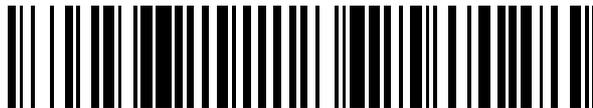


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 614**

21 Número de solicitud: 201131713

51 Int. Cl.:

**C07K 2/00** (2006.01)

**C07K 1/107** (2006.01)

**C08G 69/10** (2006.01)

**C08G 63/91** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 49/12** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.10.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.05.2013**

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE  
(100.0%)**

**Avenida Autopista del Saler 16-3  
46012 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**VICENT DOCÓN, María Jesús;  
BARZ, Matthias;  
CANAL, Fabiana;  
CONEJOS SÁNCHEZ, Inmaculada y  
DURO CASTAÑO, Aroa**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **SINTESIS CONTROLADA DE POLI GLUTAMATOS CON BAJA POLIDISPERSIDAD Y  
ARQUITECTURAS VERSÁTILES**

**ES 2 402 614 A1**

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 614**

21 Número de solicitud: 201131713

57 Resumen:

Síntesis controlada de poliglutamatos con baja polidispersidad y arquitecturas versátiles, se refiere al control de la polimerización de N-carboxianhídridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs) a través del uso de sales no nucleofílicas con 5 la finalidad de obtener arquitecturas poliméricas altamente versátiles, con bajos índices de polidispersidad, (homopolímeros, polímeros dibloque, tribloque o sistemas multibloque), así como a procesos para la preparación de los mismos y su utilización en composiciones farmacéuticas, entre otros, agentes de imagen molecular. Concretamente se refiere a la obtención de poliglutamatos funcionales con estructura definida, peso molecular ajustable y baja polidispersidad ( $D = M_w / M_n < 1.3$ ) mediante la polimerización de apertura de anillo de N-carboxianhídridos. Asimismo, los grupos ácido de la cadena polimérica de los poliglutamatos se pueden activar con 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolina permitiendo la introducción de diversas funcionalidades por modificación post-polimerización formándose diferentes grupos reactivos en las cadenas laterales del polímero. Los restos reactivos, tales como azidas, maleimidias, tioles, alquinos (lineales o cíclicos) ofrecen la oportunidad de conjugación específica, útiles para fármacos, unidades dirigentes o marcadores.

ES 2 402 614 A1

## DESCRIPCIÓN

Síntesis controlada de poliglutamatos con baja polidispersidad y arquitecturas versátiles

## SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al control de la polimerización de N-carboxianhídridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs) a través del uso de sales no nucleofílicas con la finalidad de obtener arquitecturas poliméricas altamente versátiles, con bajos índices de polidispersidad, (homopolímeros, polímeros dibloque, tribloque o sistemas multibloque), así como a procesos para la preparación de los mismos y su utilización en composiciones farmacéuticas y/o como agente para el diagnóstico de imagen.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Un polímero ideal para ser usado como portador en el transporte de fármacos o agente para el diagnóstico de imagen debe caracterizarse por poseer (i) biodegradabilidad o un peso molecular adecuado que evite su acumulación progresiva *in vivo*, (ii) baja polidispersidad, de manera que asegure una homogeneidad aceptable del sistema final permitiendo ajustar las propiedades farmacocinéticas del mismo; (iii) tiempoelevado de residencia en el cuerpo, para prolongar la acción del conjugado o permitir su distribución y acumulación en los compartimentos deseados del cuerpo (por lo tanto, se prefieren pesos moleculares elevados) y (iv) en el caso de conjugación de proteínas, un único grupo reactivo para evitar reacciones de entrecruzamiento ("*crosslinking*"), mientras que para el caso de conjugación de fármacos pequeños, es preferible que el portador contenga varios grupos reactivos que permitan modular y optimizar la carga del fármaco (multivalencia).

20 Debido a su naturaleza implícita, los polímeros presentan diversos retos a la hora de su desarrollo farmacológico. Un fármaco manufacturado debe ser homogéneo y estar compuesto por una única especie definida. Por el contrario, todos los polímeros sintéticos son inherentemente heterogéneos y, como macromoléculas pueden presentar diversos desafíos en su caracterización. El control exhaustivo de parámetros cruciales como el peso molecular, la polidispersidad, la localización de las cargas o el balance hidrofobia-hidrofilia es un requisito para modular la biodistribución, el destino final, la actividad biológica y la toxicidad.<sup>1,2</sup> El peso molecular medio se expresa en términos de "peso molecular promedio, en peso" (Mw) y "peso molecular promedio en número" (Mn), y el cociente Mw/Mn proporciona una medida de la dispersidad D.

25 Por lo tanto, existe un creciente interés y una necesidad en el desarrollo de metodologías para la obtención desistemas poliméricos biodegradables con mayores pesos moleculares, controlando la homogeneidad de los mismos en el proceso, y permitiendo un alto grado de versatilidad para ser posteriormente implementados en diversas necesidades clínicas.

35 La polimerización por apertura de anillo (ROP del acrónimo inglés "*ring-opening polymerisation*") de N-carboxianhídridos de aminoácidos (NCAs) es la técnica de polimerización más amplia y comúnmente aplicada para obtener polipéptidos y copolímeros de bloque basados en polipéptidos en escala multigramo. A pesar de que los polímeros obtenidos son menos definidos que los péptidos producidos por un organismo natural, este método de polimerización permite el acceso a arquitecturas poliméricas que están por encima de las posibilidades de la naturaleza. Además, la apertura de anillo de NCAs ya ha sido empleada en varias aplicaciones dentro de diferentes campos de la ciencia. Dichas aplicaciones van desde el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos o agentes moleculares de imagen a materiales para recubrimiento de superficies<sup>2-6</sup>

40 Como ejemplo prominente del uso de polimerización de NCAs debe mencionarse el conjugado de ácido poliglutámico (PGA) y paclitaxel (Opaxio®, formalmente Xyotax, PPX, CT-2103). El conjugado polímero-fármaco se encuentra en fase clínicalll,<sup>7-9</sup> lo que pone de manifiesto la importancia del método de polimerización de NCAs para la preparación de polipéptidos sintéticos definidos. El ácido poliglutámico es un material prometedor para el diseño de nanomedicinas debido a su elevada biocompatibilidad, multivalencia y a su degradabilidad *in vivo* mediada por tior proteasas (Catepsina B).<sup>10-11</sup>

45 Desde el punto de vista histórico, la polimerización de NCAs es un método relativamente antiguo ya que fue descubierto por Leuch al inicio del siglo XX.<sup>12-14</sup> Desde entonces, se han estudiado y publicado diferentes metodologías de polimerización.<sup>15-17</sup> Hasta el momento las aproximaciones químicas más prometedoras se basan en la iniciación de NCAs purificados con aminas primarias combinado con el uso de técnicas de alto vacío,<sup>18-20</sup> el uso de sales hidrocólicas de amonio como iniciadores,<sup>21</sup> catalizadores basados en metales pesados<sup>22-24</sup> o hexametildisilazanos (HMDS).<sup>25-26</sup>

50 Sin embargo, la mayoría de estos métodos poseen limitaciones para la síntesis de polipéptidos bien definidos. Por ejemplo, las aminas hexametildisilazanos (HMDS) son sensibles a reacciones de hidrólisis, y los catalizadores basados en metales pesados deben eliminarse posteriormente a la polimerización siempre que se pretenda una aplicación biomédica. Además, la eliminación de dichos metales es tediosa por lo que generalmente es incompleta.

La iniciación normal basada en el uso de aminas primarias proporciona en la mayoría de los casos un control reducido debido al propio proceso de polimerización. Existen reacciones secundarias que interfieren en el proceso de polimerización, especialmente cuando se requieren elevados grados de polimerización o arquitecturas complejas. En general, los poliglutamatos con un peso molecular en el rango entre algunos miles y 50.000 g/mol e índices de polidispersidad (IPDs) de 1.2 a 1.5 se encuentran descritos en literatura<sup>17</sup> IPDs superiores se atribuyen con toda probabilidad al hecho de que la polimerización de NCAs sufre de la presencia de reacciones secundarias. La más importante de ellas es la que se conoce como proceso del “monómero activado” (“Activated Monomer”) que tiene lugar por la desprotonación de una molécula de monómero NCA. El anión generado en el NCA es lo suficientemente nucleofílico como para iniciar la oligomerización de NCAs. Los N-aminoacil NCA derivados formados en el proceso pueden tanto añadirse a la cadena en propagación como llevar a cabo procesos de autocondensación, estos últimos produciendo elevados pesos moleculares a elevados a elevadas conversiones de monómero. Debido a que las aminas primarias pueden actuar como nucleófilos y como bases, el proceso de polimerización oscilará siempre entre ambos mecanismos, “amina normal” y “monómero activado”.

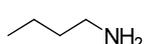
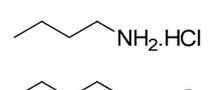
Una estrategia para obtener polipéptidos más definidos es la disminución de la temperatura de reacción, debido a que ello implica la disminución/supresión de diversas reacciones secundarias, sin embargo, ello implica un aumento de los tiempos de reacción de entre 2 a 4 veces, conllevando también una disminución en el rendimiento.<sup>27-29</sup> Sin embargo, para la producción de polímeros de bloque (di-, tri- o multibloque), la polimerización de NCAs debe proceder preferentemente con altas conversiones *via* mecanismo de amina normal; es decir, iniciación nucleofílica de la polimerización de manera que los polímeros resultantes estén provistos de grupos terminales bien definidos. El control sobre los grupos terminales poliméricos es esencial en la metodología de síntesis de arquitecturas multibloque.<sup>30</sup>

Knobler y colaboradores<sup>31,32</sup> evitan el mecanismo del “monómero activado” con la simple adición de un ácido, de manera que se induzca la reprotonación de los eventualmente formados NCAs. Estos autores investigaron la reacción estequiométrica entre NCAs y las sales hidroclicóricas de aminas primarias para la preparación de derivados aminoacilos. Schlaad y colaboradores usaron este método para preparar copolímeros híbridos de naturaleza definida basados en poliestireno.<sup>21</sup>

La principal desventaja de esta aproximación es el hecho de que el ion cloruro como tal puede actuar como nucleófilo o como base, desprotonando el monómero NCA y por lo tanto, dando lugar a reacciones secundarias.

Para comprobar el alcance de varias de las metodologías descritas en la literatura hasta el momento, como el uso de aminas primarias como iniciadores y el método desarrollado por Schlaad, se llevaron a cabo varios experimentos en nuestro laboratorio, cuyos resultados se muestran a continuación.

**Tabla1.** Comparación entre la aproximación basada en el uso de aminas primarias como método de polimerización de NCAs y la técnica de polimerización de Schlaad

Iniciador	P	[M]/[I]	DP Calc.) ) <sub>(calc.)</sub> a)	DP 1H- NM P	[M] Mol/L	t reacción (d)	Rdto (%)	Mn KDa	Mw KDa	PDI
<b>NAM</b> 	1	100	77	41	0.38	3	77	20.3	25.4	1.25
	2	400	300	59	0.38	3	75	22.4	31.9	1.4
	3	1600	1328	60	0.38	3	83	20.5	28.3	1.4
<b>Schlaad</b> 	4	100	60	36	0.38	3	60	4.4	5.6	1.3
	5	400	288	55	0.38	3	72	18.1	27.2	1.5
	6	1600	1168	90	0.38	3	73	20.7	31.2	1.5

**P:** polímero, **[M]/[I]:** Cociente Monómero-Iniciador; **DP:** Grado de polimerización (% of [M]/[I];) **Mw:** peso molecular medio en peso; **Mn:** peso molecular medio en número **PDI:** índice de la polidispersidad (cociente Mw/Mn que proporciona una medida de la dispersidad D).

a) Calculado usando  $DP = \frac{[M]}{[I]} \cdot conv$

Como muestra la tabla 1, aunque ambos métodos son fáciles de aplicar sin necesidad de equipamiento complicado o síntesis complejas, ambos son inútiles cuando se requieren grados de polimerización superiores a 100. Ello pone de manifiesto la necesidad de un mecanismo diferente, lo que supone la base de la presente invención.

## OBJETO DE LA INVENCION

5 El objeto de la presente invención es aumentar el grado de polimerización (GP), obtener una versatilidad estructural y disminuir el índice de polidispersabilidad (IPD) de los polipéptidos obtenidos mediante la polimerización de N-carboxianhídridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs).

10 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de obtención de poliglutamatos en el que se utiliza un anión no nucleofílico como el tetrafluoroborano. De este modo, las reacciones secundarias basadas en el carácter nucleofílico del contranión han sido suprimidas de manera eficaz. Así, ha aumentado el control sobre los grupos terminales del polímero, permitiendo la síntesis de homopolímeros, polímeros dibloque, tribloque o sistemas multibloque con una gran variedad de pesos moleculares, variando tanto el número de cadenas laterales como los grupos funcionales introducidos en las mismas.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

15 **FIGURA 1:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del  $\gamma$ -bencil L-glutamato N-Carboxianhídrido (NCA).

**FIGURA 2:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de las polimerizaciones realizados con las sales de n-butil tetrafluoroborano a diferentes proporciones del cociente  $[M]/[I]$  en DMF.

**FIGURA 3:** Representación del cociente  $[M]/[I]$  frente al  $M_n$  obtenido por GPC.

**FIGURA 4:** Diagramas de elución obtenidos por GPC de varios poliglutamatos con diferentes pesos moleculares.

20 **FIGURA 5:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ácido n-butil- $\alpha$ -poliglutámico correspondientes al lote de escalado de 5 gramos tras la desprotección.  $DP=252$  como se confirma por RMN.

**FIGURA 6:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del PGA modificado con propargilamina.

**FIGURA 7:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del PGA modificado con grupos oligoEG-azidas.

25 **FIGURA 8:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un copolímero resultante del acoplamiento entre PGA-propargilamina con  $\text{NH}_2\text{PEG}(2)\text{N}_3$ .

**FIGURA 9A:** Evaluación de la Viabilidad celular por MTT de TB400 [P: 35 donde X=OMe o S-S-4TP] y TB800 [P: 36 donde X=OMe o S-S-4TP] en células HUVEC a diferentes tiempos de incubación.

30 **FIGURA 9B:** Evaluación de la viabilidad celular por MTT de TB200 [P: 34 donde X=OMe o S-S-4TP] en células HUVEC y HeLa a diferentes tiempos de incubación.

35 **FIGURA 10A:** Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green (TB-OG50 [P: 41 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ], TB-OG100 [P: 42 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ], y TB-OG200 [P: 43 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ]). Estudios mediante citometría de flujo a  $37^\circ\text{C}$  y a  $4^\circ\text{C}$  (inhibición de mecanismos de internalización celular dependientes de energía como endocitosis).

40 **FIGURA 10B:** Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green (TB-OG50 [P: 41 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ], TB-OG100 [P: 42 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ], y TB-OG200 [P: 43 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG2000-OMe}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ]). Microscopía Confocal *in vivo* en células HeLa a diferentes tiempos de incubación (5 min, 30 min, 1h, 2h y 5h). Las imágenes corresponden a la internalización de TB-OG (verde) en presencia de marcador de membrana lipídica (rojo) a 1h y 5h.

45 **FIGURA 11A.** Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green. Estudios mediante citometría de flujo a  $37^\circ\text{C}$  y a  $4^\circ\text{C}$  (inhibición de mecanismos de internalización celular dependientes de energía como endocitosis) (TB-OG200\_4TP [P: 43 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG3000-S-S-4TP}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ], TB-OG400\_4TP [P: 44 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG3000-S-S-4TP}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ] y TBOG800\_4TP [P: 44 donde  $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$ ,  $R_2 = \text{-NH-PEG3000-S-S-4TP}$ ,  $R_3 = \text{ONa}$ ]).

**FIGURA 11B.** Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green. Microscopía confocal in vivo en células HUVEC con TB-OG200\_TP a 2h de incubación. Marcador lisosomal Dextran Texas Red (rojo).

