect de acuerdo con los protocolos de los fabricantes y publicaciones previas.^[6,13]

La **FIGURA 1a** describe la actividad de Gluc y la viabilidad celular de HPDF después de la transfección. Se muestra claramente que las relaciones de p/p óptimas para la transfección de genes PEI y SuperFect son 1 : 1 y 3 : 1, respectivamente. Un aumento adicional en la relación de p/p no solo reduce obviamente la actividad de Gluc, sino que también aumenta sustancialmente la citotoxicidad. En comparación con la que se produce para una relación de p/p de 3 : 1, la actividad de Gluc de HPDF después de la transfección con los poliplejos de SuperFect/ADN, para la relación de p/p de 9 : 1, fue 3,4 veces menor y la viabilidad celular disminuyó de > 89 % a < 44 %. En marcado contraste, en el intervalo de las relaciones de p/p evaluadas, incluso en la relación de p/p más baja de 10 : 1, la expresión de Gluc de HPDF después de la transfección por los poliplejos de LBPAE/ADN es aún más fuerte que la mediada por los poliplejos de PEI/ADN y los poliplejos de SuperFect/ADN en sus relaciones de p/p óptimas. Especialmente, la actividad de Gluc de HPDF transfectado por los poliplejos de LBPAE/ADN en la

relación de p/p de 40 : 1 es hasta 103 veces mayor que la mediada por los poliplexos de PEI/ADN. Es importante destacar que LBPAE no indujo una citotoxicidad obvia. Incluso para la relación de p/p más alta de 50 : 1, aún se conservaba > 95 % de viabilidad celular. En 3T3, los poliplexos de PEI/ADN presentan una tendencia similar de eficiencia de transfección génica y citotoxicidad a la de HPDF.

5 Aunque en la relación de p/p de 6 : 1 y 9 : 1, los poliplexos de SuperFect/ADN muestran una mayor eficiencia de transfección génica, y conservan solo 62 % y 49 % de la viabilidad celular (**FIGURA 1b**). Nuevamente, en todas las relaciones de p/p evaluadas, los poliplexos de LBPAE/ADN presentan una fuerte capacidad de transfección génica y una alta viabilidad celular. La actividad de Gluc de 3T3 después de la transfección con los poliplexos de LBPAE/ADN es mayor en órdenes de magnitud que la
10 mediada por los poliplexos de PEI/ADN y SuperFect/ADN en sus relaciones de p/p óptimas. Sorprendentemente, en la relación de p/p de 70 : 1, los poliplexos de LBPAE/ADN mediaron una actividad de Gluc hasta 3292 veces mayor en comparación con los poliplexos de PEI/ADN, mientras que aún se mantuvo una viabilidad celular > 90 %. Cabe señalar que se utilizó la misma cantidad de ADN entre los grupos. Las relaciones de p/p mucho más altas empleadas para los poliplexos de LBPAE/ADN significan
15 que se usó significativamente más LBPAE que con PEI o SuperFect. Esto demuestra, además, la excelente biocompatibilidad de LBPAE.

[00238] Perfil toxicológico de LBPAE

[00239] Aunque se han desarrollado y seleccionado > 2500 candidatos para la transfección génica,^[28] hasta ahora no se ha realizado ningún estudio toxicológico con ninguno de los polímeros PAE en
20 fibroblastos. Para validar adicionalmente la biocompatibilidad de LBPAE en la transfección génica, se determinó el perfil toxicológico de LBPAE y se calculó el valor de LC_{50} . Con este fin, se usaron poliplexos de LBPAE/ADN con la misma relación de p/p de 40 : 1 para transfectar HPDF y 3T3 con una concentración de poliplexos de $355 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $755 \mu\text{g mL}^{-1}$. A modo de comparación, se usaron poliplexos de SuperFect/ADN y la concentración aumentó de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $55 \mu\text{g mL}^{-1}$. 24 horas después de la
25 transfección, las células se tiñeron simultáneamente con Calceína-AM fluorescente verde (C-AM, para células vivas) y el homodímero-1 de etidio fluorescente rojo (EthD-1, para células muertas). En la **FIGURA 2a** se muestran imágenes de fluorescencia representativas de células no tratadas y las transfectadas con los poliplexos de LBPAE/ADN en la concentración de $555 \mu\text{g mL}^{-1}$ y poliplexos de SuperFect/ADN en la concentración de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Puede observarse que aunque se trataron con una
30 concentración de un orden de magnitud mayor de los poliplexos de LBPAE/ADN, HPDF y 3T3 mostraron una viabilidad celular similar a la de los tratados con los poliplexos de SuperFect/ADN. Se determinó la viabilidad celular dependiente de la concentración de los poliplexos con el ensayo de Alamarblue y los resultados se muestran en la **FIGURA 2b** y la **FIGURA 2c**, a partir de los cuales se calculó que los

valores de LC_{50} para los poliplexos de SuperFect/ADN de HPDF y 3T3 son de $35,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $39,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, los valores de LC_{50} de los poliplexos de LBPAE/ADN son de $538,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $552,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que corresponde a un aumento de 14 y 13 veces en comparación con los de las contrapartes de SuperFect/ADN. SuperFect se ha utilizado ampliamente para la transfección

5 génica debido a su excelente biocompatibilidad,^[29,30] LBPAE que muestra un efecto de destrucción celular mucho menor demuestra su biocompatibilidad extremadamente alta, que es de gran importancia en la transfección génica, especialmente, para los tipos de células difíciles de transfectar debido a que pueden usarse dosis de poliplexos considerablemente altas o transfecciones repetidas múltiples para mejorar la eficiencia de la transfección.

10 **[00240]** Se cuantificó la expresión de GFP con citometría de flujo.

[00241] Se usó el ADN de Gluc para cuantificar el nivel de expresión general de transgenes mediado por LBPAE, además, se usó el ADN de GFP para cuantificar el porcentaje de células transfectadas. Se transfectaron HPDF y 3T3 con los poliplexos de LBPAE/ADN en las mismas relaciones de p/p que anteriormente. Tal como lo demuestran las imágenes de fluorescencia en la **FIGURA 3a**, para todas las

15 relaciones de p/p, se transfectaron mucho más HPDF mediante los poliplexos de LBPAE/ADN en comparación con los transfectados mediante las contrapartes de PEI/ADN y SuperFect/ADN en sus relaciones óptimas de p/p. Las mediciones de citometría de flujo muestran que el porcentaje de HPDF positivo para GFP alcanzado por los poliplexos de PEI/ADN y SuperFect/ADN es solo de 50 % y 44 %, respectivamente. Por el contrario, los poliplexos de LBPAE/ADN lograron un nivel mucho más alto de

20 población positiva para GFP, tal como se refleja en el gran desplazamiento de las poblaciones de células que responden al canal del espectro de GFP en las distribuciones del histograma (**FIGURA 3b**). La población positiva para GFP más baja mediada por poliplexos de LBPAE/ADN es de 68 % en la relación de p/p de 10 : 1. Cuando la relación de p/p es superior a 40 : 1, > 93 % de los HPDF son positivos para GFP. Además, la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de los HPDF transfectados por los

25 poliplexos de LBPAE/ADN es hasta 140 veces mayor que la de las contrapartes de PEI/ADN y SuperFect/ADN (**FIGURA 3c**). En 3T3, el porcentaje de células positivas para GFP logrado por los poliplexos de LBPAE/ADN aumentó de 35 % en la relación de p/p de 30 : 1 a > 91 % en la relación de p/p de 70 : 1, en contraste con 5 % y 11 % logrados por los poliplexos de PEI/ADN y SuperFect/ADN, respectivamente (**FIGURAS 3d y 3e**). Además, en la relación de p/p de 70 : 1, la MFI de 3T3 mediada

30 por los poliplexos de LBPAE/ADN fue de 272 y 230 veces mayor en comparación con el de las contrapartes de PEI/ADN y SuperFect/ADN (**FIGURA 3f**). Estos resultados indican que LBPAE no solo transfecta más cantidades de células, sino que también promueve significativamente el nivel de expresión de proteínas en las células transfectadas individualmente. Los fibroblastos primarios son tipos

de células difíciles de transfectar, el hecho de que LBPAE pueda mediar una eficiencia de transfección génica > 90 % en el HPDF primario demuestra su capacidad de transfección génica ultrapotente. Dado que LBPAE ha demostrado ser altamente biocompatible en una amplia gama de relaciones de p/p con una capacidad de transfección génica superior, se puede prever que LBPAE tendrá una amplia aplicabilidad en la transfección génica de fibroblastos.

Ejemplo 3: Posibles mecanismos de LBPAE para lograr una eficiencia de transfección génica ultrapotente y una excelente biocompatibilidad

[00242] Con el fin de descifrar los posibles mecanismos detrás del alto rendimiento de LBPAE en la transfección de fibroblastos, se llevó a cabo una serie de investigaciones que se relacionan con las múltiples barreras de liberación de genes extra e intracelulares que incluyen la condensación del ADN y la afinidad de unión, el tamaño de los polímeros, el potencial zeta, la morfología, la capacidad de amortiguación de protones, la velocidad de degradación y la liberación de ADN de los poliplexos.

[00243] Condensación de ADN y afinidad de unión de LBPAE

[00244] La condensación efectiva del ADN, que no solo puede proteger al ADN de la degradación por endonucleasas, sino que también favorece la absorción celular de los poliplexos, es el requisito previo para una transfección génica exitosa.^[30] Para los polímeros catiónicos, la condensación del ADN es impulsada principalmente por interacciones electrostáticas. Existe una variedad de aminas que pueden protonarse total o parcialmente para generar cargas positivas. Por ejemplo, las aminas que pueden protonarse parcial o totalmente son las múltiples aminas primarias de extremo derivadas del agente de casquete del extremo DATOU, o las múltiples aminas terciarias de la cadena principal derivadas de AP. La capacidad de condensación del ADN de LBPAE se determinó con electroforesis en gel de agarosa. Tal como se muestra en la **FIGURA 4a**, en todas las relaciones de p/p, no se observaron bandas de desplazamiento de ADN, lo que indica que el ADN con carga negativa está protegido por el LBPAE con carga positiva de manera efectiva y, por lo tanto, retenido en los pocillos de agarosa sin migración. Ambos reactivos comerciales de transfección génica, PEI y SuperFect, muestran una alta capacidad de condensación del ADN, especialmente el SuperFect, que condensa el ADN de forma tan ajustada que es difícil que el tinte de tinción del ADN acceda al ADN y, por lo tanto, la banda de ADN es más ligera. La afinidad de unión entre el ADN y LBPAE se cuantificó adicionalmente con el ensayo PicoGreen. Tal como se muestra en la **FIGURA 4b**, LBPAE presenta una fuerte afinidad de unión al ADN en todas las relaciones de p/p. En general, la afinidad de unión al ADN aumenta con la relación de p/p, por ejemplo, de 86 % en la relación de p/p de 10 : 1 a 96 % en la relación de p/p de 70 : 1, lo que demuestra que más LBPAE conduce a una interacción electrostática más fuerte entre LBPAE y el ADN. Comparativamente, tanto PEI como SuperFect muestran una afinidad de unión al ADN aún más fuerte de casi 100 %, la afinidad de unión al ADN de LBPAE, PEI y SuperFect se correlaciona muy bien con su capacidad de

condensación del ADN. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que una afinidad de unión al ADN moderada es más favorable para la transfección génica porque una interacción demasiado fuerte comprometería la liberación de ADN de los poliplexos.^[31,32]