5 **FIGURA 12A:** Medidas de fluorescencia del suero mediante espectrofluorímetro a los diferentes tiempos de sacrificio del animal y los consecuentes tratamientos del suero: medida directa del suero (■), medida del sobrenadante tras la homogenización con HClO<sub>4</sub> (■), medida tras el lavado del pellet con metanol (■) y medida tras el lavado del pellet con acetonitrilo (■).

10 **FIGURA 12B.** Medidas de la fluorescencia de los distintos órganos homogenados (hígado, riñón, intestino, bazo, cerebro, musculo, cerebelo y pulmón) tras 4 y 24h post inyección. TB=TB200 [P:34 donde X=-S-S-4TP], TBO 4= TB-OG200\_4TP [P: 43 donde R<sub>1</sub>= MeO-PEG2000, R<sub>2</sub>=-NH-PEG3000-S-S-4TP, R<sub>3</sub>=ONa], (4h), TBO 24= TB-OG200\_4TP [P: 43 donde R<sub>1</sub>= MeO-PEG2000, R<sub>2</sub>=-NH-PEG3000-S-S-4TP, R<sub>3</sub>=ONa], (24h).

**FIGURA 13.** Imagen obtenida mediante IVIS®Spectrum. Monitorización del DB100-Cy5.5 4h después de la inyección. Eliminación vía renal del portador polimérico. (A) Posición dorsal (B) Posición ventral.

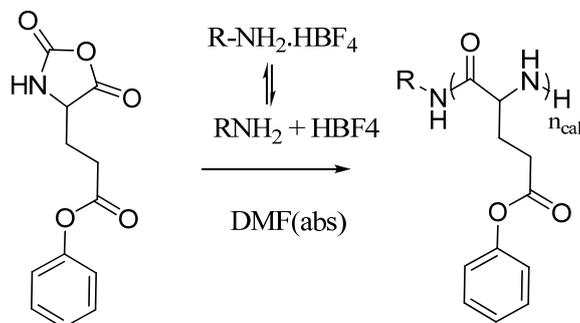
15 **FIGURA 14A:** Imagen por resonancia magnética de la cabeza de la rata antes de la inyección del compuesto TB800-DTPA/Gd

**FIGURA 14B:** Imagen por resonancia magnética de la cabeza de la rata después de la inyección del compuesto TB800-DTPA/Gd.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención se centra en suministrar una metodología para la obtención de una polimerización controlada de N-carboxianhidridos de α-aminoácidos mediante el uso de sales no nucleofílicas, concretamente con la sal de tetrafluoroborano de amonio. Dicho método se representa por la fórmula general que se detalla a continuación:

25



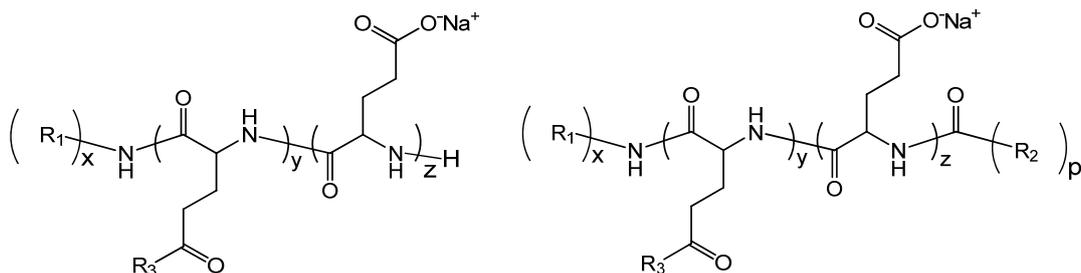
donde:

30 R representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 10000g/mol).

n representa el número de unidades de γ-benzylglutamato en el polímero en el rango de 1 a 1000 unidades

Las sales de tetrafluoroborano de amonio pueden ser preparadas mediante una metodología simple que incluye la reacción de la correspondiente amina con el complejo de ácido tetrafluorobórico HBF<sub>4</sub>·OEt<sub>2</sub>, seguida de un sencillo proceso de purificación y posterior almacenaje sin detectar descomposición o impurezas en el producto final.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los diferentes sistemas di- o tri-bloques, los cuales poseen un punto adicional de conjugación con un grupo funcional adecuado para permitir una posterior conexión específica. La estructura general de los di- y tri- bloques se describe a continuación:



donde:

5 R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).

10 R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

15 R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.

x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500

y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500

z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

20

R2 y R3 pueden ser utilizados para la conjugación de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, complejos de coordinación para MRI, PET y sondas SPECT.

25 Tal como se usa en la presente patente, la expresión "tratamiento" incluye tratamiento, prevención y control de tal estado y la expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a aquellos compuestos, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una razón riesgo/beneficio razonable.

30 En distintas realizaciones particulares de la invención R representa el grupo n-butilamina, R1 representa el m-PEG, R2 representa PEG que opcionalmente posee un grupo terminal funcional (incluyendo -OH, -SH, -S-S-4TP, -NH<sub>2</sub>, alquino, azida, o maleimida). En distintas realizaciones R3 puede estar representado por EG-alquino, EG-azida, alquilo, opcionalmente sustituido. También R3 puede representar -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-fenilo opcionalmente sustituido con uno ó más sustituyentes halógenos, y en otra realización R3 representa complejos de coordinación, como por ejemplo Gd-DTPA ó Ga-DOTA, Tc-DTPA, Cu-poliamina.

35 En el conjugado polímero-fármaco, el ácido poliglutámico incluye las variedades poli-L-glutámico y/o poli-D-glutámico, y en otra realización de la invención el ácido poliglutámico es el ácido poli-L-glutámico.

De la misma forma, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de las realizaciones mencionadas.

40 Así, la presente invención se refiere al proceso de preparación de los nuevos compuestos descritos anteriormente, sus derivados, análogos, formas tautoméricas, esteroisómeros, polimorfos, sus sales farmacéuticamente

aceptables o solvatados de los mismos.

Los polímeros de la presente invención son portadores diseñados para el transporte y la administración de fármacos y/o agentes para técnicas de imagen molecular. Por lo tanto, son herramientas útiles para el diagnóstico, tratamiento o prevención de patologías dependiendo de la carga conjugada.

5 Los polímeros y sus conjugados derivados mediante la presente invención, pueden administrarse en forma de cualquier formulación farmacéutica. La formulación farmacéutica dependerá de la naturaleza del compuesto activo y su ruta de administración. Puede usarse cualquier vía de administración, por ejemplo, la administración oral, bucal, pulmonar, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), transdérmica, ocular (oftálmica), por inhalación, intranasal, óptica, transmucosal, con implante o rectal.

10 Las preparaciones inyectables para la administración parenteral comprenden disoluciones, suspensiones o emulsiones estériles en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener coadyuvantes, tales como agentes de suspensión, estabilización o tonicidad o agentes dispersantes.

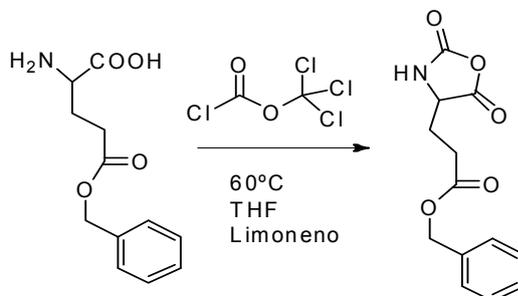
15 Los compuestos también pueden formularse para su aplicación tópica. Las formulaciones incluyen cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, preparaciones de champú, pasta oral, preparaciones de colutorio y parches, en los que el compuesto se disuelve o dispersa en excipientes adecuados.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica está en forma de nanoesferas, micropartículas y nanopartículas.

## EXPERIMENTACIÓN Y EJEMPLOS

### 20 Síntesis de N-carboxianhídrido de y-bencil L-glutamato (NCA) a partir de ácido y-bencil ester-L-glutámico y difosgeno usando limoneno para neutralizar el HCl liberado.

La síntesis de N-carboxianhídridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs) se puede dividir en dos grupos dependiendo de la naturaleza del sustrato aminoácido. El primer método se conoce como método de Leuchs y está basado en la ciclación de haluros de N-alcoxicarbonil aminoácidos para formar NCAs. El segundo se conoce como método Fuchs-Farthinge involucra la fosgenación directa de  $\alpha$ -aminoácidos desprotegidos, como se detalla en el esquema inferior.

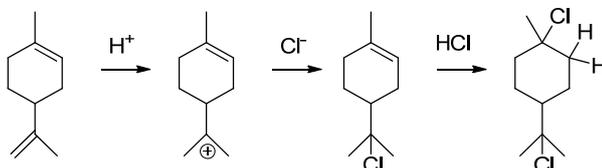


25 El protocolo se ha adaptado de N.M.B Smeets et al. "A Scalable Synthesis of L-Leucine-N-carboxyanhydride". *Organic Process Research & Development* **2005**, 9, 757-763, una variación del método Fuchs-Farthing. Además, se han introducido algunas variaciones, como la eliminación del fosgeno o HCl remanente, mediante un flujo de nitrógeno con anterioridad a la precipitación, seguido de recristalización y filtración bajo condiciones de atmósfera inerte mediante el uso de tubos deSchlenk para evitar impurezas y aumentar la estabilidad del producto una vez almacenado. Se podría haber usado fosgeno en la reacción, sin embargo ello proporcionaría una falta de control estequiométrico y además el uso excesivo de fosgeno produce la generación de contaminantes como sales hidrocólicas de los cloruros de aminoácido formados por la escisión del anillo de NCA por HCl, que puede ser fosgenado en un segundo paso para dar lugar a cloruros de ácido  $\alpha$ -isocianato. Ambos subproductos son críticos en la polimerización de NCAs y dan lugar a distribuciones anchas de peso molecular o incluso multimodales.

Por ello se eligió la utilización del líquido triclorometil cloroformato (difosgeno) que se descompone con la temperatura proporcionando fosgeno, por lo que puede obtenerse fácilmente un control estequiométrico en este caso. Debido a que el difosgeno necesita ser descompuesto térmicamente en el medio de reacción, se requieren temperaturas superiores en esta variación, en comparación con el método clásico de Fuchs-Farthing (40-50°C).

40 El mecanismo de la reacción implica la fosgenación directa de  $\alpha$ -aminoácidos desprotegidos. La ciclación tiene lugar a través de la formación de intermedios N-cloroformil aminoácidos y la posterior pérdida de una segunda molécula de HCl da lugar al NCA. La reacción genera 2 equivalentes de HCl por molécula de NCA. El HCl, como se ha mencionado anteriormente, puede iniciar la autodegradación del monómero NCA. En esta invención, se ha incorporado

el limoneno a las condiciones de reacción para neutralizar el HCl por adición a los dobles enlaces de la molécula. No se pueden utilizar aminas u otras bases fuertes debido a que atacarían al monómero formado, dando lugar a su descomposición. Por el contrario, el limoneno (casi no nucleofílico/básico) actúa como un neutralizador de HCl. En el siguiente esquema se muestra el mecanismo de acción del limoneno.



La ausencia de HCl en los NCAs purificados se confirma mediante el uso de una disolución de nitrato de plata. La presencia de HCl puede ser identificada mediante la precipitación de cloruro de plata cuando se añaden unas gotas de una disolución 1M de AgNO<sub>3</sub> sobre una disolución de monómero. La pureza del monómero es un criterio indispensable a la hora de asegurar su almacenamiento a largo plazo. Para comprobarlo se realizaron estudios de estabilidad del monómero en diferentes condiciones de almacenamiento. Los resultados se muestran en la tabla siguiente donde el símbolo “-” significa que el monómero se encontró polimerizado/ descompuesto y el “+” que el monómero se encontraba estable.

**Tabla 2.** Estudio de estabilidad de NCAs en diferentes condiciones de almacenamiento.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento (días)							
	5 d	6 d	7 d	8 d	10 d	11 d	20 d	50 d
T.A	-	-	-	-	-	-	-	-
T.A/Ar	+/-	-	-	-	-	-	-	-
4°C	+	+	+/-	-	-	-	-	-
4°C/Ar	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
-23°C	+	+	+	+	+	+	+	+
-23°C/Ar	+	+	+	+	+	+	+	+

T.A: Temperatura ambiente

Por lo tanto, se estableció en el protocolo estándar el almacenamiento del monómero a temperatura de -23°C y condiciones de atmósfera inerte.

Método experimental:

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, provisto de un agitador magnético, una columna de reflujo, un embudo de adición compensada y una entrada y salida de argón, se añadió H-L-Glu(OBzl)-OH(17g, 71.66 mmol). El sistema se purgó con Ar durante 5 minutos. Posteriormente se añadió THF (120 mL, anhidro) y la mezcla se calentó a 60°C. A continuación, se añadió limoneno (11.6 mL, 71.66 mmol, 1Eq) a la suspensión, continuando la agitación antes de añadir las cantidades correspondientes de difosgeno (5.2 mL, 8.5g, 43 mmol, 0.6 Eq) disuelto en THF (10 mL, anhidro) mediante un embudo de adición durante un periodo de 10 minutos. La reacción se dejó agitar durante 2 horas a 60°C con constante purga de Ar, dando lugar a una disolución completamente clara. La mezcla de reacción se burbujeó con Ar para eliminar el HCl remanente durante 2 horas, mientras que la salida de Ar se conectó directamente a una disolución 1M de NaOH para neutralizar el gas. Posteriormente, el volumen de la reacción se concentró a un cuarto de la mitad del volumen original y se añadieron 32 mL de acetato de etilo. El contenido de la reacción se precipitó en hexano frío (200 mL) para dar lugar a un precipitado blanco que se aisló por filtración y se lavó con hexano frío.

El sólido se recrystalizó en tolueno (50 mL, anhidro) y THF (30 mL, anhidro), bajo atmósfera inerte (N<sub>2</sub> o Ar) usando un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL provisto de un agitador magnético, una columna de reflujo y una salida y entrada de argón, induciendo la cristalización mediante la adición gota a gota de hexano frío (27 mL). La solución se almacenó durante una hora a 4°C y posteriormente a -20°C durante una noche. Finalmente, los cristales blancos formados se filtraron bajo condiciones de atmósfera inerte usando técnicas Schlenk y fueron almacenados a -20°C.

Para asegurar que el HCl residual se ha eliminado por completo, 2-4 mg de NCA se disolvieron en 0.5 mL de THF y fueron añadidos a una 1 mL de una disolución 1M de nitrato de plata, sin que se produzca ningún precipitado. Cuando los iones Ag<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> coinciden en disolución dan lugar a la formación de la sal insoluble AgCl, que puede ser fácilmente detectada. Otro control se basa en el chequeo de la solubilidad en THF ya que mientras que el monómero es

completamente soluble en THF, y se puede apreciar una ligera turbidez en la disolución si no está completamente libre de hexano (dicha turbidez debe desaparecer al calentar), una clara precipitación se observa si hay presencia de material polimérico o de partida (ambos no solubles en THF).

5 Rendimientos: 70-80 %. Punto de fusión: 93.4°C. Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>. Bencil 3-(2,5-dioxoxazol-4-il)propanoato. Peso Molecular: 263.25 g/mol <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.29 (m, 5H), 6.84 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.32 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 2.52 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.31 – 1.94 (m, 2H). El espectro de <sup>1</sup>H -RMN del producto puro se adjunta en la Figura 1.

### Método general para la preparación de sales de BF<sub>4</sub><sup>-</sup>

#### 1. Síntesis de la sal tetrafluoroborano de n-butilamonio

10 Se disolvió n-butilamina (200 mg, 2.7 mmol) en 1 mL de dietil eter, y 442 mg (2.7 mmol) de complejo del ácido tetrafluorobórico, HBF<sub>4</sub>.Et<sub>2</sub>O, se añadieron a la disolución para dar lugar a la formación de un sólido blanco en rendimiento casi cuantitativo. El producto se filtró y recristalizó dos veces de acetato de etilo. Posteriormente, el producto se secó a alto vacío y se almacenó a -20°C. Rendimiento: 80-90%. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.58 (s, 3H), 2.84 – 2.71 (m, 2H), 1.56 – 1.43 (m, 2H), 1.39 – 1.25 (m, 2H), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 38.64, 29.09, 19.08, 13.49. EA: C: 29.61% (calc.: 29.85%), H: 7.27% (calc.: 7.51%), N: 8.60% (calc.: 8.70%).

#### 2. Síntesis de la sal tetrafluoroborano de neopentilamonio

20 A 5 ml (5.59 g, 36.74 mmol) del complejo del ácido tetrafluorobórico, HBF<sub>4</sub>(Et<sub>2</sub>O), se añadieron 4.31 ml (3.20 g, 36.74 mmol) de neopentilamina. La adición resultó en la formación de un precipitado blanco. Tras eliminación del disolvente el sólido se recristalizó dos veces de acetato de etilo y lavado con ciclohexano. Finalmente, el producto se secó a vacío. Rendimiento: 80-90% de sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.58 (s, 3H), 2.63 (s, 2H), 0.93 (s, 9H), <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 49.94, 30.21, 26.78 EA: C: 34.35% (calc.: 34.43%), H: 7.99% (calc.: 8.06%), N: 8,07% (calc.: 8.00%).

#### 3. Síntesis de la sal tetrafluoroborano de metoxipolietilenglicolamonio

25 MeO-PEG(2000)-amina (600mg, 0.3 mmol, 1892 g/mol) se disolvió en 2 mL de THF y se añadió a la disolución 53.4 mg (0.3 mmol, 45 µL) del complejo del ácido tetrafluorobórico, HBF<sub>4</sub>.Et<sub>2</sub>O, dando lugar a la formación de una sal ligeramente amarilla en rendimiento cuantitativo. Tras eliminar el disolvente el producto se secó bajo alto vacío y se almacenó a -20°C. Rendimiento: 80-90% .<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):δ (ppm): 7.69 (s, 3H), 3.78 – 3.70 (m, 2H), 3.52 (d, J = 5.4 Hz, 139H), 3.47 – 3.39 (m, 6H), 3.24 (s, 3H), 3.06 – 2.91 (m, 2H).

#### 30 Procedimiento general para la polimerización de NCAs. Síntesis de poli-y-bencil-L-glutamato bajo condiciones de atmósfera inerte usando técnicas Schlenk.

35 Bencil L-Glutamato NCA (0,5g, 1,9 mmol, Mw=264 g/mol) se añadió a un Schlenk provisto con un agitador magnetico, un tapón y se purgó 3 veces con ciclos vacío/argón, bajo un flujo de Ar. El sólido blanco se disolvió en 5 mL del correspondiente disolvente recién destilado. Acto seguido, se añadió el iniciador y la mezcla de reacción se dejó agitando a 40°C en un baño de aceite durante 3 días bajo condiciones de atmósfera inerte. Tras tres días de reacción, la disolución se precipitó en 40 mL de éter frío dando lugar a un sólido blanco en suspensión que se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sólido se suspendió en agua milliQ y se liofilizó.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 8.58 (s, 1H), 7.42 (s, 5H), 5.19 (s, 2H), 4.21 (s, 1H), 2.81 (s, 2H), 2.45 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMF-d<sub>7</sub>) δ 175.94 (s), 172.26 (s), 162.77 – 162.18 (m), 161.98 (s), 136.76 (s), 128.87 – 127.75 (m), 66.05 (s), 57.13 (s), 35.41 - 34.17 (m), 32.48 (s), 30.84, 30.30 – 29.04 (m), 27.28 (s), 25.99 (s).

40 \*Nota: Las correspondientes señales del iniciador dependen del iniciador usado en cada caso: n-butilamonio, neopentilamonio, metoxietilenglicolamonio.

#### Cinética de polimerización NCA.

45 y-bencil L-glutamato N-carboxianhidrido (0.6g, 2.27 mmol, Mw=264 g/mol) se disolvió previamente en 6 mL de DMF previamente destilado. El contenido se repartió en 6 Schlenk provistos de un agitador magnético y un tapón en bajo condiciones de atmósfera inerte. Posteriormente, se preparó una disolución en DMF, del iniciador y la cantidad correspondiente del mismo se añadió a cada Schlenk. Las mezclas de reacción se dejaron agitando durante 4 días a 40°C en un baño de aceite bajo condiciones de atmósfera inerte a presión constante. Se tomaron puntos para la construcción de la cinética de polimerización a tiempos siguientes: 14, 22, 38, 46, 70, y 96 horas, por precipitación de los polímeros en éter dietílico tres veces, liofilización de la muestra en agua, y análisis del peso molecular por GPC 50 eluyendo con DMF/LiBr.

Como ejemplo, en la tabla 3 (a continuación) se muestran algunos resultados obtenidos en diferentes polimerizaciones con varios iniciadores basados en sales de BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, dos de ellos son iniciadores pequeños, como tetrafluoroborano de n-butilamonio o neopentilamonio, que dan lugar a homopolímeros de glutamato, y un macroiniciador

5 basado en metoxipoli(etilenglicol) de peso molecular cercano a 2.000 y PDI: 1.03, dando lugar a copolímeros híbridos dibloque PEG-poli(γ-bencil-glutamatos). El iniciador neopentilamonio se usó reemplazando al de n-butilamina para así facilitar la caracterización del polímero por 1H-NMR gracias a una mejor asignación del grado de polimerización resultante. Esto se debe a la presencia de 9 protones químicamente equivalentes en el iniciador (los pertenecientes a los tres grupos metilo) lo que conlleva un aumento en la sensibilidad de la caracterización del polímero por H-RMN.

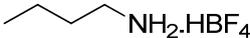
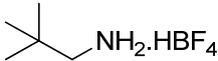
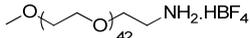
Tabla 3:

**P:** polímero; **[M]/[I]:** cociente monómero Iniciador; **DP:** grado de polimerización (% of [M]/[I]); **Mw:** peso molecular medio en peso; **Mn:** peso molecular medio en número; **PDI:** índice de polidispersidad (cociente Mw/Mn que proporciona una medida de dispersidad D) y **DP** se ha calculado de la forma siguiente:

10

$$DP = \frac{[M]}{[I]} \cdot conv$$

**Tabla 3.** Polimerizaciones de NCA: polimerización en DMF con iniciadores tetrafluoroborano de n-butilamonio, neopentilamonio y mPeg(2000)amonio a 40°C.

Iniciador	P	[M]/ [I]	DP (calc.)	DP <sup>1</sup> H-NMR	[C] M	t (d)	Rto (%)	Mn KDa	Mw KDa	PDI
	7	50	32	29	0.38	3	64	6.7	7.4	1.1
	8	100	64	60	0.38	3	64	13.8	15.2	1.1
	9	200	126	107	0.38	3	63	16.1	17.7	1.2
	10	300	147	143	0.38	3	49	20.7	23.5	1.1
	11	400	288	212	0.38	3	72	31.6	37.9	1.2
	12	800	424	-	0.38	3	53	48.4	63.0	1.2
	13	1600	816	-	0.38	6	51	94.4	112.2	1.2
	14	50	40	43	0.38	3	80	7.1	8.6	1.2
	15	100	81		0.38	3	81	14.4	18.7	1.2
	16	200	176	105	0.38	3	88	17.86	22.31	1.2
	17	1200	960	-	0.38	3	80	156.5	191.1	1.2
	18	50	36	38	0.38	3	73	7.0	9.4	1.2
	19	100	81	79	0.38	3	81	13.9	18.1	1.2
	20	200	160	148	0.38	3	80	18.4	24.7	1.2

15

Se adjuntan en la Figura 2, los espectro de <sup>1</sup>H-RMN de las polimerizaciones realizados con las sales de n-butil tetrafluoroborano a diferentes proporciones del cociente [M]/[I] en DMF; Figura 3 la representación del cociente [M]/[I] frente al Mn obtenido por GPC y Figura 4 diagramas de elución obtenidos por GPC de varios poliglutamatos con diferentes pesos moleculares.

20

Con DMF como disolvente se obtuvieron muestras monomodales con polidispersidades de bajas a muy bajas en todos los casos usando la técnica de polimerización de NCA basada en el uso de sales de BF4-. Siguiendo con el proceso de optimización, el efecto de la temperatura también se estudió, concluyéndose que el uso de temperaturas

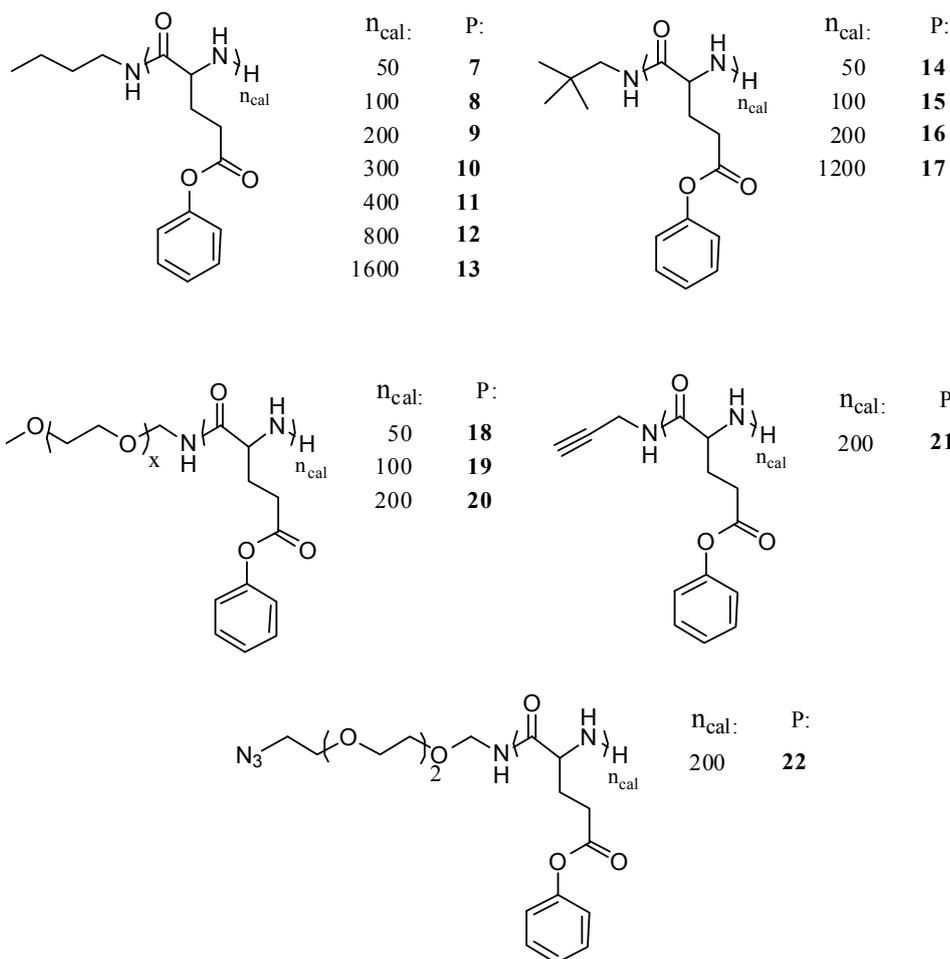
superiores a 60°C no se lograron buenos resultados en cuanto al control en la polimerización. Por otro lado, cuando se aplican bajas temperaturas, manteniendo como tiempo de reacción 3 días, se obtienen rendimientos relativamente bajos. Así, se estableció como temperatura idónea 40°C. Parámetros como la concentración en el medio de reacción se optimizaron del mismo modo, estableciéndose como óptima 0.38 M con respecto al monómero.

5 Para comprobar si la metodología propuesta es aplicable a cualquier tipo de iniciador, se probaron diferentes iniciadores basados en sales de  $\text{BF}_4$  como propargil- $\text{NH}_3\text{BF}_4$  y  $\text{N}_3\text{EG}(2)$   $\text{NH}_3\text{BF}_4$ . El uso de estas sales como iniciadores permite el acceso a polímeros con grupos alquino y azida en el extremo C-terminal del polímero que podrían usarse para una posterior bioconjugación. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos con los diferentes iniciadores usados.

10 **Tabla 4.** Polimerización NCA con diferentes sales de tetrafluoroborano como iniciadores a 40°C durante 3 días en DMF como disolvente y relación [monomero/iniciador]=200

Iniciador	P	DP (calc.)	DP ( $^1\text{H-NMR}$ )	[C] M	t (d)	Rto (%)	Mn by GPC (KDa)	Mw By GPC	PDI
	9	126	107	0.38	3	63	16.1	17.7	1.2
	16	176	105	0.38	3	88	17.86	22.31	1.2
	20	160	148	0.38	3	80	18.4	24.7	1.2
	21	168	-	0.38	3	84	16.5	22.1	1.3
	22	154	-	0.38	3	77	18.3	24.5	1.3

15 **Nota:** en el caso de los iniciadores EG, y propargilamina, el grado de polimerización DP no se puede extraer del espectro de  $^1\text{H-NMR}$  debido a solapamiento de señales con la señal del agua.



Donde

$n$  representa el número de unidades de  $\gamma$ -bencil-glutamato en el polímero, de 1 a 1000

Las cantidades usadas habitualmente para cada polimerización se encuentran entre 0,5-1 gramo de monómero. Para validar la posibilidad de una aplicación industrial de la reacción y teniendo en cuenta que el ácido poliglútamico es la base polimérica de varios conjugados polímero-fármaco, la síntesis se escaló. Por ello, una vez que todos los anteriores resultados preliminares se evaluaron, la reacción se escaló cuatro veces, a 5 gramos, utilizando las condiciones optimizadas. En todos los casos, las PDI de los polímeros obtenidos estuvieron en el rango de 1.2-1.3 con rendimientos de reacción de entre 80-90% y pesos moleculares  $M_n$ : 31.47 KDa, PDI:1.26, ( $[M]/[I]=333$ );  $M_n$ :26.06 KDa, PDI:1.27, ( $[M]/[I]=300$ );  $M_n$ : 15.23 KDa PDI:1.18 ( $[M]/[I]=200$ ) and  $M_n$ : 7.08 KDa PDI:1.19, ( $[M]/[I]=50$ ) respectivamente como fueron determinados por GPC. En la Figura 5 se incluye espectro de  $^1H$ -RMN del ácido  $n$ -butil- $\alpha$ -poliglútamico correspondientes al lote de escaldado de 5 gramos tras la desprotección. DP=252 como se confirma por RMN.

#### Métodos generales para la desprotección de poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamatos)

Se estudiaron dos metodologías para la eliminación de los grupos bencilo protectores. La primera consiste en el uso de un medio ácido como HBr/TFA y la segunda, el uso de atmósfera de reducción de hidrógeno con  $Pd(OH)_2/C$  como catalizador. Ambos métodos dieron lugar a la completa desprotección de los grupos bencilo, sin embargo, la simplicidad en las condiciones de reacción así como el proceso de purificación y un mayor rendimiento hizo que se seleccionara la primera. Además, el uso de carbón activo en la segunda presenta el inconveniente adicional de la eliminación del catalizador, lo cual nunca es un factor trivial y podría ser la causa de los pobres rendimientos obtenidos.

#### 20 Desprotección de poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamatos) reduciendo con $Pd(OH)_2$ sobre carbón en DMF:

Se disolvieron 100 mg (0.0035 mmol,  $M_w$ : 28251 g/mol) de poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamato) en 15 mL de DMF absoluto, en un matraz de fondo redondo provisto de un septum y una agitador magnético. Seguidamente se añadió paladio sobre carbónactivo al matraz que se purgó después con  $N_2$ , y posteriormente con  $H_2$ . La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante dos días en atmósfera inerte proporcionada por un globo de hidrógeno. El producto se precipitó sobre un gran exceso de éter que tras centrifugación y eliminación del sobrenadante mediante percolado en celita, se eluyó con agua ácida a pH=3. Como resultado, se obtuvo ácido poliglútamico como polvo

blanco. Rendimiento: 40%.