[00245] Tamaño, potencial zeta y morfología de LBPAE/ADN

- 5 **[00246]** El tamaño nanométrico y la carga superficial positiva pueden facilitar la absorción celular de las partículas a través de la vía de endocitosis.^[33,34] Tal como se muestra en la **FIGURA 4c**, en la solución fisiológica, en todas las relaciones de p/p evaluadas, los tamaños promedio de poliplexos de LBPAE/ADN medidos con dispersión dinámica de luz (DLS) son menores que 250 nm. En el intervalo de relación de p/p de 10 : 1 a 60 : 1, los poliplexos tienen los tamaños de partículas entre 228 nm y 188 nm. Sin embargo, cuando la relación de p/p aumenta aún más a 70 : 1, el tamaño del poliplexo disminuye a 97 nm. En consecuencia, todos los poliplexos presentan un potencial zeta positivo. En la relación de p/p más baja de 10 : 1, los poliplexos de LBPAE/ADN tienen un potencial zeta muy bajo de 6 mV. Cuando la relación de p/p es superior a 10 : 1, el potencial zeta aumenta significativamente hasta > 30 mV, con el más alto de 34 mV alcanzado en la relación de p/p de 40 : 1. En las mismas condiciones de prueba, los poliplexos de SuperFect/ADN tienen un tamaño muy pequeño de alrededor de 92 nm y un alto potencial zeta de alrededor de 37 mV. Estas observaciones son consistentes con la capacidad de condensación del ADN y la afinidad de unión de los polímeros. Por el contrario, aunque tienen alta capacidad de unión y condensación de ADN, los poliplexos de PEI/ADN tienen un tamaño sustancialmente grande que es > 500 nm. Además, se usó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar el tamaño y la morfología de los poliplexos. Tal como se muestra en la **FIGURA 4d**, todos los poliplexos de LBPAE/ADN y SuperFect/ADN manifiestan morfologías esféricas uniformes con el tamaño entre 60 nm y 250 nm, similar a los medidos mediante DLS. Es importante destacar que no hay una agregación obvia de poliplexos, lo que demuestra la alta estabilidad de los poliplexos. Por el contrario, los poliplexos de PEI/ADN presentan una morfología elipsoide y el tamaño es mucho mayor que el de otros poliplexos.
- 25 Está ampliamente aceptado que los poliplexos con el tamaño < 250 nm y carga superficial moderadamente positiva son más favorables para la absorción celular, mientras que evitan inducir la posible citotoxicidad causada por el exceso de cargas positivas.^[7,9] Los estudios de transfección génica anteriores han demostrado que las mejores relaciones de p/p para la transfección de HPDF y 3T3 son 40 : 1 y 70 : 1, respectivamente. Esto indica que el tamaño de los poliplexos y la carga superficial más favorables para la transfección génica eficaz de fibroblastos pueden variar sustancialmente según los tipos de células. En este caso, en una amplia gama de relaciones de p/p, los poliplexos de LBPAE/ADN siempre tienen un tamaño promedio < 250 nm y un potencial zeta moderado, lo que demuestra su amplia aplicabilidad para la transfección de diversos tipos de células para lograr un alto rendimiento.
- 30

Ejemplo 4: Absorción celular de poliplejos de LBPAE/ADN

[00247] Se investigó más a fondo la absorción celular de los poliplejos. Tal como se muestra en la **FIGURA 5a**, con la misma densidad celular, 4 horas después de la transfección, todos los poliplejos muestran una gran eficiencia de absorción celular. Comparativamente, se absorbieron muchos más poliplejos de LBPAE/ADN mediante HPDF y 3T3 en comparación con los poliplejos de PEI/ADN y SuperFect/ADN, tal como lo demuestra la fluorescencia roja mucho más fuerte observada en el ADN marcado con Cy3. La cuantificación por citometría de flujo revela que los poliplejos de PEI/ADN y SuperFect/ADN alcanzan una eficiencia de absorción celular de 96,5 % y 98,4 % en el HPDF (**FIGURA 5b**). Aun así, la eficiencia de absorción de los poliplejos de LBPAE/ADN es todavía ligeramente superior y es casi de 100 % (99,3 %). En los 3T3, también se observó una tendencia similar (**FIGURA 5c**). Además, en los HPDF, la MFI normalizada de los poliplejos de LBPAE/ADN es de 3,05 y 1,39 veces mayor que la alcanzada por las contrapartes de PEI/ADN y SuperFect/ADN (**FIGURA 5d**). En los 3T3, el rendimiento extraordinario es de 1,98 y 1,68 veces, respectivamente (**FIGURA 5e**). Todos estos resultados indican que los poliplejos de PEI/ADN tienen la menor eficiencia de absorción celular, mientras que los poliplejos de LBPAE/ADN superan significativamente a las contrapartes de PEI/ADN y SuperFect/ADN. En conjunto, estos resultados de absorción se correlacionan muy bien con el tamaño de los poliplejos, el potencial zeta y el rendimiento de transfección génica anteriores de los diferentes poliplejos.

Ejemplo 5: Medición de la capacidad de amortiguación de protones

[00248] Los poliplejos basados en polímeros catiónicos suelen ser absorbidos por las células a través de la vía de la endocitosis, una vez internalizados, quedan atrapados principalmente en los endo/lisosomas. Si los poliplejos no pueden escapar de los compartimentos endo/lisomales a tiempo, el ADN condensado en los poliplejos podría degradarse mediante las enzimas digestivas en los compartimentos ácidos. Por lo tanto, el escape endo/lisosomal es otro cuello de botella importante que hay que superar para la administración eficaz de genes no virales. El «efecto de esponja de protones» se considera ampliamente el mecanismo principal de los polímeros catiónicos para facilitar que los poliplejos escapen de los endo/lisosomas. Dado el mecanismo del «efecto de esponja de protones», los polímeros catiónicos con alto contenido de aminos secundarias y terciarias protonables con una pK_a cercana al pH endosomal/lisosomal son más favorables para el escape de los poliplejos de los endo/lisosomas, PEI y SuperFect son los representantes más típicos.^[29] Para verificar la capacidad de amortiguación de protones de LBPAE, se realizó una titulación de ácido-base. Tal como se muestra en la **FIGURA 6a**, para la cantidad dada de polímeros disueltos en la solución de NaCl, no sorprende que

PEI muestra la capacidad de amortiguación de protones más fuerte con una pendiente relativamente más plana en la curva de titulación de ácido-base entre pH 7,4 y 5,1. Esto se debe al hecho de que PEI tiene un contenido muy alto de aminas primarias, secundarias y terciarias con cada tercer átomo de nitrógeno en la cadena principal. Después de la normalización, se halla que la capacidad de

5 amortiguación de protones de PEI, SuperFect y LBPAE es de $5,1 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$, $4,6 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$ y $1,6 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$, respectivamente (**Tabla 1**). De hecho, LBPAE presenta una menor capacidad de amortiguación de protones que PEI y SuperFect. Sin embargo, debido a la mucha menos citotoxicidad, para promover eficazmente el escape endo/lisosomal de los poliplexos de LBPAE/ADN, la relación de p/p puede aumentarse significativamente en la aplicación práctica. Por ejemplo, para la transfección

10 génica de HPDF y 3T3, los poliplexos de LBPAE/ADN se usaron en la relación de p/p de 40 : 1 y 70 : 1, respectivamente. En esta condición, la capacidad de amortiguación de protones del LBPAE total utilizado es de 12 y 21 veces mayor que la de PEI en la relación de p/p de 1 : 1, 5 y 8 veces mayor que la de SuperFect en la relación de p/p de 3 : 1. En función de la hipótesis del «efecto de esponja de protones», la alta capacidad de amortiguación de protones del LBPAE podría causar el aumento de la presión

15 osmótica, lo que provocaría la dilatación y ruptura de los endo/lisosomas y, por lo tanto, la liberación de los poliplexos de LBPAE/ADN hacia el citoplasma a tiempo y de manera eficiente.

Tabla 1. Capacidad de amortiguación de LBPAE y reactivos comerciales.

Polímero	Capacidad de amortiguación por masa ($\text{mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$)
LBPAE	1,6
PEI	5,1
SuperFect	4,6

20 **Ejemplo 6:** Evaluación de la degradación y liberación de ADN de LBPAE

[00249] Un vector de administración de genes versátil no solo puede condensar eficazmente el ADN y protegerlo de la degradación por parte de las enzimas, sino que también puede liberar el ADN condensado de los poliplexos después de la importación en el núcleo. Para los polímeros catiónicos, se han propuesto una serie de estrategias para promover la degradación del polímero en el citoplasma y

25 facilitar de ese modo la liberación de ADN y reducir la citotoxicidad acumulativa después de la transfección génica. Sin embargo, para una transfección génica eficiente, se requiere una semivida moderadamente larga para los vectores génicos porque una semivida demasiado corta provocará a una protección insuficiente del ADN y una liberación de ADN inmaduro, mientras que una semivida

demasiado larga podría producir dificultades en la disociación del poliplejo y la liberación de ADN. Hay múltiples enlaces éster en la cadena principal de los PAE. En condiciones fisiológicas, los enlaces éster pueden degradarse por hidrólisis para producir dioles y β -aminoácidos moleculares pequeños biocompatibles. Se informa que, dependiendo de la composición química, los LPAE tienen una semivida

5 que va de 1,5 horas a más de 6 horas en un ambiente acuoso.^[7] Para los LBPAE, de acuerdo con determinadas modalidades y ejemplos de la presente descripción, se observó una degradación de 43 % después de 2 horas de incubación a 37 °C. La degradación aumentó continuamente hasta 81 % y 85 % después de 6 horas y 8 horas de incubación, respectivamente (**FIGURA 6b**). La correspondiente liberación de ADN de los poliplejos se determina mediante el ensayo PicoGreen. Tal como se muestra

10 en la **FIGURA 6c**, en la relación de p/p más baja de 10 : 1, los poliplejos de LBPAE/ ADN tienen la velocidad de liberación de ADN más rápida, después de 2 horas de incubación, se había liberado > 60 % del ADN. Comparativamente, en las relaciones de p/p moderadas y altas de 40 : 1 y 70 : 1, el ADN condensado se liberó de los poliplejos a una velocidad más lenta pero similar. Sin embargo, después de 6 horas, se liberó > 60 % del ADN. El perfil de liberación de ADN coincide con el perfil de degradación

15 de LBPAE, lo que demuestra que LBPAE puede liberar el ADN condensado mediante hidrólisis de forma espontánea en condiciones fisiológicas sin necesidad de ningún desencadenante externo adicional. Todos los resultados de la condensación del ADN, la afinidad de unión, el tamaño del poliplejo, el potencial zeta, la absorción celular, la degradación y la liberación del ADN se correlacionan muy bien con la eficiencia de transfección génica y la biocompatibilidad de los poliplejos de LBPAE/ADN, lo que

20 destaca la manipulación de la composición de LBPAE, la estructura y la funcionalidad para lograr propiedades favorables de los poliplejos para la transfección génica de alto rendimiento en fibroblastos.

Ejemplo 7: LBPAE administra COL7A1 funcional para manipular la expresión de C7 en HPDF

[00250] Se ha demostrado que los LBPAE multifuncionales de acuerdo con determinadas modalidades

25 y ejemplos de la presente descripción son capaces de administrar ADN de Gluc y ADN de GFP para transfectar HPDF y 3T3 con una eficiencia ultra alta y una excelente biocompatibilidad. Sin embargo, muchos vectores de administración de genes muestran un alto nivel de expresión del gen indicador, la traducción de dicho éxito para producir la expresión de una proteína funcional es mucho más desafiante. Por tanto, la eficacia de LBPAE se evaluó adicionalmente mediante la administración de un gen COL7A1

30 funcional para promover la expresión de C7 en HPDF. Actualmente, no existe una cura eficaz disponible más allá de los cuidados paliativos para la RDEB. Aunque tanto los queratinocitos como los fibroblastos dérmicos son capaces de producir y secretar C7,^[35] estos últimos son más sólidos que los primeros como tipos de células diana en la terapia génica de enfermedades de genodermatosis.^[21,36] Los casetes de