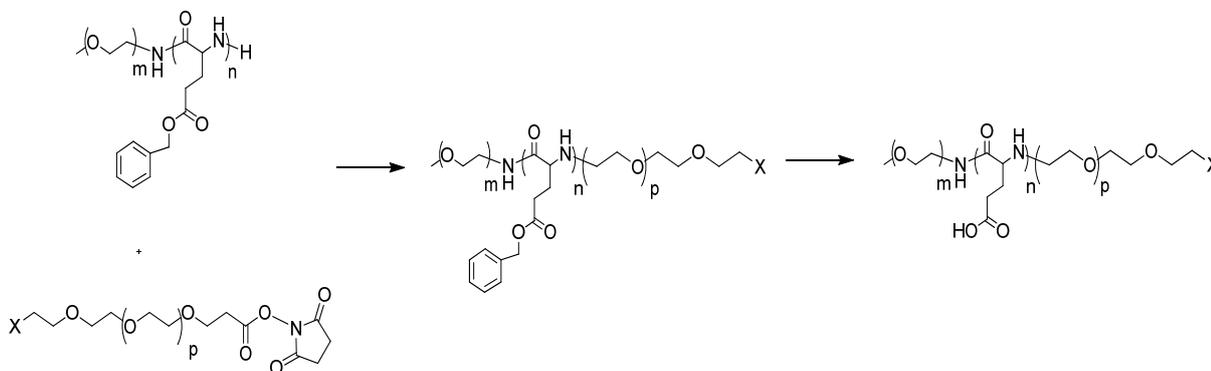
#### Desproteccion de Poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamato) con HBr en ácido trifluoroacético:

Se disolvieron 100 mg (0.0035 mmol, Mw: 28251 g/mol) de poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamato) en 3 mL en ácido trifluoroacético (TFA) en un matraz de fondo redondo provisto con un tapón y un agitador magnético. Posteriormente, se añadieron 150 mg de HBr 48% (0.91 mmol, 2 equivalentes por grupo carboxilo), y la mezcla anaranjada se dejó agitar durante 5-8 horas. Posteriormente, el producto se precipitó en un gran exceso de dietil-éter dando lugar a un sólido blanco que fue centrifugado y lavado tres veces con dietil-éter. Después, el producto se purificó por precipitación ácido-base ( $\text{NaHCO}_3$  /HCl 6M, y se dializó en agua para dar lugar a formar la sal sódica del poliglutamato. Finalmente, para obtener la forma ácida, el producto se precipitó a pH 3 mediante la adición de algunas gotas de HCl 6M. Rendimiento: cuantitativo.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4.31-4.26 (m, 1H), 2.38-2.14 (m, 2H) 2.10-1.80 (m, 2H)

#### Arquitecturas versátiles (Polímeros dibloques tribloques y multibloque).

#### Síntesis de tribloques (TBs) protegidos con grupos bencilo PEG-PGA-PEG:

Los sistemas tribloque (TB) de la presente invención fueron obtenidos mediante la reacción entre los dibloques (DB) PEG-PGA, previamente obtenidos utilizando n-PEG(2000) en su sal de tetrafluoroborano de amonio como iniciador, y un derivado de PEG funcionalizado con un grupo carboxilo activado como-NHS. El método general se detalla a continuación:



donde:

- X representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquilo, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados)
- m representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG utilizado como primer bloque, de 1 a 500
- n representa el número de unidades de  $\gamma$ -bencil glutamato del bloque peptídico. 1 a 1000
- p representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG del tercer bloque, de 1 a 500

Para la obtención de TB50: se disolvieron 750 mg (0.058 mmol, Mw= 12854 g/mol) de DB50 en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro, el pH de la disolución fue ajustado a 8.0 con DIEA y a continuación se añadieron al matraz de reacción 209 mg (0.104 mmol, Mw= 2007 g/mol) de mPEG-NHS. La reacción se dejó bajo agitación toda la noche. Después, el producto fue purificado mediante extracciones: primero con una disolución de NaOH 0.1N, seguida de una extracción con cloruro sódico y finalmente con HCl 0.1N. La fase orgánica fue recogida, secada sobre  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , filtrada y concentrada mediante vacío. La solución concentrada fue precipitada sobre dietiléter frío. Tras 2h a  $-20^\circ\text{C}$ , el polímero precipitado fue filtrado, lavado y secado a vacío.

Siguiendo el mismo método se obtuvieron también TB100, TB200, TB400 y TB800, con las cantidades y rendimientos que se muestran en la tabla 5 siguiente:

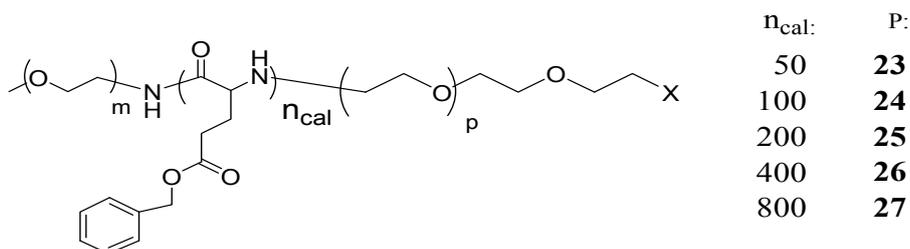


Tabla 5:

PRODUCTO	P	REACCIÓN		RENDIMIENTO
		mg DB/mmol	mg PEG/mmol	
TB50	23	750 / 0.058	209 / 0.104	90%
TB100	24	520 / 0.022	78 / 0.039	85.5 %
TB200	25	1572.4 / 0.034	123 / 0.061	96%
TB400	26	560 / 0.0062	22.3 / 0.011	88%
TB800	27	1260.2 / 0.0071	25.4 / 0.0126	82%

5 Los productos obtenidos con el procedimiento de síntesis general detallado previamente fueron caracterizados mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) y resonancia magnética nuclear  $^1\text{H-NMR}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

10 Posteriormente, TB50 fue disuelto en 5-7mL de ácido trifluoroacético (TFA). Tras su completa disolución, HBr 48% w/v en ácido acético fue añadido al matraz de reacción. La mezcla se dejó bajo agitación durante 16 horas. A continuación, el polímero fue precipitado sobre dietiléter frío. Tras 2h a  $-20^\circ\text{C}$ , el polímero precipitado fue recuperado tras centrifugar la mezcla a 4000rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El tribloque desprotegido (TBd) fue almacenado tras ser secado a vacío.

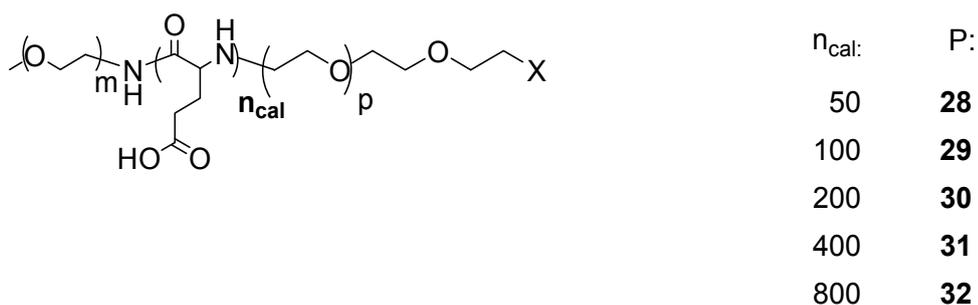


Tabla 6:

15

PRODUCTO	P	REACCIÓN		RENDIMIENTO
		mg DB/mmol	ml HBr/mmol	
TB50d	28	735 / 0.05	1.686 / 10	90%
TB100d	29	444 / 0.017	1.146 / 6.8	95%

TB200d	30	1503.5 / 0.031	4.256 / 6.31	90%
TB400d	31	481.7 / 0.0053	1.42 / 8.42	90%
TB800d	32	949.2 / 0.0053	2.858 / 16.9	90%

Los productos obtenidos con el procedimiento de desprotección general detallado previamente fueron caracterizados mediante cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) y resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H-NMR en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

5 Finalmente y con objeto de obtener la forma del TB soluble en disolución acuosa, el compuesto fue disuelto en una cantidad equivalente de NaHCO<sub>3</sub> 1M y H<sub>2</sub>O destilada. Tras solubilizar el polímero, la disolución fue purificada mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC, Sephadex G25) utilizando H<sub>2</sub>O destilada como eluyente. Se recogieron 50 fracciones de 3mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuotas, de 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y posteriormente se analizaron por <sup>1</sup>H-NMR en D<sub>2</sub>O.

10 En el caso de añadir un grupo funcional opcional en el extremo del segundo bloque de PEG, la síntesis del tribloque o del dibloque se lleva a cabo mediante la conjugación de una unidad de PEG bifuncional.

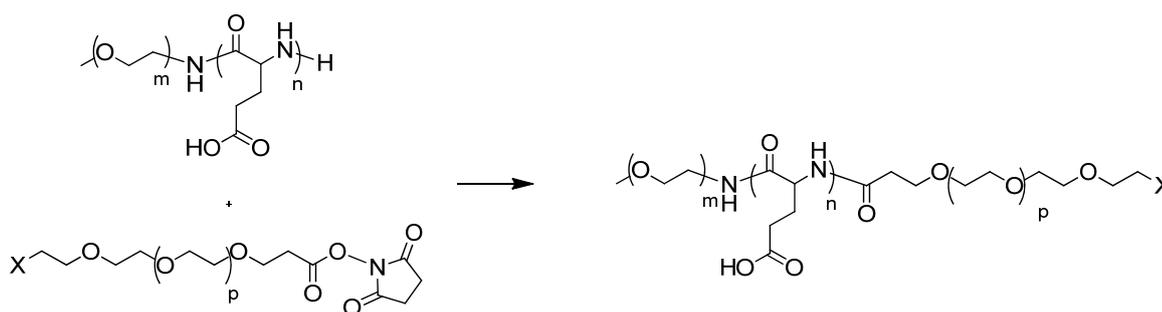
15 Como se cita anteriormente, PEG-PGA o n-BuPGA se obtienen mediante la reacción del monómero NCA-L-Glu-OBn con el iniciador MeO-PEG-NH<sub>3</sub>BF<sub>4</sub> ó nBuBF<sub>4</sub>, respectivamente. Variando la proporción inicial entre PEG iniciador:monómero, es posible obtener dibloques con diferentes unidades de ácido glutámico (como por ejemplo, n= 100, 200, 400 o 800).

20 El dibloque obtenido se encuentra en su forma protegida y los grupos protectores –OBn son eliminados en el paso previo a la introducción del nuevo bloque polimérico. Este segundo bloque de PEG es un derivado bifuncional COOH-PEG-SH cuyos grupos terminales se activan para la obtención final de NHS-PEG-SS-4TP. Esta doble activación, previa al paso de conjugación al bloque polipeptídico, se realiza para asegurar rendimientos elevados y evitar reacciones de entrecruzamiento.

Este último bloque confiere a la estructura final del TB (o del DB en el caso de nBuPGA) un punto adicional de conjugación semitelequímica capaz de proporcionar conjugaciones específicas y selectivas al grupo funcional activado introducido, mediante la formación de puentes disulfuro.

## 25 Protocolo experimental detallado

### Síntesis de PEG-PGA<sub>n</sub>-PEGA4TP (TB)



donde:

- 30 X representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquilo, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados)
- m representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG utilizado como primer bloque, de 1 a 500
- n representa el número de unidades de  $\gamma$ -bencil glutamato del bloque peptídico, de 1 a 1000
- 35 p representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG del tercer bloque de 1 a 500

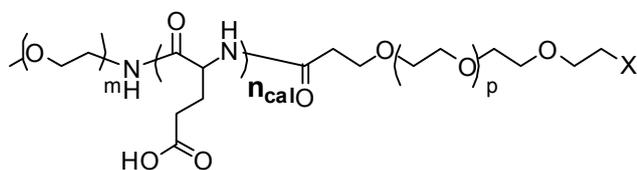
En un matraz de fondo redondo de 50mL, 1g de DB previamente desprotegido (como ejemplo, n=200 unidades de GA; 1eq, MW=27692g/mol) se disolvió en 20mL de DMF anhidro y el sistema se purgó con N<sub>2</sub>. En un

5 vial, 1.3 eq de NHS-PEG-SS-4TP (163.4 mg; MW=3480 g/mol) se disolvieron en 3mL de DMF anhidro y se purgó con N<sub>2</sub> antes de añadirlo al matraz de reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 8.0 con DIEA (1.5mL en este ejemplo) y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente y atmósfera inerte durante 72h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se redisolvió en el mínimo volumen de NaHCO<sub>3</sub> 1M y se purificó mediante SEC (Sephadex G25, ddH<sub>2</sub>O). Se recolectaron 50 fracciones de 2mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuota con 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y se analizaron por <sup>1</sup>H-NMR en D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H-RMN. (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ: 2.8-2.9 (4H, t, J=6.3 Hz, H<sub>6</sub>), δ: 3.3-3.8 (m, H<sub>3,4,5</sub>), δ: 7.4 (4H, d, J=4.5 Hz, H<sub>2,2</sub>), δ: 8.4 (4H, d, J=4.5 Hz, H<sub>1,1</sub>).

10 Para confirmar el porcentaje de grupos 4TP introducidos en la conjugación, se realizaron ensayos espectrofotométricos, uno de cuantificación directa (liberación del grupo 4TP) y otro de cuantificación indirecta (ensayo Ellman). El producto se almacenó para posteriores análisis y conjugaciones. Rendimiento: 35%, activación 90%, tal y como se muestra en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7.

Producto		P	t (d)	4TP activación (%)	Rto. (%)
PEG-PGA <sub>100</sub> -PEG4TP	TB100	33	3	-	-
PEG-PGA <sub>200</sub> -PEG4TP	TB200	34	3	90	35
PEG-PGA <sub>400</sub> -PEG4TP	TB400	35	3	-	-
PEG-PGA <sub>800</sub> -PEG4TP	TB800	36	3	-	-

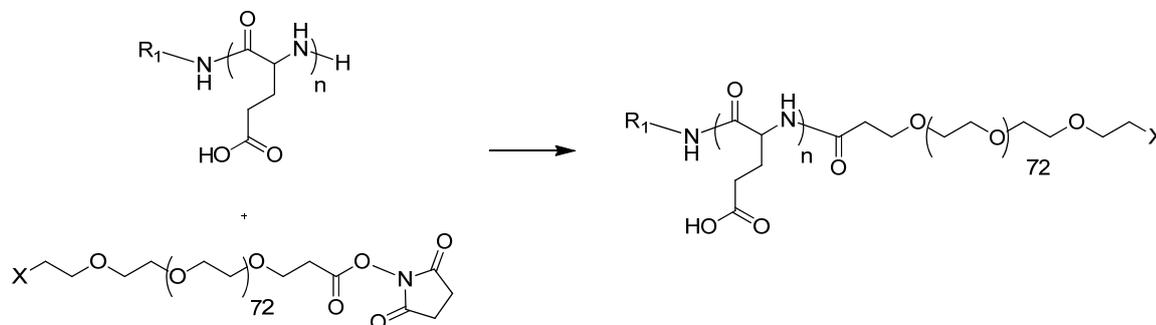


n <sub>cal</sub> :	P:
100	<b>33</b>
200	<b>34</b>
400	<b>35</b>
800	<b>36</b>

15

### Síntesis de nBuPGA<sub>n</sub>-PEG4TP (DB)

El método general utilizado para la síntesis de dibloques se detalla a continuación:



20 donde:

- R1 representa un grupo alquilo, por ejemplo n-butilamina, neopentil amina; una cadena carbonada (saturada y/o insaturada) con y sin presencia de átomos electronegativos (i.e. O en PEG-NH2)
- X representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados,

alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados).

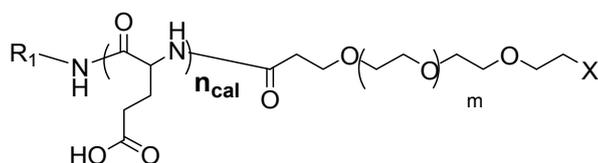
n representa el número de unidades de  $\gamma$ -bencil glutamato del bloque peptídico, de 1 a 1000

5 En un matraz de fondo redondo de 50mL, 100mg de homopolímero desprotegido nBu-PGA con 200unidades de ácido glutámico (1g, 25857g/mol) se disolvió en 8mL DMF anhidro a temperatura ambiente y el sistema se purgó con N<sub>2</sub>. En un vial, 1.5 eq de NHS-PEG-SS-4TP (17 mg; 3357 g/mol) se disolvieron en 2mL DMF anhidro y se purgó con N<sub>2</sub> antes de añadirlo al matraz de reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 8.0 con DIEA y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente y atmósfera inerte durante 72h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se redisolvió en el mínimo volumen de NaHCO<sub>3</sub> 1M y se purificó mediante SEC (Sephadex G25, ddH<sub>2</sub>O). Se recolectaron 50 fracciones de 2mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuota con 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y se analizaron por <sup>1</sup>H-NMR en D<sub>2</sub>O. Para confirmar el porcentaje de grupos 4TP introducidos en la conjugación, se realizaron ensayos espectrofotométricos, uno de cuantificación directa (liberación del grupo 4TP) como indirecta (ensayo Ellman). El producto se almacenó para posteriores análisis y conjugaciones. Rendimiento=64%, activación 90%, tal y como se muestra en la Tabla 8.

15

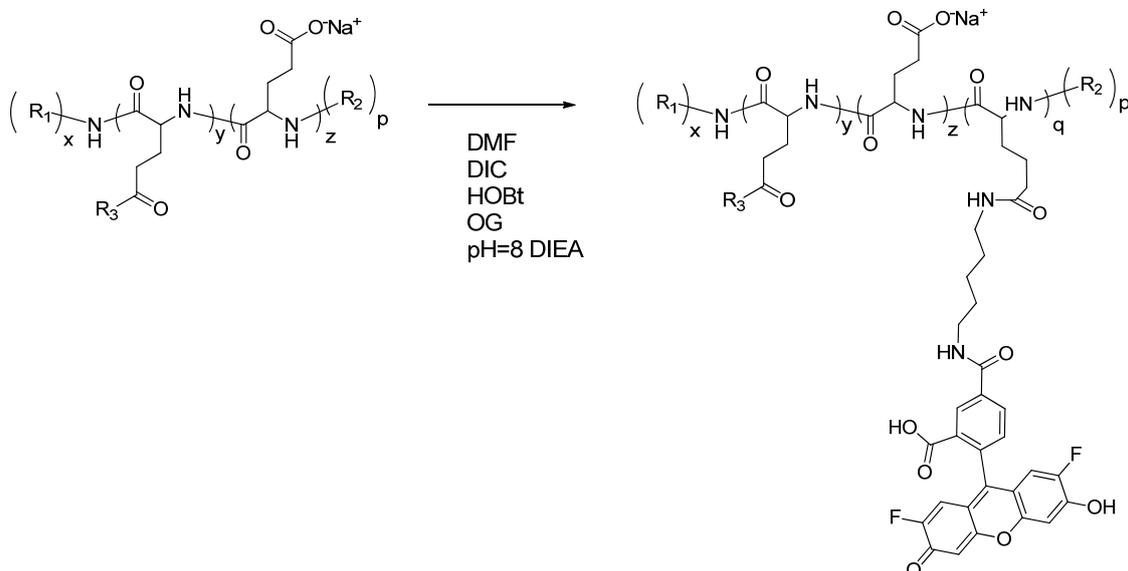
**Tabla 8:**

Producto		P	t (d)	4TP activación (%)	Rto (%)
nBuPGA <sub>100</sub> -PEG4TP	DB100	37	3	90	64
nBuPGA <sub>200</sub> -PEG4TP	DB200	38	-	-	-
nBuPGA <sub>400</sub> -PEG4TP	DB400	39	-	-	-
nBuPGA <sub>800</sub> -PEG4TP	DB800	40	-	-	-



n <sub>cal</sub> :	P:
100	<b>37</b>
200	<b>38</b>
400	<b>39</b>
800	<b>40</b>

20 El grupo funcional -SS-4TP permitirá, tanto en TB como en DB-SS-4TP, la subsecuente conjugación de ligandos activos incluyendo péptidos, proteínas o anticuerpos mediante un enlace por puente disulfuro.

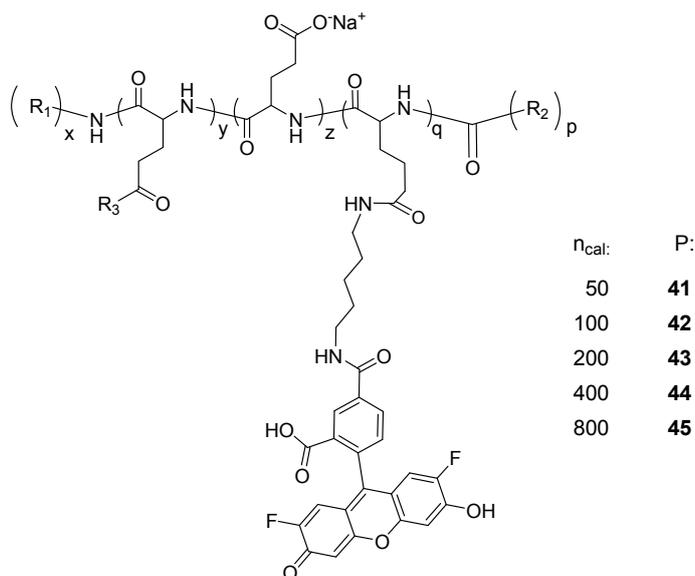
**Química de bioconjugación.****Método general para etiquetado con Oregon Green cadaverina.**

donde:

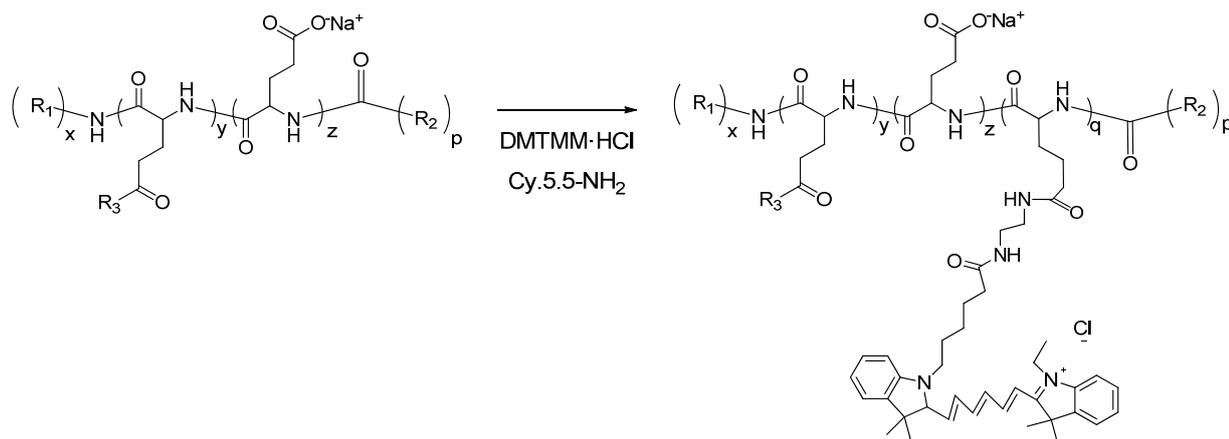
- 5 R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).
- 10 R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.
- 15 R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.
- x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500
- y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500
- 20 z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000
- p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

25 En un matraz de fondo redondo de dos bocas, se disolvieron 29mg de ácido poliglútamico (0.225 mmol GA, 1eq) en 1.5mL de DMF anhidro bajo flujo continuo de N<sub>2</sub>. Se añadieron a la reacción 1.12μL de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (0.85mg, 0.00674mmol, d=0.806 g/ml, Mw=126g/mol, 0.03eq) y tras 5 minutos de agitación, se añadió 1mg (0.00674mmol, Mw=135,1g/mol, 0.03eq) de hidroxibenzotriazol (HOBt) sólido. La reacción se dejó bajo agitación durante 10 minutos y después se añadió 1mg (2,01·10<sup>-3</sup>mmol, Mw=496,47g/mol, 0.0089eq) de Oregon Green cadaverina. El pH se ajustó a 8.0 con DIEA (100uL aprox.). La mezcla se dejó bajo agitación durante toda la noche protegida de la luz y bajo atmósfera inerte. Finalmente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 300uL de agua y 50uL de NaHCO<sub>3</sub> 1M. La disolución se purificó mediante SEC (Sephadex G25/PD10) utilizando ddH<sub>2</sub>O como eluyente. La carga de OG se determinó por espectroscopia de fluorescencia (λ<sub>ex</sub>=485nm, λ<sub>em</sub>=535nm) monitorizando la señal de cada fracción de la columna. Eficiencia general de etiquetado: 80-90%. Rendimiento de la reacción: 80-85%.

30



**Método general para etiquetado con Cyane5.5.**



5 donde:

- R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).
- 10 R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.
- 15 R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.
- x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500
- 20 y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500
- z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, 59.6mg de DB200 (0.355mmol COOH) se disolvieron en 8mL de ddH<sub>2</sub>O y se dejó bajo agitación. En un vial aparte, se disolvieron 3.8mg de Cy5.5-NH<sub>2</sub> (1.8% mol, Mw=588.36g/mol) en 13mL de ddH<sub>2</sub>O que posteriormente se añadieron a la reacción. A continuación 2.9mg de DMTMM·HCl (Mw=276.72g/mol, 1.5eq) se añadieron a la reacción. La mezcla se dejó bajo agitación 48h protegida de la luz a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. La reacción se monitorizó por cromatografía de capa fina (metanol:ácido acético). Finalmente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 300uL de agua y se purificó mediante SEC (Sephadex G25/PD10) utilizando H<sub>2</sub>O destilada como eluyente. La carga de Cy5. se determinó mediante fluorímetro ( $\lambda_{exc}$ . 598 nm,  $\lambda_{em}$  655 nm) monitorizando la señal de cada fracción de la columna. Eficiencia general de etiquetado: 90.86% (1.63%mol Cy5.5). Rendimiento de la reacción: 60%.

#### **Modificación post-polimerización de bloque polipeptídico de ácido poliglutámico (PGA) mediante química ácido-base.**

La modificación post-polimerización puede representar una aproximación atractiva para la síntesis de polímeros funcionales superando las limitaciones en muchas técnicas de polimerización controlada, la incompatibilidad de la presencia de diversos grupos funcionales en muchas técnicas de polimerización controlada. Debido a todas las ventajas expuestas en la metodología descrita anteriormente para la polimerización de NCAs, posteriormente se llevó a cabo un proceso de exploración de la modificación post-polimerización de los polímeros bien definidos obtenidos en las diversas polimerizaciones con vistas a la incorporación de funcionalidades para conjugaciones específicas a posteriori.

Para ello se llevó a cabo tanto PEGilación de PGA como la incorporación de propargilamina y aminoPEG-azidas. Por un lado, la PEGilación es una técnica bien conocida como el proceso de introducción covalente de cadenas poliméricas de PEG a otra molécula, normalmente un fármaco o una proteína terapéutica. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede “enmascarar” al agente ocultándolo del sistema inmune del huésped (reduciendo inmunogenicidad y antigenicidad), aumenta el radio hidrodinámico del correspondiente agente (tamaño en disolución), lo que prolonga su tiempo de circulación reduciendo la excreción renal. La PEGilación puede también proporcionar solubilidad en agua de fármacos hidrofóbicos y proteínas. Por lo tanto, la introducción de unidades de PEG en la cadena polimérica no solo nos permitirá la introducción de un espaciador de PEG entre el polímero y el correspondiente agente bioactivo, sino que también puede modificar el comportamiento *in vivo*, la biodistribución y la aplicación terapéutica. Por otro lado, la modificación con grupos azida y alquino se eligió con la finalidad de obtener grupos funcionales adecuados para conjugación a través de química click de diversos agentes bioactivos con todos los beneficios que este tipo de química de conjugación ofrece.

#### **Método general para las técnicas de modificación post-polimerización.**

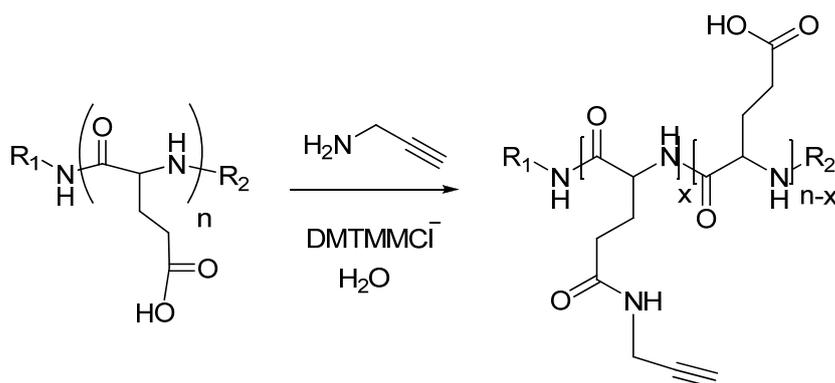
En un matraz de fondo redondo provisto de un agitador magnético y un tapón de vidrio, se suspendieron 200 mg de ácido poliglutámico (1.55 mmol de unidades de ácido glutámico) en 10 mL de agua milliQ. Posteriormente, se añadieron 128,7 mg de DMTMMCl- disuelto en 5 mL de agua milliQ. Tras 10 minutos de reacción se añadió la cantidad (0,93 mmol 0.6 eq) de la correspondiente amina y el pH de la reacción se ajustó a 8 mediante la adición de algunas gotas de una disolución 1M de NaHCO<sub>3</sub>. La reacción se dejó agitar durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, debido a que todos los subproductos son solubles en agua, el producto se purificó o por ultrafiltración (utilizando una membrana de tamaño de peso molecular 3000) o SEC (cromatografía por exclusión de tamaño) a través de columna de sephadex G25. Alternativamente el producto puede purificarse por precipitación ácido/base. Tras liofilizar la muestra en cualquiera de los casos, se obtuvo un sólido blanco amorfo.

Rendimiento: 80-90%. <sup>1</sup>H-NMR PGA modificado con propargilamina (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4.30 – 4.02 (m, 1H), 3.81 (s)\*, 2.48 (s)\*, 2.35 – 2.02 (m, 2H), 2.01- 1.65 (m, 2H). <sup>1</sup>H-NMR PGA modificado con PEG-azida (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4.28 - 4.07 (m, 1H), 3.65 - 3.51 (m)\*, 3.48 (t, J = 5.6 Hz)\*, 3.40 – 3.30 (m)\*, 3.25 (d, J = 4.9 Hz)\*, 2.29 – 2.00(m, 2H), 1.98 -1.65 (m, 2H). <sup>1</sup>H-NMR PGA modificado con PEG-oMe (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4.33-4.19 (m, 1H), 3.95 – 3.78 (m)\*, 3.77 – 3.49 (m)\*, 3.34 (s)\*, 2.41 – 1.76 (m, 4H)

\*El número de protones correspondiente a las integrales marcadas con \* depende del porcentaje de funcionalización en el polímero.

#### **Modificación post-polimerización con propargilamina.**

La modificación post-polimerización de PGA con propargilamina se llevó a cabo según lo descrito por “K. Thompson, S. Michelsen. J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem. 2006, 44, 126-136” con ligeras modificaciones. La activación de los grupos carboxílicos de la cadena del polímero PGA se llevó a cabo mediante el uso del cloruro de 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolina (DMTMMCl). Posteriormente, se añadió propargilamina al medio de reacción dando lugar al correspondiente polímero modificado con grupos alquino. El mecanismo de acción de DMTMMCl- se muestra posteriormente y consiste en la formación del correspondiente éster activado con liberación de 4-metilmorfolina en un primer paso. Este éster activado reacciona posteriormente con la correspondiente amina. Para ello es necesario ajustar el pH de la mezcla de reacción a 8, de manera que se favorece el carácter nucleofílico de la amina (a pH inferior la amina se encontraría protonada careciendo del mismo). Se muestra a continuación el esquema de reacción.



Donde

n representa el número de unidades de glutámico, de 1 a 1000

5 x representa el número de unidades de glutámico modificadas con propargilamina, de 1 a 1000

La reacción se dejó proceder durante 16 horas. Tras ello, se testaron diferentes procesos de purificación del producto resultante.