ADN en minicírculo (MC) han mostrado una expresión transgénica no integradora 10-1000 veces más alta y más estable que los plásmidos normales sin el riesgo de respuestas inmunogénicas de la cadena principal bacteriana en los plásmidos estándar.^[37,38] Teniendo en cuenta que el gen COL7A1 es bastante grande con una transcripción de ADNc/ARNm de alrededor de 9 kb, se usó MCC7 que codificaba el ADNc de COL7A1 de longitud completa de 8,9 kb con el promotor del citomegalovirus para transfectar los HPDF. Tal como se muestra en la **FIGURA 12**, el MCC7 contiene ADNc de COL7A1 de 8,9 kb y una cadena principal de 3 kb, 2 kb menos que el plásmido original pcDNA3.1COL7A1. Cabe señalar que el tamaño máximo de carga de los vectores de retrovirus y virus adenoasociados (AAV) suele ser inferior a 8 kb,^[39] tanto el tamaño de ADNpc3.1COL7A1 como MCC7 supera la capacidad de empaquetamiento de genes de la mayoría de los vectores virales, por lo tanto, la transfección eficaz del gen COL7A1 mediante LBPAE tendrá gran importancia para la terapia génica de RDEB. Al combinar el ADN de MC y LBPAE, en la presente, se administra MCC7 para manipular la expresión de C7 en HPDF con la expectativa de mejorar su utilidad en la terapia génica de RDEB. La **FIGURA 7a** expone imágenes de citoinmunofluorescencia de los HPDF cuatro días después de la transfección con los poliplejos de LBPAE/MCC7. Como se esperaba, no se observó una expresión obvia de C7 (fluorescencia roja) en el grupo no tratado y el grupo solo se incubó con el anticuerpo secundario anti-C7. El HPDF de tipo salvaje y el grupo tratado con SuperFect presentan una fluorescencia moderada, lo que indica la producción de C7. En contraste, el HPDF transfectado con los poliplejos de LBPAE/MCC7 mostró la fluorescencia más fuerte, lo que demuestra más expresión de C7 recombinante obtenida por LBPAE. Además, se usó citometría de flujo para cuantificar la eficiencia de expresión de C7. De acuerdo con informes anteriores,^[40] el tipo salvaje de HPDF mostró un porcentaje de expresión de C7 de alrededor de 41 %. Después de la transfección con los poliplejos de LBPAE/MCC7, la eficiencia de expresión de C7 aumentó significativamente a 74,4 %, en comparación con 44,9 % alcanzada por los poliplejos de SuperFect/MCC7 (**FIGURA 7b**). Además, los poliplejos de LBPAE/MCC7 también alcanzaron una mejora de 40 % en la MFI, en contraste a 10 % alcanzada por las contrapartes de SuperFect/MCC7 (**FIGURA 7c**). Todos estos resultados demuestran que LBPAE no solo puede administrar MCC7 de manera eficaz para aumentar la población general de HPDF que expresan C7, sino también puede mejorar el nivel de C7 en los HPDF individuales. Además, el estudio preliminar de la presente mostró que en los fibroblastos de RDEB nulos para C7 (RDEBF), después de la transfección con LBPAE/MCC7, la eficiencia de expresión de C7 se reestableció a alrededor de 40 %, una mayor optimización de la transfección y cuantificación de la expresión de C7 en RDEBF todavía están en proceso. Estos hallazgos indican que LBPAE tiene una gran capacidad de carga útil para administrar el ADNc grande en las células primarias de la piel. Los fibroblastos dérmicos primarios pueden modificarse, además, mediante

este vector polimérico para secretar un potente C7 celular que es fundamental para fortalecer la unión dermoepidérmica. Aunque la terapia génica no viral requiere aplicaciones repetidas, para las enfermedades de la piel con disfunción genética C7, dados los sitios aparentes de las heridas y la buena accesibilidad a los medicamentos, las administraciones tópicas múltiples son mucho más seguras que las administraciones sistémicas de genes, por lo tanto, LBPAE es muy prometedor para las terapias génicas basadas en fibroblastos para el restablecimiento o la mejora de la expresión de C7 y, de ese modo, revertir el fenotipo de enfermedad de RDEB.

Ejemplo 8: Experimentos

[00251] *Materiales:* Se adquirió triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA), 5-amino-1-pentanol (AP), 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (DATOU), cloruro de sodio (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH), polietilenimina ramificada (PEI, $M_w = 25$ kDa), bromuro de litio (LiBr), dimetilsulfóxido (DMSO), éter dietílico, cloroformo deuterado ($CDCl_3$), solución de ácido clorhídrico (HCl), solución de sal balanceada de Hank (HBSS), amortiguador de acetato de tris-EDTA (TAE), solución de tripsina EDTA (0,25%), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina-estreptomicina (P/S), agarosa, paraformaldehído (PFA), Triton X-100 al 0,1 %, anticuerpo monoclonal anti-colágeno VII producido en suero de ratón, de Sigma-Aldrich. Se diluyó acetato de sodio (3,0 M, Sigma-Aldrich) hasta 0,025 M antes de su uso. Se adquirió diacrilato de 1,4-butanodiol (BDA) de VWR y se usó tal como se recibió. Se adquirió dimetilformamida (DMF) de Fisher Scientific. El suero fetal bovino (FBS) adquirido de Gibco se filtró a través de un filtro de 0,2 μm antes de su uso. Se adquirieron células HPDF y 3T3 de Lonza y ATCC, respectivamente. Para el cultivo y subcultivo de HPDF, se adquirió medio basal de fibroblastos, FGM-2 SingleQuots, Clonetics Reagent Pack que incluye solución salina amortiguada con HEPES, solución de tripsina EDTA (0,25 %) y solución neutralizante de tripsina, de lonza. Se adquirió plásmido de luciferasa de *Gaussia princeps* secretado por células (ADN de GLuc) y el kit de ensayo de luciferasa de *Gaussia BioLux*TM de New England Biolabs UK. La expansión y purificación del ADN de Gluc se realizó mediante el uso de el kit Giga-Prep (Qiagen) según los protocolos. El plásmido de proteína fluorescente verde (ADN de GFP) se adquirió de Aldevron. El plásmido pcDNA3.1COL7A1 fue amablemente proporcionado por el Dr. Andrew South de la Universidad de Dundee (Reino Unido). MCC7 se construyó mediante la inserción de la secuencia de COL7A1 originada a partir del pcDNA3.1COL7A1 en el casete MN511A-1 ofrecido por System Biosciences, la producción de ADN en minicírculo se realizó de acuerdo con el manual de usuario de System Bioscience. El reactivo de transfección génica SuperFect se adquirió de Qiagen. El kit de citotoxicidad/viabilidad de VIVAS/MUERTAS, el anticuerpo secundario altamente adsorbido de forma cruzada de cabra anti-IgG de ratón (H+L), Alexa Fluor 568 y Alexa Fluor 647 adquirieron de Thermo Fisher Scientific. El kit de ensayo de Alamarblue, la tinción en

gel de ADN seguro para SYBR, el amortiguador de fijación IC y el amortiguador de permeabilización Bioscience 10× se adquirieron de Invitrogen. El kit de marcado de ADN de Cy3 se adquirió de Mirus y se usó según los protocolos. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el kit de ensayo de PicoGreen se adquirieron de Life Technologies y se usaron según los protocolos de los fabricantes. La solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de Dulbecco 1× se adquirió de Life Technologies. El medio de montaje con DAPI se adquirió de Abcam.

[00252] *Síntesis y caracterización de LBPAE*: LBPAE se sintetizó mediante una estrategia de combinación de oligómeros lineales. En primer lugar, se disolvió BDA y AP con una relación estequiométrica de 1,2 : 1 en DMSO a 100 mg mL⁻¹ y luego se hizo reaccionar a 90 °C. Se usó cromatografía de permeación en gel Agilent 1260 Infinite (GPC) equipada con un detector triple ((un detector de índice de refracción (RI), un detector viscosímetro (VS DP) y un detector de dispersión de luz doble (LS 15° y LS 90°)) para monitorear el crecimiento del peso molecular promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en número (M_n), i el índice de polidispersión (PDI). Para las mediciones de GPC, se tomó 20 µL de la mezcla de reacción y se diluyó en 1 mL de DMF, y luego se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se utilizó DMF con LiBr al 0,1 % para eluir las columnas de GPC (Polar Gel-M, 7,5 × 300 mm, dos en serie) a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ a 60 °C. Se utilizaron estándares lineales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) para la calibración de las columnas de GPC. Cuando M_w se acercó a 3000 Da, la reacción se detuvo mediante enfriamiento hasta temperatura ambiente y se diluyó con DMSO, y luego, se agregó un exceso de agente de casquete de extremo DATOU, la reacción se continuó durante otras 48 horas para producir el oligómero lineal A2-C2 con casquete de DATOU en el extremo, que se purificó mediante diálisis con acetona durante tres días y, luego, se secó en horno de vacío para retirar el solvente. A continuación, el oligómero lineal A2-C2 se disolvió en DMSO y se hizo reaccionar con el monómero de ramificación TMPTA a 90 °C. Cuando el M_w fue de alrededor de 10 kDa, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregó un exceso de DATOU para consumir todos los grupos vinilo sin reaccionar durante otras 48 horas. A continuación, el polímero se purificó mediante precipitación con éter dietílico tres veces, se liofilizó durante dos días y se almacenó a -20 °C para estudios adicionales. Para medir el peso molecular (M_w), la PDI y el valor alfa (α) del gráfico de Mark-Houwink (MH) del producto final, se disolvieron 10 mg de LBPAE en 2 mL de DMF y se llevó a cabo la medición de GPC tal como se mencionó anteriormente. La composición química y la pureza de LBPAE se determinaron con ¹H NMR en un espectrómetro Varian Inova de 400 MHz. La muestra se expresó en partes por millón (ppm) en relación con el solvente CDCl₃ (7,24 ppm) o el control interno (tetrametilsilano 0,00 ppm).

[00253] *Determinación del parámetro alfa de Mark-Houwink*: La determinación de los parámetros alfa

de Mark-Houwink de los polímeros se realizó en un sistema de GPC 1260 Infinite con un detector de índice de refracción (RI), un detector viscosímetro (VS DP) y un detector de dispersión de luz de doble ángulo (LS 15° y LS 90°). Para preparar los polímeros para el análisis, se disolvieron muestras de 10,0 mg en 2 mL de DMF y luego se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. Las columnas de GPC (30 cm PLgel Mixed-C, dos en serie) se eluyeron con DMF y LiBr al 0,1 % a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 60° C. Las columnas se calibraron con estándares lineales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Los datos de GPC se analizaron mediante calibración universal.

[00254] Preparación de poliplejos de LBPAE/ADN: Para la preparación de poliplejos, en primer lugar, se disolvió LBPAE en DMSO hasta una solución madre de 100 mg mL⁻¹. De acuerdo con la relación en peso de LBPAE/ADN (p/p), la cantidad necesaria de solución madre de LBPAE y solución de ADN se diluyó con amortiguador de acetato de sodio (0,025 M, pH = 5,2) hasta un volumen equivalente, respectivamente. Y luego, la solución de LBPAE se agregó a la solución de ADN, se mezcló con vórtex durante 10 segundos y se mantuvo sin alterar durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del poliplejo.

[00255] Condensación de ADN mediante LBPAE: Se usó electroforesis en gel de agarosa para determinar la capacidad de condensación de ADN de LBPAE. Se usó 1 µg de ADN para la preparación de cada muestra, se prepararon poliplejos con una serie de relaciones de p/p, tal como se indicó anteriormente. Después de eso, se cargaron 20 µL de la solución de poliplejo en los pocillos en el gel de agarosa (1 % en amortiguador TAE 1x) que contenía 10 µL de tinción de gel de ADN seguro para SYBR, se usó ADN sin tratamiento como control. Se realizó electroforesis en gel en amortiguador TAE 1x a 120 V durante 40 minutos y se capturaron imágenes mediante el uso de G:BOX de Syngene.

[00256] Afinidad de unión al ADN de LBPAE: Se usó el ensayo PicoGreen para cuantificar la afinidad de unión al ADN de LBPAE. Se usó 0,25 µg de ADN para la preparación de cada muestra. Se prepararon poliplejos con relaciones de p/p diferentes en 15 µL de amortiguador de acetato de sodio y, luego, se mezclaron con 15 µL de solución de trabajo PicoGreen y se incubaron durante cinco minutos. Posteriormente, se agregaron 220 µL de amortiguador PBS 1x para diluir los poliplejos en una placa negra de 96 pocillos. La intensidad de fluorescencia (F) de la solución de poliplejo se midió mediante un lector de placas SpectraMax M3 con la excitación a 490 nm y la emisión a 535 nm por cuádruplicado. La afinidad de unión al ADN de LBPAE se definió mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Afinidad de unión al ADN}(\%) = \left(1 - \frac{F_{\text{Muestra}} - F_{\text{En blanco}}}{F_{\text{ADN}} - F_{\text{En blanco}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

[00257] Capacidad de amortiguación de protones de LBPAE: La capacidad de amortiguación de protones de LBPAE se determinó mediante titulación de ácido-base. Se utilizó una solución de NaCl 0,1 M como control de fondo, se utilizaron PEI y SuperFect como controles positivos. Se usó un medidor de

pH Mettler Toledo S20 para medir los valores de pH. Se disolvió 10 mg de LBPAE, 5 mg de PEI o 0,8 mg de SuperFect en 20 mL de solución de NaCl 0,1 M. Los valores de pH de la solución se ajustaron a 3,0 con solución de HCl 1,0 M, y luego se tituló a 10,5 mediante el uso de una solución de NaOH 0,1 M.

La capacidad de amortiguación de protones de LBPAE (mmol g^{-1}) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{[00258] Capacidad de amortiguación de protones (mmol g}^{-1}\text{)} = \frac{1,0 \times V_{\text{HCl amortiguado desde pH 5,1-7,4}}}{\text{Masa del polímero}} \quad (2)$$

[00259] Perfil de degradación de LBPAE: Para medir el perfil de degradación, se disolvió LBPAE en PBS a una concentración de 10 mg mL^{-1} y se mantuvo en agitación a 180 rpm por debajo de 37°C . En los puntos temporales de 0, 2, 4, 6 y 8 horas, se sacó 1 mL de la solución y se congeló inmediatamente.

Después de liofilizarse, la muestra se disolvió en 1 mL de DMF. El M_w de la muestra se midió mediante GPC tal como se mencionó anteriormente por triplicado. El porcentaje de degradación de LBPAE se definió de la siguiente manera:

$$\text{Velocidad de degradación del ADN (\%)} = \left(1 - \frac{M_{w.\text{actual}}}{M_{w.\text{original}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

[00260] Determinación del tamaño y el potencial zeta de los poliplexos: Los tamaños y potenciales zeta de los poliplexos se midieron mediante el uso de Malvern Instruments Zetasizer (Nano-ZS90, ángulo de dispersión 173° , 633 nm de láser). Se usó $4 \mu\text{g}$ de ADN para la preparación de cada muestra, los poliplexos con una serie de relaciones de p/p se prepararon tal como se mencionó anteriormente y se diluyeron con $800 \mu\text{L}$ de agua desionizada, y luego se transfirieron a celdas o cubetas de Zetasizer. Las medidas de tamaño y potencial zeta se llevaron a cabo a 25°C por cuadruplicado.

[00261] Caracterización de la morfología de los poliplexos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM): Las morfologías de los poliplexos de LBPAE/ADN, PEI/ADN y SuperFect/ADN se caracterizaron mediante TEM. Se preparó $80 \mu\text{L}$ de solución de poliplexo que contenía $2 \mu\text{g}$ de ADN, tal como se indicó anteriormente, se lavó con agua desionizada dos veces para retirar las sales y, luego, se resuspendió en $10 \mu\text{L}$ de agua desionizada. Se vertió $2,5 \mu\text{L}$ de la solución de poliplexo resuspendida sobre una película de soporte Formvar en rejillas de cobre de 200 mesh y se liofilizó inmediatamente. Se capturaron imágenes de TEM en un FEI Tecnai 120 TEM a 120 kV en UCD Conway Imaging Core Centre.

[00262] Liberación de ADN de los poliplexos: La liberación de ADN de los poliplexos puede determinarse al medir la reducción de la afinidad de unión por parte de LBPAE mediante el uso del ensayo PicoGreen. Se prepararon poliplexos de LBPAE/ADN con las relaciones de p/p de 10 : 1, 40 : 1 y 70 : 1, tal como se indicó anteriormente, y se mantuvieron en agitación a 180 rpm y 37°C . En los puntos de tiempo de 0, 2, 4, 6 y 8 horas, se extrajeron $100 \mu\text{L}$ de la solución de poliplexos y se midió la afinidad de unión al ADN

inmediatamente, tal como se indicó anteriormente, por cuadruplicado. La velocidad de liberación de ADN de los poliplejos se determinó de la siguiente manera:

$$\text{[00263] Velocidad de liberación de ADN(\%)} = \frac{F_{\text{Muestra}} - F_{\text{En blanco}}}{F_{\text{ADN}} - F_{\text{En blanco}}} \times 100 \quad (4)$$

[00264] Cultivo celular: Se cultivaron HPDF en medio basal de fibroblastos y se complementaron con FGM-2 SingleQuots que contenía FBS al 2 %. Se cultivaron 3T3 en DMEM que contenía FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina (P/S) al 1 %. Ambos tipos de células se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5 % en una incubadora húmeda en condiciones estándar de cultivo celular.

[00265] Capacidad de transfección génica de LBPAE cuantificada mediante expresión de Gluc: La capacidad de transfección génica de LBPAE en HPDF y 3T3 se evaluó, en primer lugar, con la expresión de Gluc mediante el uso de ADN de Gluc como gen indicador. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células por pocillo para 3T3 y 2×10^4 células por pocillo para HPDF en 100 μL de medio y se incubaron durante un día antes de la transfección. Los reactivos comerciales de transfección génica PEI y SuperFect se optimizaron según los protocolos de los fabricantes. Para ello, se usó 0,5 μg de ADN de Gluc para cada pocillo, la relación de p/p para los poliplejos de PEI/ADN varió de 1 : 1, 2 : 1 a 3 : 1, la relación de p/p para los poliplejos de SuperFect/ADN varió de 3 : 1, 6 : 1 a 9 : 1. Para la transfección génica de LBPAE, se usó la misma cantidad de 0,5 μg de ADN de Gluc para cada pocillo, se prepararon poliplejos de LBPAE/ADN con relaciones de p/p diferentes en 20 μL de amortiguador de acetato de sodio, tal como se mencionó anteriormente, y luego, se diluyeron con 80 μL de medio de cultivo celular. Se retiró el medio de cultivo celular de las placas de 96 pocillos y se agregó 100 μL de medio que contenía poliplejos. 4 horas después, el medio que contenía poliplejos en las placas se reemplazó con 100 μL de medio fresco, las células se incubaron durante otras 44 horas. La actividad de Gluc de las células después de la transfección se midió con el ensayo de Gluc según protocolos estándar por cuadruplicado. En resumen, se extrajeron 20 μL del sobrenadante de las placas de 96 pocillos y se agregó 50 μL de la solución de ensayo de Gluc. Se midió la intensidad de la luminiscencia mediante el uso de un lector de placas SpectraMax M3 y la actividad de Gluc se graficó directamente en términos de unidades de luz relativas (RLU).

[00266] Capacidad de transfección génica de LBPAE cuantificada mediante expresión de GFP: Se evaluó adicionalmente la capacidad de transfección génica de LBPAE con expresión de GFP. Las células HPDF y 3T3 se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo en 500 μL de medio y se incubó durante un día antes de la transfección. Se usó 2 μg de ADN de GFP para cada pocillo, se prepararon poliplejos con relaciones de p/p diferentes en 100 μL de amortiguador de acetato de sodio, y luego, se mezclaron con 400 μL de medio de cultivo celular. Se retiró el medio de las células y se agregó medio que contenía los poliplejos. 4 horas después, el medio

que contenía poliplejos se reemplazó con 500 μ L de medio fresco, y las células se incubaron durante otras 44 horas. Después de eso, las células se lavaron con HBSS y se obtuvieron imágenes con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81). Para cuantificar la expresión de GFP con citometría de flujo, las células transfectadas se digirieron con tripsina EDTA y se lavaron con HBSS dos veces, y luego se resuspendieron en PBS con FBS al 2 %. Las mediciones de citometría de flujo se llevaron a cabo en un sistema Accuri C6 por triplicado, se contaron al menos 10 000 células para cada muestra. La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células se cuantificó con el software Flowjo. Las células transfectadas con PEI y SuperFect se usaron como controles positivos, las células no tratadas se usaron como control negativo.

[00267] *Viabilidad celular medida con el ensayo de Alamarblue*: Se midió la viabilidad de las células HPDF y 3T3 después de la transfección con el ensayo Alamarblue. Con este fin, 48 horas después de la transfección, se retiraron los sobrenadantes celulares y las células se lavaron con HBSS dos veces. Y luego, se agregó 10 % de solución de Alamarblue en HBSS y las células se incubaron durante otras 1-3 horas. Posteriormente, la solución de Alamarblue de los pocillos se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se midió la intensidad de la fluorescencia a 590 nm mediante el uso de un lector de placas SpectraMax M3 por cuadruplicado. Las células sin ningún tratamiento con poliplejo se utilizaron como control positivo, la intensidad de la fluorescencia se normalizó como 100 % de la viabilidad celular.

[00268] *Perfil toxicológico de LBPAE*: El perfil toxicológico de LBPAE se determinó mediante evaluaciones de la concentración letal 50 (LC_{50}). Se utilizó el kit de citotoxicidad/viabilidad de VIVAS/MUERTAS para teñir las células vivas y muertas. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 2×10^4 por pocillo para HPDF y 1×10^4 por pocillo para 3T3 en 100 μ L de medio. Al día siguiente, se prepararon poliplejos de LBPAE/ADN y poliplejos de SuperFect/ADN, se usaron cinco dosis diferentes de los poliplejos para transfectar las células tal como se mencionó anteriormente. 24 horas después de la transfección, se retiró el medio de cultivo celular y se reemplazó con HBSS que contenía calceína-AM (C-AM) (1 : 5000) y homodímero de etidio-1 (EthD-1) (1 : 500), las células se incubaron durante otros 20 minutos. Y luego, las células se lavaron con HBSS y se obtuvieron imágenes con microscopía de fluorescencia (Olympus IX81). La viabilidad celular cuantificada con el ensayo Alamarblue® por cuadruplicado se utilizó para el cálculo de LC_{50} .

[00269] *Absorción celular de poliplejos*: Para los estudios de absorción celular de poliplejos, el ADN de Gluc se marcó con un kit de marcado de Cy3 (un tinte fluorescente rojo) según el protocolo recomendado. Los fibroblastos se sembraron en una placa de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo. Se usó 0,5 μ g de ADN marcado para cada pocillo, la transfección génica se llevó a cabo el día siguiente tal como se mencionó anteriormente. 4 horas después de la transfección, las células se lavaron con HBSS, se fijaron con PFA al 4 %, se permeabilizaron con triton-100 al 0,1 %, se tiñeron

con DAPI y, luego, se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81). Para cuantificar la eficiencia de absorción celular con citometría de flujo, después de la transfección, las células se digirieron con tripsina EDTA y se lavaron con HBSS dos veces, y luego, se resuspendieron en PBS con FBS al 2 %, se cuantificó el porcentaje de células positivas para Cy3 y la MFI en un sistema de citometría de flujo Accuri C6 por triplicado.

[00270] *Detección de la expresión de C7 en HPDF mediante tinción de citoimmunofluorescencia:* Para detectar la expresión de C7 con tinción de citoimmunofluorescencia, se sembraron HPDF en cámaras de 8 pocillos (Ibidi) con una densidad de $1,5 \times 10^4$ células por pocillo. Al día siguiente, se usó 1 μ g de MCC7 para cada pocillo, la transfección génica se llevó a cabo tal como se mencionó anteriormente mediante el uso de poliplejos de LBPAE/ADN en la relación de p/p de 40 : 1 y poliplejos de SuperFect/ADN en la relación de p/p de 3 : 1. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron con PFA al 4 %, se permeabilizaron con triton-100 al 0,1 %, se bloqueó con suero de cabra al 5 % en 1x PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego, se incubó con anticuerpo primario de anti-colágeno monoclonal y anticuerpo de tipo VII producido en ratones en amortiguador de bloqueo (dilución de anticuerpos: 1 : 200) a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las células se incubaron con anticuerpo secundario altamente adsorbido de forma cruzada de cabra anti-IgG de ratón (H+L), Alexa-568, con una dilución de 1 : 800 durante 1 hora en la oscuridad y DAPI a temperatura ambiente. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron mediante el uso de un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81). Las células sin tratamiento de anticuerpos y tratadas solo con anticuerpo secundario se utilizaron como grupos de control.

[00271] *Expresión de C7 en HPDF cuantificada mediante citometría de flujo:* Para cuantificar la expresión de C7 con citometría de flujo, se sembraron HPDF en una placa de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo y se transfectaron 24 horas después. Se usó 2 μ g de MCC7 para cada pocillo y la transfección se llevó a cabo tal como se indicó anteriormente mediante el uso de poliplejos de LBPAE/ADN en la relación de p/p de 40 : 1 y poliplejos de SuperFect/ADN en la relación de p/p de 3 : 1. Cuatro días después de la transfección, las células se digirieron con tripsina EDTA, se fijaron con el amortiguador de fijación IC (PFA al 2 %), se permeabilizaron con el amortiguador de permeabilización (1x PBS/BSA al 1 %/Saponina al 0,1 %) y se bloquearon en suero de cabra (10 % en solución de permeación), y luego, se incubaron con el anticuerpo primario de anti-colágeno monoclonal y tipo VII producido en ratones en el amortiguador de bloqueo con una dilución de 1 : 50 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron adicionalmente con el anticuerpo secundario adsorbido de forma cruzada de cabra anti-IgG de ratón (H+L), Alexa-647, con una dilución de 1 : 3000 en el amortiguador de permeación en la oscuridad. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo por triplicado. Las células sin

tratamiento de anticuerpos y tratadas solo con anticuerpo secundario se utilizaron como grupos de control.