- 10 a) Uno de ellos se basa en la precipitación ácido/base del polímero de PGA. Este método tiene su fundamento en el hecho de que PGA es insoluble en agua cuando se encuentra protonado como ácido carboxílico, y es completamente soluble cuando se encuentra formando la sal sódica. Por lo tanto, puesto que todos los subproductos de reacción son solubles en agua, el polímero puede purificarse por precipitación en agua ácida (pH~3-4) y redisolución por basificación con una disolución de bicarbonato sódico. El proceso se repite tres veces para dar lugar a un polímero blanco tras liofilizar la muestra.
- 15 b) Ultrafiltración, usando una membrana con corte de peso molecular de 3.000 dio lugar también al compuesto puro tras liofilizar la muestra.
- c) El uso de columnas sephadex G25 de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) también se probó para la purificación del correspondiente producto dando lugar a una correcta separación por peso molecular. El compuesto se obtuvo puro en las primeras fracciones tras liofilizar la muestra.

20 En todos los casos el producto se obtuvo puro con rendimientos comparables de entorno al 80 %. Debe ser mencionado que el método de ultrafiltración es preferible cuando se preparan grandes cantidades del compuesto y Sephadex G25 (columnas comerciales PD10) son preferibles cuando se preparan pequeñas cantidades de producto. Sin embargo, los tres métodos son completamente válidos como ha sido comprobado en este trabajo. Una vez purificado, el contenido de grupos alquino en el polímero se determinó mediante la integración de las correspondientes señales de propargilamina en el espectro de <sup>1</sup>H-NMR en agua deuterada en comparación con las correspondientes señales de PGA. En concreto, el pico situado a 3.81 ppm se corresponde con los dos protones de los grupos CH<sub>2</sub> del residuo de propargilamina y la señal a 2.48 ppm se corresponde con el protón acetilénico del residuo de propargilamina en el polímero. Así, en comparación con las señales correspondientes al polímero de PGA puede calcularse el % de sustitución en cada polímero. Como ejemplo de <sup>1</sup>H-RMN se adjunta la Figura 6. Se sintetizaron diferentes polímeros con diferentes grados de sustitución. El grado de sustitución de acuerdo a las señales de H-RMN fue de aproximadamente un 60% del esperado por los equivalentes añadidos. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla inferior.

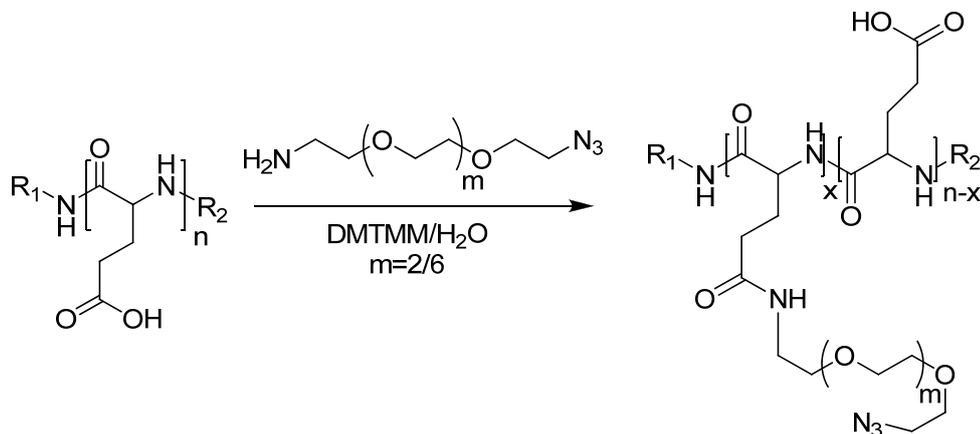
**Tabla 9:** Polímeros modificados con grupos alquino.

Polímero	Contenido alquino (calc.) (%)	Contenido alquino ( <sup>1</sup> H-RMN) (%)	Mn	Mw	PDI
	46	50	19250	25020	1.3
	47	30	18590	24170	1.3
	48	20	18230	23700	1.3

	49	10	6	17980	23370	1.3
--	----	----	---	-------	-------	-----

El peso molecular resultante se calculó teniendo en cuenta el % de unidades de ácido glutámico (GA).

### Modificación Post-polimerización con $\text{NH}_2\text{-PEG}(2)\text{-N}_3$ y $\text{NH}_2\text{-PEG}(6)\text{-N}_3$ .



Donde

- 5 n representa el número de unidades de glutámico, 1 a 1000  
 x representa el número de unidades de glutámico modificadas con Etilenglicol, de 1 a 1000

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la incorporación de unidades oligoetilenglicol azida en la cadena polimérica de PGA. Una vez purificados los polímeros modificados, el contenido de oligoetilenglicol en los mismos se determinó a través de la integración de las correspondientes señales de etilenglicol en el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  registrado en agua deuterada. En comparación con las señales de PGA. En concreto, los picos a desplazamientos químicos 3.26, 3.35 y 3.48 ppm se corresponden con los protones  $\text{CH}_2$  cercanos al grupo amida y azida. La señal mayor a 3.55 ppm se corresponde con los grupos  $\text{CH}_2$  localizados en el interior de la cadena de oligoetilenglicol más un triplete exterior correspondiente a dos protones  $\text{CH}_2$ . La integral de esta última señal varía en función de si la modificación se realiza con  $\text{EG}_2$  (dos unidades de etilenglicol en el interior de la cadena, lo que se corresponde con 10 protones) o si es  $\text{EG}_6$  (en cuyo caso se correspondería con 50 protones). Por lo tanto, el % de sustitución en cada polímero fue calculada de igual forma, comparando las integrales correspondientes a los grupos EG con las señales de PGA. Como ejemplo de espectro de  $^1\text{H-RMN}$  véase la Figura 7.

Se sintetizaron diferentes polímeros con diversos grados de sustitución. El grado de sustitución de acuerdo con el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  fue de aproximadamente un 70-80% del valor teórico esperado cuando se pretendía bajo grado de sustitución, y alrededor de un 60% cuando se pretendía una sustitución superior. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla inferior.

**Tabla 10.** Poliglutamatos modificados con unidades oligoEG azida

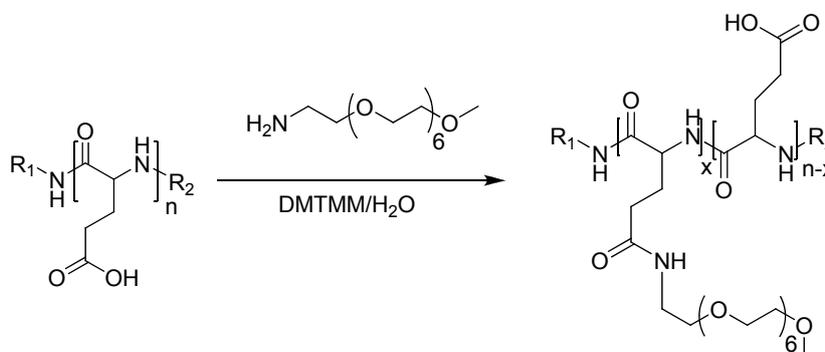
Polímero	Contenido azida (calc.)	Contenido azida ( $^1\text{H-RMN}$ )	Mn	Mw	PDI	
	50	15	11	23500	30500	1.3
	51	20	16	24700	32100	1.3

	<b>52</b>	60	30	22500	29200	1.3
	<b>53</b>	20	16	26000	33800	1.3
	<b>54</b>	30	18	26500	34400	1.3
	<b>55</b>	50	34	27200	35400	1.3

El peso molecular de los copolímeros resultantes se calculó en base al peso molecular de las unidades de oligoetilenglicol en cada caso.

**PEGilación de PGA.**

5 Se sintetizaron diferentes polímeros con diferente grado de PEGilación en la cadena lateral con la finalidad de estudiar las diferentes propiedades físico-químicas que dicha PEGilación puede aportar a las arquitecturas de ácido poliglutámico. Para dicho propósito se utilizó metoxiolioligoetilenglicol amina siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la modificación post-polimerización del polímero con unidades de etilenglicol (en este caso sin grupo funcional azida). El conjunto de polímeros sintetizados se encuentra resumido en la tabla inferior.



10

Donde

n representa el número de unidades de glutámico, 1 a 1000

x representa el número de unidades de glutámico modificadas con Etilenglicol 1 a 1000

**Tabla 11.** Poliglutamatos modificados con metoxiolioligoEG

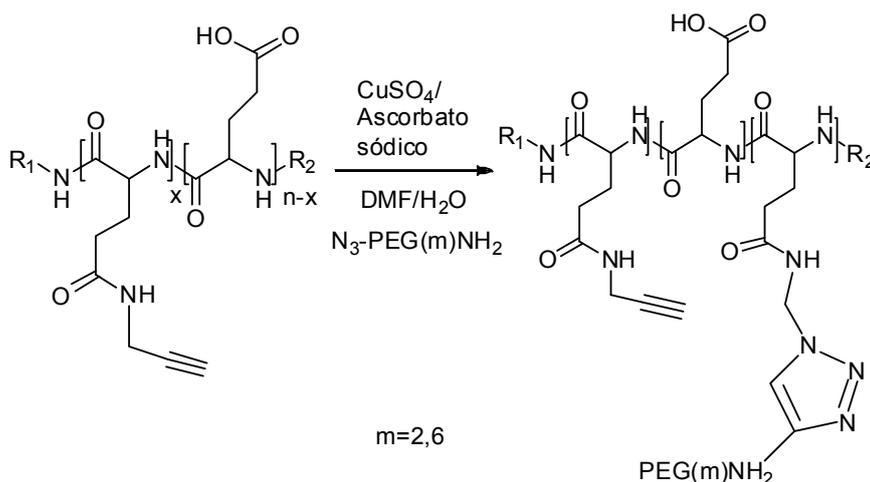
Polímero		Contenido en Oligo EG (%) (calc.)	Contenido en Oligo EG ( <sup>1</sup> H-RMN) (%)	Mn	Mw	PDI
	<b>56</b>	200	87	56000	72700	1.3
	<b>57</b>	140	73	49800	64700	1.3
	<b>58</b>	100	49	39200	51000	1.3

	<b>59</b>	60	30	30900	40200	1.3
	<b>60</b>	20	8	21200	27600	1.3
	<b>61</b>	75	50	21200	25000	1.18
	<b>62</b>	50	33	17400	22600	1.18
	<b>63</b>	25	24	15600	1840	1.18

### Modificación post-polimerización por Química Click

#### Acoplamiento modelo por Química Click

5 En un matraz de dos bocas de fondo redondo provisto de un agitador magnético, 1 equivalente de copolímero (PGA y EG(2)N<sub>3</sub>, EG(6)N<sub>3</sub> o propargilamina en cada caso) en forma de sal sódica se disolvió en agua milliQ. Posteriormente, se añadió la correspondiente cantidad para la introducción del porcentaje deseado del correspondiente compuesto azida/alquino en su caso en DMF absoluto. Posteriormente, se añadió cinco equivalentes de ascorbato sódico (Mw=198.11 g/mol) en disolución de agua milliQ. Tras ello, la mezcla se desgasificó mediante dos ciclos de congelación y descongelación a vacío. Posteriormente, se añadió un equivalente de CuSO<sub>4</sub> (Mw= 249.68 g/mol) (pesado bajo atmósfera de N<sub>2</sub>) a la mezcla de reacción cuya proporción final de mezcla de disolventes debe DMF/H<sub>2</sub>O 4:1. La mezcla completa se volvió a desgasificar con un ciclo más de congelación y descongelación a vacío y se dejó reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> en un baño de aceite durante 40 °C durante tres días, protegida de la luz.



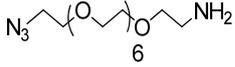
Donde

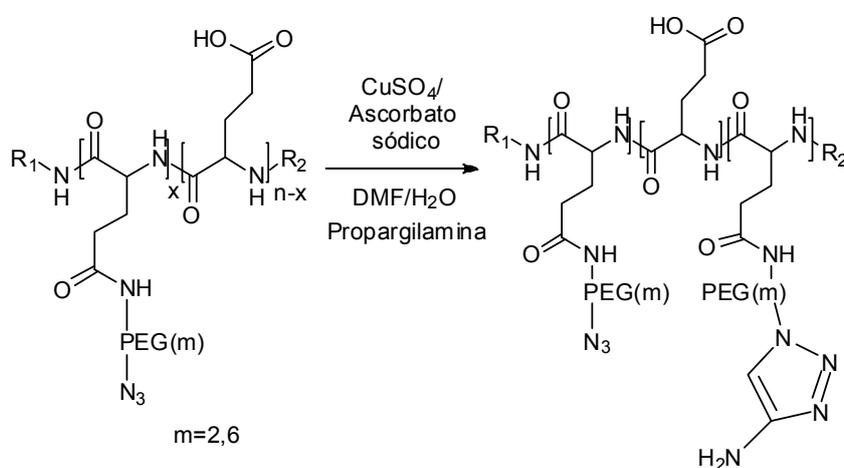
15 n representa el número de unidades de glutámico, 1 a 1000

x representa el número de unidades de glutámico modificadas con propargilamina, 1 a 1000

**Tabla 12.** Condiciones de reacción y resultados de las reacciones modelo de acoplamiento por click chemistry entre PGA modificado con grupos alquino y oligoEG-azidas.

Experimento	Disolvente	T° °C	Sistema catalítico	Eq. por unidad	Eficacia.
	H <sub>2</sub> O	40	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico (0.3/0.5)	3 (20%)	88 %
	H <sub>2</sub> O	40	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	97 %

	DMF/ H <sub>2</sub> O	40	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico(0.3/0.5)	6 (40%)	48 %
	DMF/ H <sub>2</sub> O	40	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico (1/5)	2 (9%)	67 %
	H <sub>2</sub> O	40	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	96 %

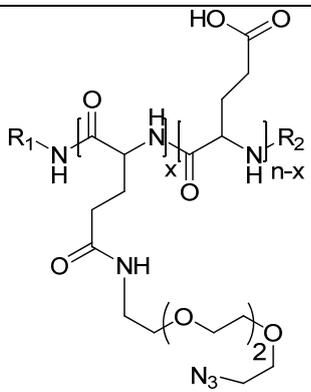


Donde

n representa el número de unidades de glutámico, 1 a 1000

5 x representa el número de unidades de glutámico modificadas con Etilenglicol 1 a 1000

**Tabla 13:** Condiciones de reacción y resultados de las reacciones modelo de acoplamiento por click chemistry entre PGA modificado con grupos oligoEG-azidas y propargilamina

Experimento	Disolvente	T <sup>a</sup> °C	Sistema catalítico	Eq. por unidad	Eficiencia
	DMF/ H <sub>2</sub> O	60	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico (1/5)	4 (18%)	33%
	DMF/ H <sub>2</sub> O	60	CuSO <sub>4</sub> /Ascorbato sódico(1/10)	2 (9%)	55%

		<p>DMF/ H<sub>2</sub>O</p>	<p>40</p>	<p>CuSO<sub>4</sub>/Ascorbato sódico (1/5)</p>	<p>2 (9%)</p>	<p>67%</p>
--	--	----------------------------	-----------	--	---------------	------------

De los resultados obtenidos pueden establecerse las siguientes conclusiones:

-Las condiciones óptimas de reacción en disolución acuosa son: el uso del sistema catalítico CuSO<sub>4</sub>/Ascorbato sódico (1/5) a 40 °C dando lugar a una eficacia de conjugación de 96-97%.

- 5 -El uso de mezclas DMF/H<sub>2</sub>O (4:1) con CuSO<sub>4</sub>/Ascorbato sódico (1/5) como catalizador permite la posibilidad de conjugación moléculas hidrofóbicas (péptidos/fármacos) no solubles en agua. La eficacia de conjugación es siempre inferior cuando se usan mezclas DMF/H<sub>2</sub>O pero es aceptable y predecible.

Como ejemplo de análisis de resultados por <sup>1</sup>H-RMN se adjunta la Figura 8.