[00272] Datos estadísticos: Se utilizó SPSS Statistics para la versión 24 de windows (IBM Corp., Armonk, N.Y., EE. UU.) para los análisis estadísticos. Se utilizó la prueba t de Student para analizar todos los datos de transfección génica, los datos se mostraron como promedio $\pm$ desviación estándar. Los valores de LC_{50} se calcularon mediante análisis de regresión lineal. El valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

[00273] Ejemplo 9: Poliplejos de HPAE que comprenden *COL7A1* para la administración de genes a queratinocitos de epidermólisis ampollosa distrófica recesiva

[00274] El siguiente ejemplo describe los resultados de la transfección para los poliplejos que comprenden *COL7A1* en minicírculo y cuatro poli(β -aminoésteres) altamente ramificados (HPAE) de la presente descripción que tienen pesos moleculares (M_w) de alrededor de 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa y 40 kDa y mediante el uso de relaciones en peso de HPAE: ADN de *COL7A1* de 10:1, 30:1 y 50:1.

[00275] Síntesis y caracterización de HPAE: Los HPAE se prepararon en dos etapas. En la etapa uno, los monómeros 5-amino-1-pentanol, triacrilato de trimetilolpropano, diacrilato de 1,4-butanodiol se hicieron reaccionar para proporcionar un C32 altamente ramificado (Poli(diacrilato de 5-amino-1-pentanol-co-1,4-butanodiol)) («HC32»). En la etapa dos, el HC32 se hizo reaccionar con 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (DATOU) para proporcionar HPAE («HC32-DATOU»).

[00276] Se sintetizaron cuatro polímeros HC32-DATOU con diferente peso molecular (MW) mediante la estrategia de adición de Michael «A2+B3+C2». En primer lugar, se sintetizaron los polímeros base de HC32. Brevemente, se disolvió el monómero AP A2 (9,0 mmol, 0,923 g), el monómero TMPTA B3 (0,5 mmol, 0,148 g) y el monómero C C2 (10,0 mmol, 1,98 g) en 3,1 mL de DMSO, y luego, se hicieron reaccionar a 90 °C. Se usó cromatografía de permeación en gel (GPC) para monitorear el crecimiento del MW y el índice de polidispersión (PDI). Se tomaron 20 μ L de la muestra de reacción en diferentes puntos temporales, seguido por dilución en 1 mL de DMF y filtraron a través de un filtro de 0,2 μ m antes de la medición de GPC en un GPC Agilent 1260 Infinite equipado con un detector triple: un detector de índice de refracción (RI), un detector viscosímetro (VS DP) y un detector de dispersión de luz doble (LS 15° y LS 90°). Se utilizó DMF y LiBr al 0,1 % para eluir la columna de GPC (PolarGel-M, 7,5 $\times$ 300 mm, dos en serie) a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 60 °C. Las columnas de GPC se calibraron con los estándares lineales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA).

[00277] Cuando el peso molecular promedio en peso (M_w) del polímero base se acercaba a los valores objetivo (alrededor 10, 20, 30 y 40 kDa, respectivamente), se detuvo la reacción mediante la dilución de la solución de reacción en DMSO hasta 100 mg/mL. Posteriormente, el agente de casquete de extremo DATOU (10,0 mmol, 1,92 g) se disolvió en DMSO (100 mg/ mL) para colocar un casquete en el extremo

de los polímeros base HC32 a través de adición de Michael a temperatura ambiente (TA) durante 48 h para obtener los polímeros HC32-DATOU, que se purificaron mediante precipitación con dietilo dos veces para retirar el exceso de monómeros, oligómeros y agente de casquete de extremo.

[00278] Los productos finales de HC32-DATOU se secaron en un horno de vacío durante 24 h, y luego, se liofilizaron durante otras 24 h para retirar los solventes residuales. Para medir el MW y PDI de los productos finales, se disolvieron 10 mg de muestra en 1 mL de DMF y se realizaron mediciones de GPC, tal como se mencionó anteriormente. Se usó resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR) para confirmar las composiciones químicas y la pureza de los polímeros HC32-DATOU, que se disolvieron en CDCl_3 y se adquirió el espectro de ^1H NMR en un espectrómetro de Varian Inova 400 MHz. La muestra se expresó en partes por millón (ppm) en relación con el solvente (7,24 ppm) o el control interno (tetrametilsilano 0,00 ppm).

[00279] La **Figura 13** muestra que al aumentar el tiempo de polimerización de los polímeros base, se obtuvieron cuatro polímeros HC32-DATOU con diferentes M_w . El M_w de HC32-DATOU aumentó de 11 kDa a 41 kDa sin gelificación, lo que demuestra la gran flexibilidad de la estrategia de adición de Michael «A2+B3+C2» para controlar el MW de HAPE. Los valores alfa del gráfico de MH de todos los polímeros HC32-DATOU son inferiores a 0,5 (**Figura 13c**), lo que indica sus estructuras altamente ramificadas. La siguiente tabla muestra los valores alfa del gráfico de MH y PDI para los polímeros HC32-DATOU

M_w (kDa)	PDI	valores alfa
11	3,4	0,44
21	6,3	0,38
34	8,5	0,29
41	12,9	0,33

[00280] Biosíntesis de MCC7.

[00281] Se obtuvo el plásmido pcDNA3.1COL7A1 regular. MCC7 se biosintetizó mediante la inserción de la secuencia de COL7A1 originada a partir de pcDNA3.1COL7A1 en el casete de MN511A-1 ofrecido por System Biosciences con un promotor del citomegalovirus, la inducción y producción de ADN en minicírculo se llevó a cabo de acuerdo con el manual del usuario de System Bioscience y el sistema publicado de digestión de phiC31 con 1-SceI de la tecnología de minicírculos (Gaspar, V.; de Melo-Diogo, D.; Costa, E.; Moreira, A.; Queiroz, J.; Pichon, C.; Correia, I.; Sousa, F. Minicircle DNA Vectors for Gene Therapy: Advances and Applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15* (3), 353–379. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.996544>). Para confirmar la biosíntesis de MCC7, se llevó a cabo un estudio de digestión de ADN. Para ello, se digirió 0,5 μg de pcDNA3.1COL7A1, plásmido original (MN511A-1-COL7A1) y MCC7 con 1 μL de EcoRI y luego se sometió a electroforesis en gel de agarosa

en gel a 100 V durante 40 minutos. Luego, las imágenes se visualizaron mediante el uso de un G:BOX de Syngene.

[00282] Preparación y formulación de poliplexos

[00283] Se disolvió HC32-DATOU en DMSO hasta una solución madre de 100 µg/µL que se almacenó a -20 °C para los siguientes estudios. El ADN se disolvió en amortiguador TE y también se almacenó a -20 °C. Se diluyó amortiguador SA hasta 0,025 M antes de su uso.

[00284] Para la preparación estándar de los poliplexos, de acuerdo con la relación en peso de polímero/ADN (p/p), el ADN y el polímero se disolvieron en el amortiguador SA hasta un volumen equivalente, respectivamente. La solución de polímero se agregó a la solución de ADN, se mezcló durante 10 segundos mediante el uso de vórtice y se incubó durante otros 10 minutos a TA para permitir la formación del poliplexo. Para el estudio de formulación, típicamente, se disolvieron 5 µg de ADN de plásmido con GFP y 150 µg de HC32-DATOU en 200 µL de SA, respectivamente, para formular los poliplexos de HC32-DATOU/ADN (p/p = 30:1). Los poliplexos se usaron inmediatamente como frescos o se almacenaron a TA, 4 °C, -20 °C y -80 °C, o se liofilizaron antes de la transfección.

[00285] Para la liofilización, se agregó sacarosa a la solución de poliplexo hasta concentraciones finales de sacarosa de 0 %, 1 %, 3 % y 5 %, respectivamente. Todas las muestras se congelaron a -80 °C durante 1 h y luego se sometieron inmediatamente a liofilización con un liofilizador Christ Alpha 1-2 LDplus a -55 °C durante 24 h. Posteriormente, los poliplexos se reconstituyeron con el volumen original de SA y se utilizaron para la transfección.

[00286] Después de la optimización del procedimiento de formulación de poliplexos (véase el Ejemplo 10, a continuación), se usó HC32-DATOU en complejo con ADN que codifica Gluc almacenado en condiciones diferentes para evaluar la viabilidad del almacenamiento a largo plazo de los poliplexos antes de las aplicaciones de transfección. En este caso, se usó 0,5 µg de ADN en una relación de p/p de 30:1 de polímero/ADN para cada pocillo en placas de 96 pocillos.

[00287] Estudios de condensación de ADN y liberación de heparina

[00288] Para evaluar la capacidad de condensación del ADN de HC32-DATOU y la estabilidad física de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN, se realizó un ensayo de condensación de ADN y un ensayo de liberación de heparina mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa. Se usó 0,5 µg de ADN (MCC7) para cada muestra y se prepararon poliplexos en la relación de p/p de 30:1. Se agregó solución de heparina acuosa en la solución de poliplexo con una concentración que aumentó de 0,1-6 IU/µL. Como controles se usaron ADN sin tratamiento y poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 sin heparina. Todas las muestras se incubaron a TA durante 2 h y luego se cargaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con 10 µL tinción de ADN segura para SYBR. La electroforesis se realizó en 1 × de amortiguador TAE a 100 V durante 1 h.

[00289] Ensayo PicoGreen

[00290] Se utilizó el ensayo PicoGreen para cuantificar la afinidad de unión al ADN de HC32-DATOU y la liberación de ADN en presencia de heparina. Se prepararon poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 con 0,2 µg de ADN en la relación de p/p de 30:1, y luego, se introdujo heparina a la solución de poliplejo con la concentración de 0,3 IU/µL, 3 IU/µL y 6 IU/µL, respectivamente. Como controles se usaron ADN sin tratamiento y poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 sin heparina. Después de 2 h de incubación, todas las muestras se mezclaron con 10 µL de solución de trabajo de PicoGreen y se incubaron durante otros 5 minutos. Posteriormente, la solución de la mezcla se diluyó con agua desionizada hasta una concentración final de 1 µg/mL en una placa negra de 96 pocillos. Las mediciones de fluorescencia se realizaron mediante el uso de un lector de placas SpectraMax M3 con la excitación a 490 nm y la emisión a 535 nm por cuadruplicado. La eficiencia de liberación de ADN se cuantificó mediante la normalización de la intensidad de fluorescencia de las muestras al control de ADN sin tratamiento.

[00291] Mediciones de tamaño y potencial zeta de los poliplejos

[00292] El tamaño de los poliplejos se midió mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) mediante el uso de Nanosight NS300. Los poliplejos se prepararon mediante el uso de 0,5 µg de ADN con una relación de p/p de 30:1 en 10 µL de SA. A continuación, la solución de poliplejo se diluyó en 1 mL de agua destilada y luego se sometió a análisis NTA. Se grabó una película de 60 segundos que contenía el seguimiento del movimiento browniano de las partículas mediante el uso del software de NTA (Versión 3.2). Se evaluaron 10 pistas para cada muestra. Las mediciones del potencial zeta de los poliplejos se realizaron mediante el uso de Malvern Instruments Zetasizer (Nano-ZS90) en un ángulo del detector de dispersión de 90°.

[00293] Observación de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

[00294] La morfología de los poliplejos se caracterizó mediante TEM. Se centrifugaron 80 µL de solución de poliplejo con 2 µg de MCC7 en la relación de p/p de 30:1, y se desechó el sobrenadante, y luego, los poliplejos se lavaron adicionalmente con 80 µL de agua destilada dos veces para retirar el exceso de sales. Posteriormente, los poliplejos se resuspendieron hasta un volumen final de 10 µL de agua destilada. A continuación, se vertieron 2,5 µL de solución de poliplejo sobre películas de soporte Formvar en rejillas de cobre de 200 mesh, y se liofilizaron inmediatamente. Se capturaron imágenes en un FEI Tecnai 120 TEM a 120 kV en UCD Conway Imaging Core Center.

[00295] Cultivo celular

[00296] Se cultivaron células de RDEBK y queratinocitos humanos (NHK) en medio basal de células de queratinocitos (KBM-Gold) con el paquete de suplementos (KGM-Gold SingleQuots) y PS al 1 % en una incubadora húmeda con CO₂ al 5 % a 37 °C en condiciones estándar de cultivo celular.

[00297] Expresión de GFP y viabilidad celular

[00298] En primer lugar, se realizó la transfección del gen indicador de GFP para evaluar la eficiencia de la transfección génica de cuatro polímeros HC32-DATOU y seleccionar el candidato con mejor rendimiento. Se sembraron RDEBK en placas de 96 pocillos con una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Al día siguiente, se usó 0,5 µg de ADN de plásmido que codificaba GFP para cada pocillo. Se prepararon poliplejos de HC32-DATOU con diferentes M_w en relaciones de p/p de polímero/ADN de 10:1, 30:1 y 50:1 en 20 µL de SA, que se mezcló con 80 µL de medio de cultivo fresco como medio de transfección. 4 h después de la transfección, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco. 48 h después de la transfección, se visualizó la expresión de GFP de las células en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81). La viabilidad celular se midió con ensayo de Alamarblue. Se retiraron los sobrenadantes celulares, y luego, las células se incubaron con reactivo de Alamarblue al 10 % en HBSS durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la solución de Alamarblue se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano. La intensidad de fluorescencia se leyó mediante un lector de placas SpectraMax M3 con una excitación a 570 nm y emisión a 590 nm. La intensidad de la fluorescencia del grupo de células no tratadas se representó como 100 % viable. La viabilidad celular se midió por cuadruplicado y se calculó mediante la normalización de la intensidad de fluorescencia de la muestra a la del grupo no tratado. Se usó HC32-DATOU que muestra la mayor expresión de GFP y viabilidad celular para los siguientes estudios.

[00299] En los estudios de formulación (véase el Ejemplo 10, a continuación), se prepararon poliplejos de SuperFect/ADN en la relación de p/p de 3:1 de acuerdo con la publicación (Zeng, M.; Zhou, D.; Alshehri, F.; Lara-Sáez, I.; Lyu, Y.; Creagh-Flynn, J.; Xu, Q.; A, S.; Zhang, J.; Wang, W. Manipulation of Transgene Expression in Fibroblast Cells by a Multifunctional Linear-Branched Hybrid Poly(β-Amino Ester) Synthesized through an Oligomer Combination Approach. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 381–391. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b04098>. Theoharis, S.; Krueger, U.; Tan, P. H.; Haskard, D. O.; Weber, M.; George, A. J. T. Targeting Gene Delivery to Activated Vascular Endothelium Using Anti E/P-Selectin Antibody Linked to PAMAM Dendrimers. *J. Immunol. Methods* **2009**, *343* (2), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.12.005>.). Se prepararon poliplejos de lipofectamina 2000/ADN de acuerdo con el protocolo del fabricante (relación de volumen/peso de 2:1). La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) y las células positivas para GFP se cuantificaron mediante citometría de flujo en un sistema Accuri C6 por triplicado y se analizaron adicionalmente con el software Flowjo V10. se contaron 1×10^4 células para cada procesamiento.

[00300] Transfección del gen indicador de Gluc y viabilidad celular

[00301] El HC32-DATOU se evaluó adicionalmente en estudios de transfección del gen indicador de Gluc. Mediante el uso de 0,5 µg de ADN de plásmido que codifica Gluc para cada pocillo, se prepararon poliplejos de HC32-DATOU/ADN en las relaciones de p/p de 20:1, 30:1 y 40:1, respectivamente. De

acuerdo con publicaciones anteriores (Green, J. J.; Zugates, G. T.; Tedford, N. C.; Huang, Y.-H.; Griffith, L. G.; Lauffenburger, D. A.; Sawicki, J. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. Combinatorial Modification of Degradable Polymers Enables Transfection of Human Cells Comparable to Adenovirus. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (19), 2836–2842. <https://doi.org/10.1002/adma.200700371>. Huang, J.-Y.; Gao, Y.; Cutlar, L.; O’Keeffe-Ahern, J.; Zhao, T.; Lin, F.-H.; Zhou, D.; McMahon, S.; Greiser, U.; Wang, W.; et ál. Tailoring Highly Branched Poly(Beta-Amino Ester)s: A Synthetic Platform for Epidermal Gene Therapy. *Chem. Commun. (Camb)*. **2015**, *51* (40), 8473–8476. <https://doi.org/10.1039/c5cc02193f>. Zeng, M.; Zhou, D.; Ng, S.; Ahern, J. O.; Alshehri, F.; Gao, Y.; Pierucci, L.; Greiser, U.; Wang, W. Highly Branched Poly(5-Amino-1-Pentanol-Co-1,4-Butanediol Diacrylate) for High Performance Gene Transfection. *Polymers (Basel)*. **2017**, *9* (12), 161. <https://doi.org/10.3390/polym9050161>.), los poliplejos de PEI/ADN se prepararon en relaciones de p/p de 1:1, 2:1 y 3:1, respectivamente.

[00302] Se sembraron RDEBK y se llevó a cabo la transfección génica tal como se mencionó anteriormente. 48 h después de la transfección, para cuantificar la eficiencia de la transfección génica, se mezclaron 50 µL del sobrenadante celular con un volumen igual de solución de trabajo del ensayo de Gluc. La intensidad de fluorescencia de la mezcla se midió mediante el uso de un lector de placas SpectraMax M3 con una excitación a 485 nm y emisión a 525 nm. Los resultados de la actividad de Gluc se graficaron en términos de unidades de luz relativas (RLU). La viabilidad celular se midió tal como se mencionó anteriormente. Tanto la actividad de Gluc como los experimentos de viabilidad celular se determinaron por cuadruplicado.

[00303] Absorción celular de poliplejos

[00304] Se utilizaron kits de marcado de ADN Cy3 para marcar MCC7 de acuerdo con el protocolo estándar. Se sembraron RDEBK en placas de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células por pocillo. Al día siguiente, mediante el uso de 0,25 µg de MCC7 para cada pocillo, las células se transfectaron con poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 (p/p = 30:1) y PEI/MCC7 (p/p = 1:1) durante 4 h, y luego, se fijaron con PFA al 4 %, se permeabilizaron con triton-100 al 0,1 %, y se incubaron con DAPI a una concentración de trabajo de 1 µg/mL en HBSS. Se tomaron imágenes fluorescentes con un microscopio (Olympus IX81). Se cuantificó la MFI y la relación de células positivas para Cy3 mediante un sistema Accuri C6 por triplicado. Los resultados se analizaron adicionalmente con el software V10 Flowjo con 1×10^4 células contadas para cada medición.

[00305] Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR)

[00306] Se realizó RT-qPCR para cuantificar la expresión de ARNm de COL7A1. Se sembraron RDEBK en placas de 6 pocillos con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo un día antes de la transfección. Las células se transfectaron con poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 y PEI/MCC7 en complejo con 5 µg de ADN en relaciones de p/p de 30:1 y 1:1. Tres días después del tratamiento, se recolectaron las células

tratadas y no tratadas, y se sometieron a la purificación del ARN total. El trabajo de extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de RNeasy Mini Kit. A continuación, se usó 0,5 µg del ARN total de cada grupo para sintetizar el ADNc de la primera cadena. La transcripción inversa se realizó con el cebador Oligo(dT)₂₀ 50 µM de acuerdo con el protocolo de SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix. Posteriormente, se agregó 1 µL del producto de ADN complementario (ADNc) a 9 µL de la mezcla de reacción (0,5 µL de cebador TaqMan, 5 µL de mezcla de PCR TaqMan, 3,5 µL de agua sin RNasa) que se cargó en un pocillo de las placas de 384 pocillos. Cada muestra se midió por triplicado. Para la expresión génica cuantitativa de COL7A1, se utilizó GAPDH como control endógeno. Los valores de CT comparativos y los reactivos TaqMan, y el sistema QuantStudio 7 Flex se configuraron para los experimentos. Los resultados se analizaron con el software de PCR en tiempo real QuantStudio.

[00307] Tinción de citoimmunofluorescencia de C7

[00308] Se usó tinción de citoimmunofluorescencia para determinar la restauración de C7 de RDEBK después del tratamiento con los poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 y PEI/MCC7. Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células en cada cubreobjetos en una cámara de 8 pocillos (Ibidi). Se usó 1 µg de MCC7 para cada pocillo, los poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 y PEI/MCC7 se prepararon con la relación de p/p de 30:1 y 1:1, respectivamente. 3 días después de la transfección, las células se fijaron con PFA al 4 %, se permearon con Triton X-100 al 0,1 % y se bloquearon con suero de cabra al 5 % en 1 × DPBS durante 1 h a TA, y luego, se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpo anti-colágeno monoclonal de tipo VII producido en ratones) a 4 °C durante la noche con una dilución de anticuerpo de 1:200 en amortiguador de bloqueo. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón Alexa-568 (H+L) con una dilución de 1:800 en amortiguador de bloqueo). Después de los lavados finales, los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Fluoroshield con DAPI. Finalmente, se capturaron imágenes de las células con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81).

[00309] Transferencia Western

[00310] Se sembraron RDEBK en un matraz T-75 con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células por matraz un día antes de la transfección. Se usaron poliplejos de HC32-DATOU/MCC7 y PEI/MCC7 en la relación de p/p de 30:1 y 1:1, respectivamente, para la transfección con 39 µg de MCC7 para cada matraz. Cuatro días después de la transfección, se recolectaron las células y se trataron con amortiguador de lisis RIPA que permite una lisis celular eficiente y la solubilización de las proteínas celulares. Se agregó 1 µL de PIC a la lisis celular hasta un volumen final de 50 µL y se almacenó a -80 °C. Se usó el ensayo de Bradford para cuantificar la concentración de proteína mediante la normalización de las concentraciones de la muestra a la concentración conocida de BSA. Se cargaron 40 µg de muestras de proteína desnaturalizada en el gel de SDS-Page (4 %-10 %), y luego, se procesó la electroforesis a 75 V durante 20 minutos seguido por 120 V durante 1 h. A continuación, las muestras de proteína se transfirieron a

una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 1 h a TA seguido por 90 V durante 30 minutos a 4 °C. El bloqueo de la membrana se llevó a cabo en el amortiguador de bloqueo (BSA al 5 % en amortiguador TBST) a TA durante 1 h. Se utilizó β -actina como control endógeno. A continuación, se agregaron anticuerpos primarios (anticuerpo policlonal anti-C7 de conejo y anticuerpo anti-actina de ratón con una dilución de 2500 en amortiguador de bloqueo) a la membrana y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de las etapas de lavado, se agregaron anticuerpos secundarios (anti-HRP de conejo y anti-de HRP ratón con una dilución de 5000 en amortiguador de bloqueo) a la membrana, y se incubaron durante 1 h a TA. Después de 3 lavados con TBST, se visualizó la membrana con el sustrato Pierce ECL Plus.

[00311] Datos estadísticos

[00312] Se utilizó SPSS Statistics para la versión 24 de windows (IBM Corp., Armonk, N.Y., EE. UU.) para los datos estadísticos. Se utilizó la prueba t de Student para analizar todos los datos de transfección génica, que se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar (SD). Para todos los análisis, un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

[00313] Resultados:

[00314] Transfección de genes indicadores en RDEBK mediante el uso de HPAE de diferentes pesos moleculares

[00315] Para identificar los MW más favorables para la administración de genes, se usaron cuatro polímeros HC32-DATOU con diferentes M_w para transfectar células de RDEBK mediante el uso de ADN que codifica GFP como gen indicador. Tal como se muestra en la **Figura 14** y la **Figura 15**, aunque no se observa citotoxicidad obvia en la relación de p/p de polímero/ADN de 10:1, la eficiencia de transfección de todos los polímeros HC32-DATOU es relativamente baja. Cuando la relación de p/p aumenta a 30:1 o más, entre todos los polímeros, 11 kDa de HC32-DATOU a 30:1 logra la eficiencia de transfección más alta con la expresión de GFP más fuerte, mientras se conserva un alto nivel de viabilidad celular de 98 %. Generalmente, la expresión de GFP disminuyó con el aumento de M_w de los polímeros HC32-DATOU.

[00316] Por otro lado, la citotoxicidad se correlaciona muy bien con el aumento del M_w . Por ejemplo, para p/p de 50:1, a medida que aumenta el M_w , disminuye la viabilidad celular de 91 % a 58 %, 42 % y 15 %, respectivamente. La eficiencia de la transfección se ve comprometida con el aumento de la citotoxicidad que podría atribuirse a la cadena principal incremental del polímero. Estos resultados demuestran que el MW tiene efectos significativos sobre el rendimiento de la transfección de HC32-DATOU, y un M_w de ~ 10 kDa es más favorable para la transfección génica de RDEBK para lograr una alta eficiencia de transfección y una baja citotoxicidad.

[00317] La alta capacidad de transfección génica de HC32-DATOU de 11 kDa se verificó mediante comparación con el reactivo comercial de transfección génica PEI ($M_w = 25$ kDa). Tal como se muestra

en la **Figura 16a**, para las tres relaciones de p/p evaluadas, la actividad relativa de Gluc de las células de RDEBK después de la transfección mediante los poliplexos de HC32-DATOU/ADN fue mucho mayor que la mediada por las contrapartes de PEI/ADN. La actividad de Gluc más alta lograda por los poliplexos de HC32-DATOU/ADN en la relación de p/p de 30 : 1 fue 17 veces mayor que la de las contrapartes de PEI/ADN en la relación de p/p de 2 : 1.