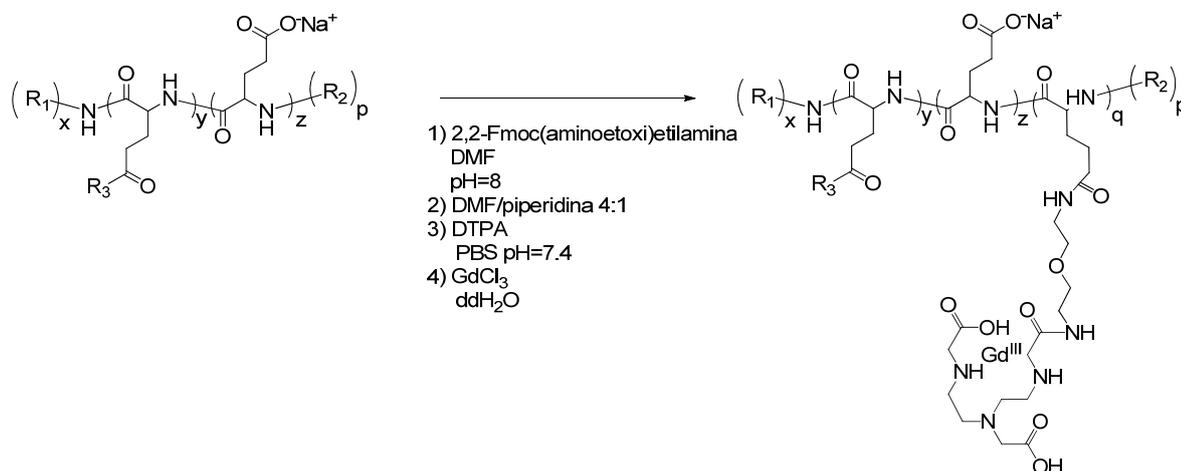
#### Modificación de post-polimerización mediante enlaces amida

#### 10 Conjugación de DTPA

- 15 Los complejos de gadolinio como por ejemplo Gd-DTPA o sus derivados se emplean de manera habitual como agentes de contraste en la técnica MRI (MRI, Magnetic Resonance Imaging). El porcentaje de Gd introducido depende directamente del número de unidades de glutámico del bloque peptídico. Para su complejación es necesario introducir unidades complejantes, como el DTPA (ácido dietilentriaminopentacético). Los grupos carboxilo del PGA se funcionalizan con una diamina monoprotectada, con el objetivo de tener un grupo NH<sub>2</sub> disponible (tras la desprotección) para la formación de enlaces amida con el DTPA dianhidrido. La di-amina monoprotectada evita procesos de entrecruzamiento.

- 20 Teniendo en cuenta que el número de unidades de glutámico puede modularse en la síntesis de partida, el porcentaje de Gd puede ser optimizado fácilmente dependiendo de las necesidades del equipo de análisis. El acoplamiento de la diamina a los grupos carboxilos del tribloque, seguido de la conjugación del agente quelante DTPA para la final complejación de gadolinio, fue realizado siguiendo el protocolo detallado a continuación, obteniendo porcentajes de diamina injertada variables.

Tras obtener el TB en su forma soluble en DMF (previa precipitación mediante adición de ácido hasta pH=4) se procede a la conjugación detallada a continuación.



donde:

- 5 R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).
- R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.
- 10 R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.
- 15 x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500
- y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500
- z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000
- p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

20 TB200 (34.5mg; 31044g/ml,  $1.11 \cdot 10^{-6}$  mol) se disolvió en 5mL de DMS anhidro a temperatura ambiente y bajo flujo continuo de N<sub>2</sub>. Tras su disolución completa, 1.5eq de DIC fueron añadidos (d=0.806 g/ml, Mw=126g/mol). Después de 5 minutos en agitación, se añadieron 1.5eq de HOBt (Mw=135,1g/mol) como sólido. La reacción se dejó bajo agitación durante 10 minutos y después se añadió la diamina mono-protegida: hidrocloreuro de 2,2-Fmoc(aminoetoxi)etilamina (59 mg; 362.85 g/ml;  $1.62 \cdot 10^{-4}$  mol; 200 eq). El pH se ajustó a 8.0 con DIEA (300uL aprox.).

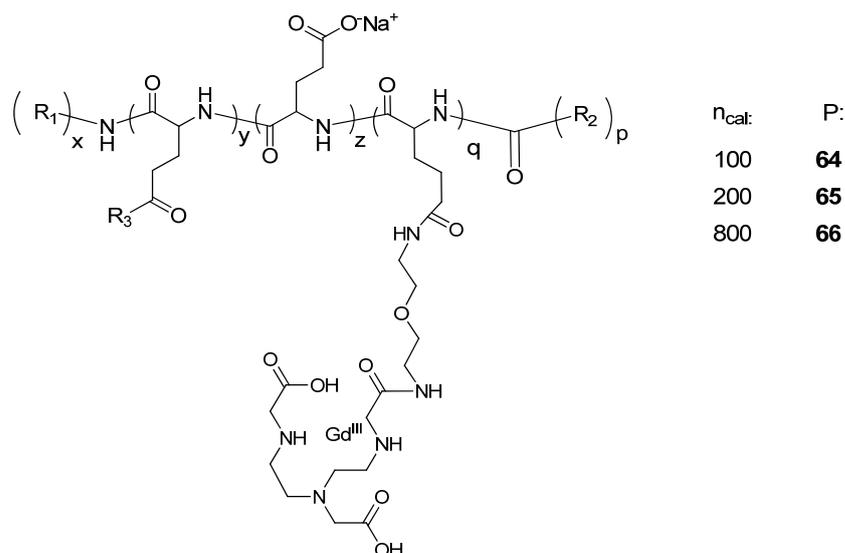
25 La mezcla se dejó bajo agitación durante 24h bajo atmósfera inerte. La reacción fue monitorizada por cromatografía de capa fina (TLC). Finalmente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y la diamina monoprottegida no reaccionada se eliminó mediante el lavado del residuo con 8-10mL de una mezcla cloroformo:acetona (4:1) y se cuantificó por espectrofotómetro (Fmoc, 290nm). La subsecuente desprotección de la diamina se llevó a cabo en DMF:piperidina (4:1) a temperatura ambiente, atmósfera inerte durante 1h. De nuevo, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el Fmoc liberado fue separado del producto mediante lavados con la mezcla cloroformo: acetona (4:1). Dicha mezcla fue evaporada y el residuo se utilizó para cuantificar de forma directa la cantidad de grupos NH<sub>2</sub> introducidos en el polímero

30 (Fmoc, 290nm). El producto fue secado y almacenado para su posterior uso.

#### Quelación del ion Gadolinio (Gd<sup>3+</sup>)

35 Para la complejación con el ion gadolinio, se empleó una proporción (1:1) DTPA:GdCl<sub>3</sub>. El producto TB200 funcionalizado con DTPA se resuspendió en 5mL de PBS 1M pH=7.4 bajo agitación a temperatura ambiente. GdCl<sub>3</sub> (263.61g/mol,  $1.14 \cdot 10^{-4}$  mmol) se disolvió en ddH<sub>2</sub>O (concentración=100mg/mL) y se añadió gota a gota a la reacción. Tras cada adición se comprobó el pH, manteniéndolo constante a 7. Tras 4 h de reacción, se comprobó mediante el indicador 4-(2-piridilazo)resorcinol si existía gadolinio libre en el medio. El viraje de amarillo a naranja denota la existencia de ligando libre.

40 Tras comprobar la ausencia de ligando libre, la mezcla de reacción se liofilizó y el residuo obtenido se redisolvió en ddH<sub>2</sub>O para proceder a su purificación por columna cromatográfica Sephadex G25 utilizando ddH<sub>2</sub>O como eluyente. Se recogieron 50 fracciones de 2mL. El producto obtenido (TB-DTPA/Gd), será caracterizado por absorción atómica cuantificar la cantidad de gadolinio complejada. Rendimiento=50%.



Donde

- x representa el número de unidades de monómero incluido en definición R1, de 1 a 500
- y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 1000
- 5 z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000
- q representa el número de unidades de glutámico modificadas con DTPA, de 1 a 1000
- p representa el número de unidades de monómero incluido en definición R2, de 1 a 500
- $n_{cal}$  representa el número de unidades de glutámico teóricas en el polímero, de 1 a 1000

## 10 Toxicidad y recuperación celular a través del ensayo de MTT

El ensayo de MTT mide la proliferación celular así como la reducción de la viabilidad celular cuando acontecimientos metabólicos conducen a apoptosis o necrosis. También puede usarse para evaluar la tasa de supervivencia de una línea celular dada cuando se incuba en presencia de compuestos xenobióticos. La reducción de sales de tetrazolio se acepta como una manera fiable de analizar la proliferación celular. El MTT de tetrazolio amarillo (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difeniltetrazolio) se reduce por células metabólicamente activas y da como resultado la formación intracelular de formazán púrpura que puede medirse espectrofotométricamente tras la solubilización con DMSO.

Se usó el ensayo de MTT en esta invención para evaluar la toxicidad de los compuestos a diferentes concentraciones. Para analizar su posible alteración de la viabilidad celular, se añadieron los compuestos a las líneas celulares HeLa y HUVEC a diferentes concentraciones y se incubaron hasta 72h.

20 Los resultados se muestran en las Figuras 9A y 9B. En la figura 9A se puede observar como para los compuestos TB400 [P: 35 donde X=OMe o S-S-4TP] y TB800 [P: 36 donde X=OMe o S-S-4TP] la viabilidad celular es superior al 80 % tras 24 y 72 horas de incubación en células HUVEC. En la figura 9B se muestra la comparación en términos de viabilidad celular del compuesto TB200 [P: 34 donde X=OMe o S-S-4TP], en diferentes líneas celulares (HUVEC y HeLa) a diferentes tiempos de incubación.

## 25 Estudios de internalización celular

Se ha estudiado de forma comparativa los polímeros sintetizados con diferente Mw y conformación en solución en células HeLa y HUVEC. Se han utilizado técnicas de citometría de flujo (Figura 2A) y microscopía confocal de fluorescencia de célula viva (Figura 2Ab) con polímeros marcados fluorescentemente con oregon green (OG-cadaverine). El polímero sintetizado con los grupos -COOH desprotegidos (P-COOH, 1 equiv.) se disuelve en DMF anhidro bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, posteriormente el fluoróforo (OG-NH2 0.1 equiv.) en DMF anhidro se añade junto con trietilamina (hasta pH 8). La reacción se monitoriza por TLC, una vez finalizada el polímero se purifica mediante SEC (columnas PD10, Sephadex) y la carga fluorescente se determina con el fluorímetro (cuantificación de fluorescencia del crudo y del polímero purificado). TB10 se halló fuera de los límites de detección del sistema por tanto TB-OG50, TB-OG100 y TB-OG200 fueron analizados. Los estudios de internalización celular se llevaron a cabo en presencia de

leupeptina (inhibidor de tiol proteasas) para evitar la degradación del portador polimérico.

5 En células HeLa, mientras que TB50 y TB100 presentaron un aumento lineal de la fluorescencia asociada a célula, TB200 muestra una más rápida internalización llegando a estabilizarse antes de las 5h. Además, a 4°C TB200 presenta un aumento de fluorescencia asociada a tiempos cortos, en particular, a 30 min indicando una posible mezcla de mecanismos de internalización celular (dependientes de energía (i.e. endocitosis) + independiente de energía (i.e. difusión)). Esta observación se corrobora con las gráficas e imágenes de microscopía confocal mostradas en la Figuras 10A, 10B.

10 Este mecanismo mixto de internalización no se observa en células HUVEC para ninguno de los polímeros analizados (Figura 11A y 11B). Las células HUVEC internalizan los TB mediante endocitosis (colocalización lisosomal Figura 11B) y además su capacidad de internalización es mucho mayor que la observada en HeLa para los mismos compuestos (comparación Figura 10A y 11A). Todos los experimentos se realizaron con los mismos equivalentes de OG en todos los casos. Las imágenes obtenidas utilizando un marcador lipídico de membrana, demuestran también que estos polímeros no se asocian a membrana plasmática y son casi cuantitativamente internalizados (Figura 10B)

#### Estudios de degradación en tampón a diferentes valores de pH, en plasma y en presencia de catepsina B

15 Para evaluar la biodegradabilidad tanto hidrolítica como enzimática de los nuevos polímeros sintetizados se llevaron a cabo distintos estudios de estabilidad detallados a continuación. Todas las muestras tomadas fueron analizadas mediante HPLC y GPC.

##### Degradación a distintos pH

20 Los polímeros fueron disueltos en tampón PBS a pH 5.5, 6.5 y 7.5 a una concentración de 3mg/mL. Las disoluciones fueron incubadas a 37°C, se tomaron alícuotas de 100uL a distintos tiempos que fueron congeladas para su posterior análisis.

##### Degradación en plasma

25 Para obtener plasma sanguíneo, un volumen de sangre recientemente obtenida de rata/ratón se centrifugó a 12000rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (plasma) se separó del *pellet* (o botón celular) obtenido y se utilizó para disolver los polímeros a una concentración de 3mg/mL. Las disoluciones fueron incubadas a 37°C y se tomaron alícuotas de 100uL a distintos tiempos que fueron congeladas para su posterior análisis.

##### Degradación enzimática (catepsina B)

30 Los polímeros fueron disueltos en tampón de acetato sódico 20mM pH 6.0 a una concentración de 3mg/mL, en presencia de EDTA 2mM, DTT 5mM y 6.25 unidades de catepsina B (disueltas en tampón acetato). Las disoluciones fueron incubadas a 37°C y se tomaron alícuotas de 100uL a distintos tiempos que fueron congeladas para su posterior análisis.

#### Estudios de biodistribución In vivo

35 El trabajo con animales se llevó a cabo de acuerdo con la legislación local y con la aprobación del Comité Ético del Bienestar Animal del CIPF y de acuerdo con la legislación europea vigente. Los animales se mantuvieron respetando el ciclo de vigilia/sueño de 12h y controlando las condiciones ambientales de temperatura y humedad, y se les suministró agua y comida.

#### Estudios de biodistribución mediante marcaje fluorescente. Utilización de Oregon Green (OG) como sonda.

40 Para el estudio de la biodistribución, se llevaron a cabo análisis *ex vivo* de la acumulación de los homopolipéptidos, di- y tri-bloques en los distintos órganos del modelo *in vivo* (ratas Wistar) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (High Pressured Liquid Chromatography, HPLC) y espectrofotómetro de fluorescencia. Como ejemplo preliminar de la presente invención se detalla a continuación el experimento realizado con TB200 marcado con OG.

45 Una rata fue inyectada vía intravenosa con 14mg/mL de TB200 etiquetado con OG. El animal fue sacrificado tras 4h (experimento con nomenclatura TBO-4h); una segunda rata fue inyectada vía intravenosa con la misma cantidad de compuesto siendo sacrificada tras 24h (experimento con nomenclatura TBO-24h). Como experimento control, una rata fue inyectada vía intravenosa con 14mg/mL de TB200 sin etiquetar y fue sacrificada tras 4h (experimento con nomenclatura TB-4h).

50 Inmediatamente tras el sacrificio, se recolectó la sangre y los órganos se pesaron siendo rápidamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Los órganos a analizar fueron cerebro, cerebelo, corazón, hígado, riñón, vejiga, estómago, intestino y tejido muscular. Cada uno fue tratado con una solución de lisis compuesta por 40%EtOH/6%HClO<sub>4</sub> (4mL por gramo de tejido). A continuación se homogeneizó la muestra con Ultraturrax

(aprox. 1min, 13000rpm). La suspensión se centrifugó durante 60min a 4000g a 4°C, recuperando el sobrenadante para el posterior análisis. El suero siguió un tratamiento similar: tras centrifugar la sangre, el sobrenadante se recolectó y se le añadió el mismo volumen de la disolución de ácido perclórico. Tras centrifugar la muestra (10min, 12000rpm, 4°C), se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

5 Para mejorar la extracción del polímero de la mezcla, los *pellets* obtenidos se sometieron a ultrasonidos durante 1h tras añadir 2mL ddH<sub>2</sub>O y 1mL de una solución 1M NaHCO<sub>3</sub>. Después se centrifugaron las muestras con las condiciones nombradas previamente y el sobrenadante se guardó para analizarlo.