[00318] Cabe destacar, que los poliplexos de HC32-DATOU/ADN no indujeron una citotoxicidad obvia y conservaron casi 100 % de la viabilidad celular. Por el contrario, PEI mostró una citotoxicidad evidente independiente de la dosis, la viabilidad celular disminuyó significativamente de 90 % en la relación de p/p de 1:1 a 38 % en la relación de p/p de 3:1 (**Figura 16b**). Debido a la citotoxicidad considerable, se utilizó PEI con una relación de p/p de 1:1 para los siguientes estudios.

[00319] Para validar el alto rendimiento de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN, se utilizó ADN que codifica GFP para la transfección. Los poliplexos de HC32-DATOU/ADN mediaron un nivel mucho más alto de expresión de GFP que PEI, lo que se demostró mediante la observación de fluorescencia verde sustancialmente más fuerte (**Figura 16c**). En consecuencia, el análisis de cuantificación por citometría de flujo muestra que se un desplazamiento de más células que corresponde al canal determinante de GFP (**Figura 16d**). 75 % de las células de RDEBK fueron positivas para GFP después de la transfección mediante los poliplexos HC32-DATOU/ADN, en contraste con el 39 % alcanzado por los poliplexos de PEI/ADN. Además, la MFI de las células de RDEBK transfectadas por los poliplexos de HC32-DATOU/ADN es 13 veces mayor que la mediada por las contrapartes de PEI/ADN (**Figura 16e**), o que indica que se logró una expresión génica mucho mayor en células individuales. Todos estos resultados demuestran que HC32-DATOU es mucho más eficiente y seguro que PEI para la transfección génica en células de RDEBK.

[00320] Biosíntesis de MCC7 y absorción celular de poliplexos de HPAE/MCC7 por células de RDEBK

[00321] Mediante el uso de un sistema de digestión de phiC31 con 1-SceI de la tecnología de minicírculos (Gaspar, V.; de Melo-Diogo, D.; Costa, E.; Moreira, A.; Queiroz, J.; Pichon, C.; Correia, I.; Sousa, F. Minicircle DNA Vectors for Gene Therapy: Advances and Applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15* (3), 353–379. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.996544>.), se sintetizó un ADN en minicírculos que codifica *COL7A1* de longitud completa de ~9 kb (**Figura 17a**). La electroforesis en gel muestra que entre los tres ADN marcados con *COL7A1*, solo MCC7 tiene una longitud de la cadena principal de 3 kb, que es 2 kb y 5 kb más corta que el plásmido regular (RP) pcDNA3.1COL7A1 y el plásmido original (PP) MN511A-1-COL7A1 (**Figura 17b**), respectivamente, lo que indica el MCC7 con derivado miniatura del vector de PP tradicional desprovisto de secuencias bacterianas.

[00322] La absorción celular de los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 se llevó a cabo en células de

RDEBK. MCC7 se marcó con el tinte fluorescente rojo Cy3, los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 se prepararon tal como se mencionó anteriormente. Después de 4 h de transfección, se observó una fluorescencia roja muy fuerte alrededor del núcleo de las células (**Figura 17c**). En comparación, los poliplexos de PEI/MCC7 muestran una eficiencia de absorción celular mucho menor, tal como lo demuestra la fluorescencia roja mucho más débil. Las mediciones de citometría de flujo demuestran, además, que, aunque el porcentaje de células positivas para Cy3 es similar (96,4 % frente a 93 %, **Figura 17d**), la MFI de las células incubadas con los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 fue alrededor de 2 veces mayor que la de las tratadas con las contrapartes de PEI/MCC7 (**Figura 17e**), lo que indica una cantidad superior de copias de ADN absorbidas por las células de RDEBK. Los tamaños máximos de ADN que pueden transportar los vectores RV y de virus adenoasociados (AAV) son 7-8 kb y 5 kb, respectivamente. El hecho de que HC32-DATOU sea capaz de administrar MCC7 de 12 kb de longitud en células RDEBK de manera eficiente destaca su potencial para lograr una gran expresión de C7 para el tratamiento con RDEB.

[00323] Altos niveles de expresión de C7 recombinante y ARNm de COL7A1

[00324] Después de la internalización, los poliplexos de vector/ADN se estimularon con barreras intracelulares, que incluían escape endo/lisosomal, transporte a través del citoplasma, liberación de ADN y la entrada al núcleo. El ciclo celular es otro obstáculo para que la eficiencia de absorción nuclear de las células que experimentan mitosis sea más de 10 veces mayor que las de aquellas en la fase de crecimiento del ciclo celular.

[00325] Para evaluar la expresión de proteínas C7 y el ARNm de *COL7A1* de la transcripción mediada por los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7, se realizaron estudios de RT-qPCR, tinción de inmunofluorescencia y transferencia western.

[00326] La **Figura 18a** y la **Figura 18b** indican los gráficos de amplificación de RT-qPCR del GAPDH de control endógeno y la expresión de ARNm de *COL7A1*, respectivamente. Después de normalizarse al control endógeno, se muestra que los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 mediaron una regulación por aumento de 4019 veces de la expresión de ARNm de *COL7A1* en comparación con las células UT (**Figura 18c**), 2,2 veces mayor que la mediada por los poliplexos de PEI/MCC7. Los estudios de tinción de inmunofluorescencia (**Figura 18d**) revelan, además, que se detectó expresión nula de C7 para la células de RDEBK no tratadas. En contraste, después de la transfección con los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7, se observó un nivel mucho mayor de expresión de C7 alrededor del núcleo en las imágenes de citoimmunofluorescencia. Además, de acuerdo con los resultados de la expresión de ARNm de *COL7A1*, los poliplexos de HC32-DATOU/ADN mediaron una expresión de C7 más eficiente que las contrapartes de PEI/MCC7.

[00327] Los resultados de la transferencia Western muestran que no se detectó secreción de C7 a partir

de células RDEBK no tratadas (**Figura 18e**). Por el contrario, una banda de proteína de C7 de 290 kDa muy clara es visible después de la transfección con los poliplexos de HC32-DATOU, la banda de C7 es incluso tan fuerte como la de las células NHK de tipo salvaje con la función completa de producción de C7. Se observa que, aunque los poliplexos de PEI/MCC7 alcanzaron un nivel significativamente alto de expresión de ARNm de *COL7A1*, la producción de C7 es limitada.

[00328] Un estudio del mecanismo demostró que la estructura compacta del ADN aumentó la absorción celular, las cantidades de copias de vectores intracelulares, la ubicación nuclear y los niveles de transcripción de ARNm (Kobelt, D.; Schleef, M.; Schmeer, M.; Aumann, J.; Schlag, P. M.; Walther, W. Performance of High Quality Minicircle DNA for in Vitro and in Vivo Gene Transfer. *Mol. Biotechnol.* **2013**, 53 (1), 80–89. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9535-6>). En la presente, aprovechando el polímero optimizado y la construcción génica en miniatura, HC32-DATOU puede administrar de manera eficaz el gen *COL7A1* en células de RDEBK, promover la transcripción posterior del ARNm y la expresión de C7 recombinante final, fortaleciendo de ese modo la integridad de la piel.

[00329] Estudio mecanicista de alta eficiencia de transfección génica de poliplexos de HPAE/MCC7

[00330] La condensación del ADN, la unión, el tamaño de los poliplexos, el potencial zeta, la morfología y la liberación del ADN están relacionados con el rendimiento de la transfección. Para comprender mejor los mecanismos de la alta eficiencia de transfección génica mediada por los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7, se investigaron estos parámetros fisicoquímicos.

[00331] Se cree que el HC32-DATOU catiónico condensa MCC7 con carga negativa para formar poliplexos a través de autoensamblaje electrostático (**Figura 19a**). Para confirmar esto, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la capacidad de condensación del ADN de HC32-DATOU 2 h después de la preparación del poliplexo. Tal como se muestra en la **Figura 19b**, el ADN de MCC7 sin tratamiento se desplazó en el gel, mientras que HC32-DATOU pudo condensar el ADN en el pocillo sin un desplazamiento evidente del ADN. El ensayo de competición de heparina mostró, además, que los poliplexos de HC32-DATOU con concentraciones bajas de heparina (0,1-0,3 IU/μL) aún condensaban la mayor parte del ADN, lo que sugiere una fuerte capacidad de condensación del ADN y una propiedad altamente estable de los poliplexos de HC32-DATOU.

[00332] De manera similar, tal como se cuantificó mediante el ensayo PicoGreen (**Figura 19c**), HC32-DATOU mostró una afinidad de unión al ADN estable y alta del 96,3 %, lo que indica solo 3,7 % de desempaqueado del ADN. Cuando se aplicaron concentraciones de heparina de 3 y 6 IU/μL, se detectaron, respectivamente, 68,2 % y 99,6 % del desempaqueado del ADN. Estos resultados demuestran que HC32-DATOU se condensa, se une y libera ADN de manera eficiente de manera controlada con la presencia de heparina con carga negativa ajustable.

[00333] En la relación de p/p optimizada para la expresión eficiente de C7 (30:1), las nanopartículas presentaron un tamaño promedio de 110 nm y un tamaño de moda de 81 nm, respectivamente (**Figura 19d**), con el potencial zeta de $+37,4$ mV (**Figura 19e**), lo que indica una estructura de nanopartículas compacta con una carga superficial positiva. Se sabe que los poliplexos se formaron más comúnmente con forma esférica o toroidal. En este caso, los poliplexos de HC32-DATOU/MCC7 manifestaron una morfología esférica y uniforme (**Figura 19f**).

[00334] Se informa que la mejora de la eficiencia de la transfección se beneficia de la modificación del grupo de extremo diamina, que aumenta la carga catiónica de los polímeros, lo que mejora la dinámica de unión del polímero/ADN y la condensación del ADN en nanopartículas y protege el ADN de la degradación. Además de la modificación final con diamina DATOU, múltiples restos de unión/condensación de ADN, incluidas aminos primarias, secundarias y terciarias, residen en los grupos de extremo y la cadena principal de HC32. Generalmente, las partículas de LPAE/ADN tienen menos de 250 nm y se encontró que las partículas de menor tamaño eran internalizadas de manera más eficiente por las células.

[00335] Sin limitarse a ninguna teoría, es posible que las propiedades de pequeños, compactos, uniformes y catiónicos de los poliplexos de HC32/MCC7 permitan una alta eficiencia de absorción celular. Además, múltiples aminos secundarias y terciarias ionizables pueden amortiguar una amplia gama de protones, lo que puede facilitar el escape endo/lisosomal a través del «efecto de esponja de protones». Posteriormente, la estabilidad de empaquetamiento de genes estable de HC32-DATOU sugiere que puede ayudar al transporte intracelular de los poliplexos a través del citoplasma hacia el núcleo.

[00336] Un vector eficiente debe equilibrar una fuerza de unión suficiente para proteger el ADN con la capacidad de liberar el ADN. Sin limitarse a ninguna teoría, la interacción electrostática moderada entre HC32-DATOU y MCC7 y la propiedad biodegradable de HC32-DATOU pueden facilitar la liberación de genes de los poliplexos hacia adentro del núcleo para iniciar las etapas de la transcripción.

[00337] Ejemplo 10: Composiciones liofilizadas que comprenden los poliplexos de HPAE de la presente descripción

[00338] El siguiente ejemplo describe los resultados de variar las condiciones de almacenamiento y la concentración del crioprotector en el proceso de liofilización para formulaciones ilustrativas de poliplexos de HPAE/ADN.

[00339] La formulación de poliplexos de HC32-DATOU/ADN se optimizó al variar las condiciones de almacenamiento y la concentración de crioprotector en el proceso de liofilización. La **Figura 20a** ilustra el esquema de los estudios de fabricación de liofilización transfección génica en células de RDEBK mediante el uso de ADN que codifica GFP. Además del poliplexo recién preparado, se emplearon todos los poliplexos en la transfección génica 1 día después de la preparación. Tal como se muestra en la

Figura 20b, al variar la temperatura de almacenamiento, excepto el almacenado a TA, los poliplexos frescos y los poliplexos almacenados a 4 °C, -20 °C y -80 °C muestran una expresión de GFP alta y comparable con un desplazamiento significativo de la población celular en las distribuciones del histograma de citometría de flujo (**Figura 20c**). Tal como se muestra en las **Figuras 20d y 20e**, la eficiencia cuantificada con citometría de flujo fue superior a 70 %, y la MFI normalizada fue alrededor de 10 veces superior a la del grupo UT. Estos resultados demuestran que una temperatura de almacenamiento baja es favorable para mantener la alta capacidad de transfección génica de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN.

[00340] A continuación, mediante el uso de sacarosa como crioprotector durante el proceso de liofilización, se estudiaron los efectos de la concentración de crioprotector sobre la capacidad de transfección génica de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN. Los poliplexos liofilizados sin ningún crioprotector (sacarosa al 0 %) dieron como resultado la pérdida de la mayor parte de la capacidad de transfección, que presentaba una eficiencia de 20 % y una MFI solo 1,4 veces superior en comparación con las células UT.

[00341] Cuando se agregó sacarosa al 1 %, 3 % y 5 % a la solución de poliplexo antes de la liofilización, la eficiencia de transfección aumentó a 54 %, 61 % y 52 %, respectivamente. Estos resultados demuestran que el 3 % de sacarosa es más eficiente para mantener la capacidad de transfección génica de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN. Aunque la transfección génica fue algo inferior que la de las contrapartes recién preparadas, la capacidad de transfección génica de los poliplexos almacenados a temperatura baja o liofilizados con sacarosa sigue siendo mucho mayor que la de los reactivos comerciales SuperFect y Lipofectamina, que es de 10 % y 32 % de eficiencia, respectivamente.

[00342] Además, la liofilización de los poliplexos tiene ventajas únicas. En primer lugar, permite la reconstrucción posterior de los poliplexos a una concentración más alta, lo que es particularmente beneficioso para la inyección *in vivo* que requiere un volumen de administración limitado. En segundo lugar, el soluto fácilmente ajustable (sacarosa) puede hacer que la solución de poliplexo reconstruida sea isotónica durante la formulación. Además, se espera que los poliplexos liofilizados con sacarosa sean más estables en presencia de suero en comparación con los poliplexos recién preparados. Finalmente, los poliplexos liofilizados se pueden almacenar durante años sin perder eficacia.

[00343] Se realizó un estudio de transfección génica de los poliplexos de HC32-DATOU/ADN con mejor rendimiento (grupos de 4 °C, -20 °C y -80 °C) con tiempos de almacenamiento diferentes para evaluar la vida útil. Tal como se muestra en la **Figura 21**, después de almacenamiento a 4 °C durante 0,5 o 1 mes, la actividad de Gluc de los poliplexos fue de dos a tres magnitudes menor que la mediada por los recién preparados. Después de 2 meses, la eficiencia de los poliplexos se volvió insignificante.

[00344] Por el contrario, incluso después de un año, los poliplexos almacenados a -20 °C and -80 °C

mediaron el mismo nivel de actividad de Gluc que los poliplejos recién formulados. Estos resultados demuestran que los poliplejos de HC32-DATOU/ADN son muy estables y conservan su función completa de transfección génica simplemente al almacenarse a -20 °C o -80°C, lo que los vuelve altamente viables para aplicaciones clínicas.

- 5 **[00345] Materiales para los Ejemplos 9 y 10:** Los monómeros 5-amino-1-pentanol (AP, 99 %), triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA, 99 %), 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (DATOU, 98 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich, y diacrilato de 1,4-butanodiol (BDA, 98 %) se adquirió de VWR. Los productos químicos bromuro de litio (LiBr, 99 %), solución salina amortiguada con tris y Tween 20 (TBST), paraformaldehído (PFA) y triton X-100 se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los solventes
- 10 dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, 99 %), dimetilformamida (DMF, Fisher Scientific, 99 %), éter dietílico (Sigma-Aldrich, 99 %) y cloroformo deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich, 99,9 %) se usaron tal como se recibieron. La polietilenimina ramificada (PEI, M_w = 25 kDa, Sigma-Aldrich), SuperFect (QIAGEN), Lipofectamina 2000 (Invitrogen) se usaron como controles de reactivos comerciales. El medio basal de células de queratinocitos (Clonetics KBM-Gold) con el paquete de suplementos (Clonetics
- 15 KGM-Gold SingleQuots) se adquirió de Lonza. El plásmido de luciferasa de *Gaussia princeps* secretado por células (Gluc) y los kits de ensayo de luciferasa de *Gaussia BioLux* se obtuvieron en New England Biolabs UK. El plásmido de proteína fluorescente verde (GFP) se adquirió de Aldevron. La solución de sal balanceada de Hank (HBSS), el amortiguador de acetato de sodio (SA, pH 5,2±0,1, 3 M), el amortiguador de acetato de tris-EDTA (TAE) y el amortiguador del ensayo de radioinmunoprecipitación
- 20 (RIPA), agarosa, albúmina de suero bovino (BSA), suero de cabra, anticuerpo anti-C7 monoclonal producido en ratones, el cóctel inhibidor de proteasa (PIC) y el reactivo de Bradford se adquirieron de Sigma-Aldrich. La solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco 1× (PBS), el medio de suero reducido OPTI-MEM I de Gibco, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y los kits de ensayo de PicoGreen se adquirieron de Life Technologies. La penicilina-estreptomicina (PS), EcoRI, el anticuerpo secundario
- 25 altamente adsorbido de forma cruzada de cabra anti-IgG de ratón Alexa-568 (H+L) y el sustrato de transferencia western de Pierce ECL plus se adquirieron de Thermo Fisher Scientific. Los kits de ensayo de Alamarblue, la tinción en gel de ADN seguro para SYBR y SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix se adquirieron de Invitrogen. El colágeno tipo VII alfa 1 (Fam-MGB, cebador y sonda), el control endógeno de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) (VIC/MGB sonda, cebador
- 30 limitado) y la mezcla maestra de expresión génica TaqMan se adquirieron de Applied Biosystems. El amortiguador de TE (QIAGEN), el kit de marcado de ADN con Cy3 (Mirus), el kit RNeasy Mini (QIAGEN), el medio de montaje Fluoroshield con DAPI (Abcam) se usaron según los protocolos de los fabricantes. El anticuerpo primario anti-C7 de conejo policlonal (Merck Millipore), el anticuerpo primario anti-beta actina de ratón (Abcam), el anticuerpo enlazado a HRP anti-IgG de conejo (Cell Signaling) y el anticuerpo

enlazado a HRP anti-IgG de ratón (Cell Signaling) se usaron tal como se recibieron.

[00346] Todos los documentos citados, o a los que se hace referencia o se describe de otro modo, en la presente se incorporan en su totalidad mediante referencia para todos los fines.

Referencias

- [1] L. Naldini, Gene therapy returns to centre stage. *Nature* **2015**.
- [2] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**.
- 5 [3] M. Foldvari, D. W. Chen, N. Nafissi, D. Calderon, L. Narsineni, A. Rafiee, *J. Control. Edición* **2016**.
- [4] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Edición* **2006**.
- [5] D. M. Lynn, R. Langer, *J Am Chem Soc* **2000**.
- [6] J. J. Green, G. T. Zugates, N. C. Tedford, Y. H. Huang, L. G. Griffith, D. A. Lauffenburger, J. A. Sawicki, R. Langer, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* **2007**.
- 10 [7] J. C. Sunshine, D. Y. Peng, J. J. Green, *Mol. Pharm.* **2012**.
- [8] D. G. Anderson, A. Akinc, N. Hossain, R. Langer, *Mol. Ther.* **2005**.
- [9] A. Akinc, D. M. Lynn, D. G. Anderson, R. Langer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**.
- [10] D. G. Anderson, D. M. Lynn, R. Langer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**.
- 15 [11] J. C. Sunshine, S. B. Sunshine, I. Bhutto, J. T. Handa, J. J. Green, *PLoS One* **2012**.
- [12] A. Mangraviti, S. Y. Tzeng, K. L. Kozielski, Y. Wang, Y. Jin, D. Gullotti, M. Pedone, N. Buaron, A. Liu, D. R. Wilson, S. K. Hansen, F. J. Rodriguez, G. D. Gao, F. Dimeco, H. Brem, A. Olivi, B. Tyler, J. J. Green, *ACS Nano* **2015**.
- [13] D. Zhou, L. Cutlar, Y. Gao, W. Wang, J. O. Keeffe-ahern, S. McMahon, B. Duarte, F. Larcher, B. J. Rodriguez, U. Greiser, W. Wang, *Sci. Adv.* **2016**, 1.
- 20 [14] D. Zhou, Y. Gao, J. O'Keeffe Ahern, A. Sigen, Q. Xu, X. Huang, U. Greiser, W. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**.
- [15] D. Zhou, Y. Gao, A. Aied, L. Cutlar, O. Igoucheva, B. Newland, V. Alexeeve, U. Greiser, J. Uitto, W. Wang, *J. Control. Edición* **2016**.
- 25 [16] M. Zeng, D. Zhou, S. Ng, J. O. Ahern, F. Alshehri, Y. Gao, L. Pierucci, U. Greiser, W. Wang, *Polymers (Basel)*. **2017**, 9, 161.
- [17] D. T. Woodley, M. Chen, *Journal of Investigative Dermatology*. 2015,.
- [18] J.-D. Fine, L. Bruckner-Tuderman, R. A. J. Eady, E. A. Bauer, J. W. Bauer, C. Has, A. Heagerty, H. Hintner, A. Hovnanian, M. F. Jonkman, I. Leigh, M. P. Marinkovich, A. E. Martinez, J. A. McGrath, J. E. Mellerio, C. Moss, D. F. Murrell, H. Shimizu, J. Uitto, D. Woodley, G. Zambruno, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2014**.
- 30 [19] L. Cutlar, D. Zhou, X. Hu, B. Duarte, U. Greiser, F. Larcher, W. Wang, A non-viral gene therapy for treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **2016**.
- [20] J. W. Fountain, W. K. Lockwood, F. S. Collins, *Gene* **1988**.

- [21] T. Wong, L. Gammon, L. Liu, J. E. Mellerio, P. J. C. Dopping-Hepenstal, J. Pacy, G. Elia, R. Jeffery, I. M. Leigh, H. Navsaria, J. a McGrath, *J. Invest. Dermatol.* **2008**.
- [22] G. Petrof, M. Martinez-Queipo, J. E. Mellerio, P. Kemp, J. A. McGrath, *Br. J. Dermatol.* **2013**.
- [23] A. Nakayama, M. Sato, M. Shinohara, S. Matsubara, T. Yokomine, E. Akasaka, M. Yoshida, S. Takao, *Cloning Stem Cells* **2007**.
- [24] M. Lee, K. Chea, R. Pyda, M. Chua, I. Dominguez, *J. Biomol. Tech.* **2017**.
- [25] M. S. Tabar, M. Hesarak, F. Esfandiari, F. S. Samani, H. Vakilian, H. Baharvand, *Cell J.* **2015**.
- [26] E. T. Jordan, M. Collins, J. Terefe, L. Ugozzoli, T. Rubio, *J. Biomol. Tech.* **2008**.
- [27] Y. Liu, D. Wu, Y. Ma, G. Tang, S. Wang, C. He, T. Chung, S. Goh, *Chem. Commun. (Camb)*. **2003**.
- [28] J. J. Green, R. Langer, D. G. Anderson, A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery. *Acc. Chem. Res.* **2008**.
- [29] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**.
- [30] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **2009**.
- [31] D. V. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan, D. A. Lauffenburger, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**.
- [32] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**.
- [33] J. REJMAN, V. OBERLE, I. S. ZUHORN, D. HOEKSTRA, *Biochem. J.* **2004**.
- [34] A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H. S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine, F. Stellacci, *Nat. Mater.* **2008**.
- [35] J. A. McGrath, A. Ishida-Yamamoto, A. O'Grady, I. M. Leigh, R. A. J. Eady, *J. Invest. Dermatol.* **1993**, 100, 366.
- [36] M. Goto, D. Sawamura, K. Ito, M. Abe, W. Nishie, K. Sakai, A. Shibaki, M. Akiyama, H. Shimizu, *J. Invest. Dermatol.* **2006**.
- [37] Z. Y. Chen, C. Y. He, A. Ehrhardt, M. A. Kay, *Mol. Ther.* **2003**.
- [38] F. Jia, K. D. Wilson, N. Sun, D. M. Gupta, M. Huang, Z. Li, N. J. Panetta, Z. Y. Chen, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker, J. C. Wu, *Nat. Methods* **2010**.
- [39] C. Perdoni, M. J. Osborn, J. Tolar, *Transl. Res.* **2016**.
- [40] C. Georgiadis, F. Syed, A. Petrova, A. Abdul-Wahab, S. M. Lwin, F. Farzaneh, L. Chan, S. Ghani, R. A. Fleck, L. Glover, J. R. McMillan, M. Chen, A. J. Thrasher, J. A. McGrath, W. L. Di, W. Qasim, *J. Invest. Dermatol.* **2016**.