10 Tras la observación de la sensibilidad del OG al pH del medio (la fluorescencia disminuye notablemente en pH ácido), después del tratamiento con la solución de ácido perclórico los sobrenadantes fueron neutralizados con NaOH, liofilizados y redisoluertos en 1mL de PBS pH=8 para el posterior análisis.

Todas las muestras obtenidas tanto de tejidos como de suero, (sobrenadantes de los tratamientos con la mezcla perclórica, sobrenadantes de la mezcla perclórica basificados y sobrenadantes del tratamiento con CO<sub>3</sub>HNa fueron estudiadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrofotómetro de fluorescencia. Los resultados preliminares del presente análisis se muestran en los gráficos de las Figura 12A y 12B.

15 La fluorescencia en plasma (Figura 12A) fue cuantificada con un espectrofluorímetro: directamente, tras el tratamiento con la mezcla perclórica, tras el lavado con metanol del pellet obtenido en el anterior tratamiento y tras el lavado con acetonitrilo del mismo pellet. En los gráficos de la Figura 12 se observa que la fluorescencia de partida en el plasma se pierde tras el tratamiento con la mezcla perclórica. Esta conclusión hace posible que el TBO precipite junto con las otras proteínas presentes en el plasma (es posible que esta especie polimérica forme agregados con las proteínas plasmáticas). Debido a este hecho, el pellet fue lavado con una disolución de bicarbonato sódico como se ha detallado  
20 previamente en el protocolo descrito para los tejidos, con el objetivo de obtener la sal sódica del tribloque y solubilizarla en la fase acuosa para su posterior análisis mediante la medida de la fluorescencia.

#### **Estudios de biodistribución mediante marcaje fluorescente. Utilización de Cyane5.5 (Cy5.5) como sonda.**

25 De forma paralela al estudio de biodistribución descrito previamente, el marcaje de los polímeros se llevó a cabo con una sonda fluorescente con emisión cercana al infrarrojo y elevada penetrabilidad en tejido, Cyane5.5 (Cy5.5,  $\lambda_{exc}$ . 675 nm,  $\lambda_{em}$  694 nm). El estudio *in vivo* se realizó en ratones atímicos nude Fox1n nu/nu. Tras la inyección intravenosa de los compuestos poliméricos marcados con Cy5.5, se tomaron imágenes de fluorescencia *in vivo* y a posteriori *ex vivo* (de los órganos extraídos) mediante la plataforma de imagen óptica Xenogen IVIS® Spectrum. Este sistema permite la visualización, seguimiento y cuantificación de actividades tanto celulares como genéticas dentro de  
30 un organismo vivo a tiempo real, mediante bioluminiscencia o fluorescencia, así como de órganos *ex vivo* o ensayos *in vitro*.

35 En este estudio se utilizó la metodología de análisis de la fluorescencia descrita anteriormente para el caso del marcaje fluorescente con OG. Como ejemplo preliminar de la presente invención se detalla a continuación el experimento realizado con DB100 etiquetado con Cy5.5. La única excepción es que la sensibilidad de la sonda Cy5.5 al pH no fue la misma que el OG por lo que el lavado de los pellets con NaHCO<sub>3</sub> 1M no fue necesario ya que no aportaron más datos. Un ejemplo de las imágenes obtenidas se muestra en la Figura 13.

#### **Estudios de biodistribución mediante imagen por resonancia magnética (MRI).**

40 La Imagen por Resonancia Magnética (MRI) es una técnica no invasiva y no ionizante que utiliza el fenómeno de la resonancia magnética para obtener información sobre la estructura y composición el cuerpo analizado. Constituye una herramienta única para contrastes entre tejidos, siendo capaz de distinguir entre tejidos sanos y enfermos.

45 El uso de agentes de contraste en MRI se justifica cuando no es posible cambiar el contraste inherente del tejido para obtener mayor precisión en las imágenes. Estos agentes se basan en los cambios de los tiempos de relajación longitudinales (T1) y transversales (T2) de los protones del agua y/o en la susceptibilidad magnética del agua de los tejidos donde se acumulan. Un agente de contraste de MRI se caracteriza por poseer propiedades para- o superparamagnéticas y por norma general se divide en dos componentes: el ión metálico con propiedades magnéticas cuya forma libre es tóxica para el organismo, y un quelante que además de prevenir la toxicidad del anterior, va a permitir ajustar la farmacocinética del producto según los intereses.

En la presente invención se ha utilizado el metal gadolinio (Gd) como agente de contraste por sus propiedades paramagnéticas, las cuales incrementan el tiempo de relajación T1 de los protones del agua.

50 Para MRI *in vivo*, el núcleo hidrógeno parece ser el mejor blanco ya que de todos los núcleos presentes en los tejidos es el que produce la mayor señal de RMN, y por generar el mejor contraste entre los tejidos ya que provee varias maneras para manipular el contraste de la imagen final.

55 Los estudios preliminares *in vivo* empleando esta técnica fueron llevados a cabo para determinar la biodistribución de los nuevos polímeros mediante otra técnica alternativa a los métodos por fluorescencia previamente descritos en la presente memoria y a su vez comparar cuál de ellos ofrece mejores características para la posterior

5 conjugación a fármaco. Los tribloques (TB200-DTPA y TB800-DTPA) marcados con Gd se inyectaron en ratas por vía intravenosa, administrando una dosis de 0.2mmol Gd<sup>3+</sup> por kg animal, y se monitorizaron mediante resonancia magnética por imagen (MRI). Los experimentos fueron realizados en un sistema Bruker Pharmascan (Bruker Medical GmbH R, Ettlingen, Alemania). El agente de contraste se administró a través de la vena de la cola como un bolo 9 minutos después de iniciar la adquisición.

Los resultados del experimento descrito previamente permitieron detectar la presencia de los conjugados en circulación sin observar acumulación en tejidos específicos, como por ejemplo el cerebro (ver la Figura 14). No se observaron efectos de toxicidad. Ambos productos no resultaron tóxicos en los animales, demostrando su biocompatibilidad.

(Referencias en página siguiente)

## REFERENCIAS

1. Gaspar R., Duncan R (2009) Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of Polymer Therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61, 13, 1220-1231
2. Barz M, Luxenhofer R, Zentel R, Vicent MJ. Defined polymers for therapeutic applications: From Structure-Property Relationships to better defined Therapeutics. *Polymer Chemistry*, DOI: 10.1039/c0py00406e
- 5 3. Deming, T. (2002) Methodologies for preparation of synthetic block copolypeptides: materials with future promise in drug delivery *Adv. Drug Delivery Rev.* 54; 1145.
4. Wang, X. Y.; Kim, H. J.; Wong, C.; Vepari, C.; Matsumoto, A.; Kaplan, D. L. (2006) Fibrous Proteins – Role in Biomaterials and Tissue Engineering. *Mater. Today* 9: 44-53.
- 10 5. Dos Santos, S.; Chandravarkar, A.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Saucedo, L.; Tella, P.; Tuchscherer, G.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* (2005) 127: 11888-11889.
6. Mart, R. J.; Osborne, R. D.; Stevens, M. M.; Ulijn, R. V. (2006) Peptide-based stimuli-responsive biomaterials *Soft Matter* 2: 822-835.
7. Li C., Wallace S., Polymer–drug conjugates: recent development in clinical oncology, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60 (2008) 886–898
- 15 8. Singer, J.W., Shaffer, S., Baker, B., Bernareggi, A., Stromatt, S., Nienstedt, D., Besman, M. (2005) Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane. *Anticancer Drugs*, 16(3), 243-254.
9. Darcy, K.M., Birrer, M.J. (2010) Translational research in the Gynecologic Oncology Group: evaluation of ovarian cancer markers, profiles, and novel therapies. *Gynecol Oncol*, 117(3), 429-439.
- 20 10. Vicent, M.J. and E. Perez-Paya, (2006) Poly-L-glutamic acid (PGA) aided inhibitors of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1): an antiapoptotic polymeric nanomedicine. *J Med Chem.* 49(13): p. 3763-5.
11. Shaffer, SA., Baker-Lee C., Kenndy J. Lai MS, de Vries P, Buhler K, Singer JW, (2007) In vitro and in vivo metabolism of paclitaxel poliglumex: identification of metabolites and active proteases. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 59(4): p. 537-48. Epub 2006 Aug 19.
12. Leuchs, H. Ber. (1906) Fiber die Glycin-carbonsauren *Dtsch. Chem. Ges* 39: 857.
- 25 13. Leuchs; H; Manasse, W. (1907) *Ber Dtsch. Chem. Ges.* 40: 3235.
14. Leuchs, H.; Geiger, W. (1908) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 41: 1721.
15. Deming, T. (2000) Living polymerization of  $\alpha$ -amino acid-N-carboxyanhydrides *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38: 3011.
- 30 16. Kricheldorf, H.R. (2006) Polypeptides and 100 Years of Chemistry of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:5752–5784
17. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Sakellariou, G. (2009) Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides *Chem. Rev.* 109: 5528–5578
18. Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. (2004) Living Polypeptides *Biomacromolecules* 5: 1653–1656.
- 35 19. Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. (2005) Well-defined linear multiblock and branched polypeptides by linking chemistry. *J. Polym. Sci., Part A* 43; 4670.
20. Karatzas, A.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Inoue, K.; Sugiyama, K.; Hirao, A. (2008) Complex Macromolecular Chimeras *Biomacromolecules* 9; 2072.
21. Dimitrov, I.; Schlaad, H. (2003) Synthesis of nearly monodisperse polystyrene–polypeptide block copolymers via polymerisation of N-carboxyanhydrides *Chem. Commun.* 2944.
- 40 22. Deming, T. (1997) Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture *Nature* 390: 386.
23. Deming, T.; Curtin, S. (2000) Chain Initiation Efficiency in Cobalt- and Nickel-Mediated Polypeptide Synthesis *J. Am. Chem. Soc.* 122; 5710.

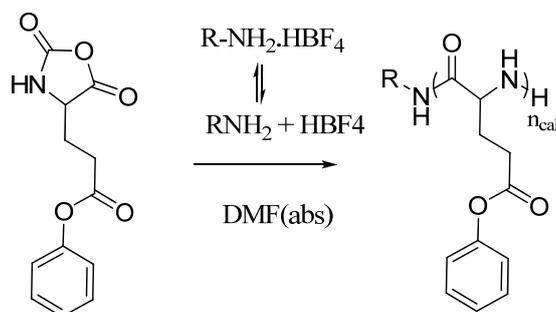
24. Deming, T. (2006) Polypeptide Hybrid Copolymer Synthesis via NCA Polymerization, [Adv. Polym. Sci.](#), 202: 1-8.
25. Lu, H.; Cheng, J. (2007) Hexamethyldisilazane-Mediated Controlled Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides *J. Am. Chem. Soc.* 129: 14114.
- 5 26. Lu, H.; Cheng, J. (2008) *N*-Trimethylsilyl Amines for Controlled Ring-Opening Polymerization of Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides and Facile End Group Functionalization of Polypeptides *J. Am. Chem. Soc.* 130: 12562.
27. Vayaboury, W.; Giani, O.; Cottet, H.; Deratani, A.; Schue', F. (2004) Living Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature *Macromol. Rapid Commun.* 25: 1221.
28. Habraken GJM, Peeters M., Dietz, CHJT, Koning CE, Heise A. (2010). How controlled and versatile is *N*-carboxyanhydride (NCA) polymerization at 0 °C? Effect of temperature on homo-, block- and graft (co)polymerization. 1, 514
- 10 29. Habraken GJM, Wilsens KHTM, Koning CE, Heise A (2011) *Polym. Chem.* Optimization of *N*-carboxyanhydride (NCA) polymerization by variation of reaction temperature and pressure. 2, 1322-1330
30. N. Hadjichristidis, H. Iatroua, M. Pitsikalisa, J. Mays *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 1068–1132
31. Knobler, S. Bittner and M. Frankel, *J. Chem. Soc.*, 1964, 3941–3951,
32. Knobler, S. Bittner, D. Virov and M. Frankel, *J. Chem. Soc.*, 1969, 1821–1824.

15

## REINVINDICACIONES

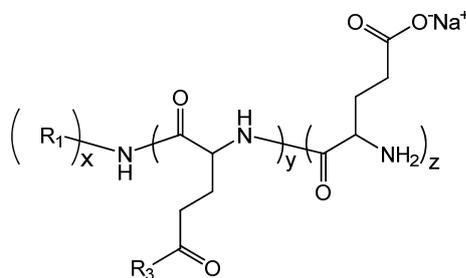
1. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos(NCAs) caracterizado por utilizar un anión no nucleofílico como iniciador: el tetrafluoroborano, de acuerdo con la siguiente fórmula:

5



donde:

- 10 R representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquilo, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).
- n representa el número de unidades de  $\gamma$ -benzylglutamato en el polímero, de 1 a 1000
- 15 2. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos(NCAs), de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tetrafluoroborano es el tetrafluoroborano de amonio.
3. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos(NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que R es la n-butilamina.
- 20 4. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos(NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que R es polietilenglicol.
5. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos(NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, obteniéndose el producto con forma de di-bloque cuya síntesis se muestra en la fórmula siguiente:



25

30

Donde R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquilo, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol) y R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquilo, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados); etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales

comolisina, arginina, imidazol e histidina, y grupos amino secundarios y terciarios, y

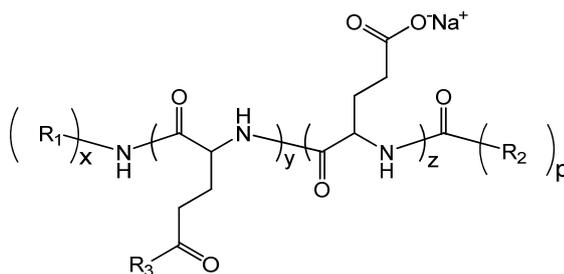
x representa el número de unidades de monómero incluido en definición R1, de 1 a 500

y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 1000

z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

5

6. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, obteniéndose el producto con forma de tri-bloque cuya estructura se muestra en la siguiente fórmula:



10

Donde

R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).

15

R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

20

R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteina y grupos amino secundarios y terciarios.

25

x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500

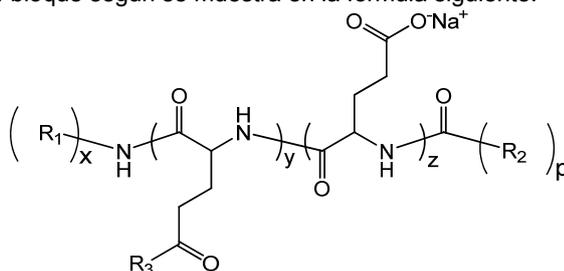
y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500

z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

30

7. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, mediante la reacción entre los dibloques PEG-PGA previamente obtenidos y un derivado de PEG funcionalizado con un grupo carboxilo activado, obteniéndose los sistemas tri-bloque según se muestra en la formula siguiente:



35

Donde:

## ES 2 402 614 A1

- R1 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol).
- 5 R2 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.
- 10 R3 representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.
- x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500
- 15 y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500
- z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000
- p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500
- 20 R2 y R3 pueden ser utilizados para la conjugación de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, complejos de coordinación para MRI, PET y sondas SPECT.
- 25 8. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs), de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que una vez obtenido el polímero de poliglutamato, este se modifica introduciendo cadenas de polietilenglicol en la cadena polimérica, con objeto de obtener moléculas que sean capaces de modificar el comportamiento *in vivo*, la biodistribución y la aplicación terapéutica del correspondiente agente bioactivo.
- 30 9. Poliglutamatos obtenidos por el método de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Utilización de los poliglutamatos de la reivindicación 9 como transportadores y administradores de fármacos.
11. Utilización de los poliglutamatos de la reivindicación 9 como agentes de diagnóstico por imagen molecular.

FIGURA 1

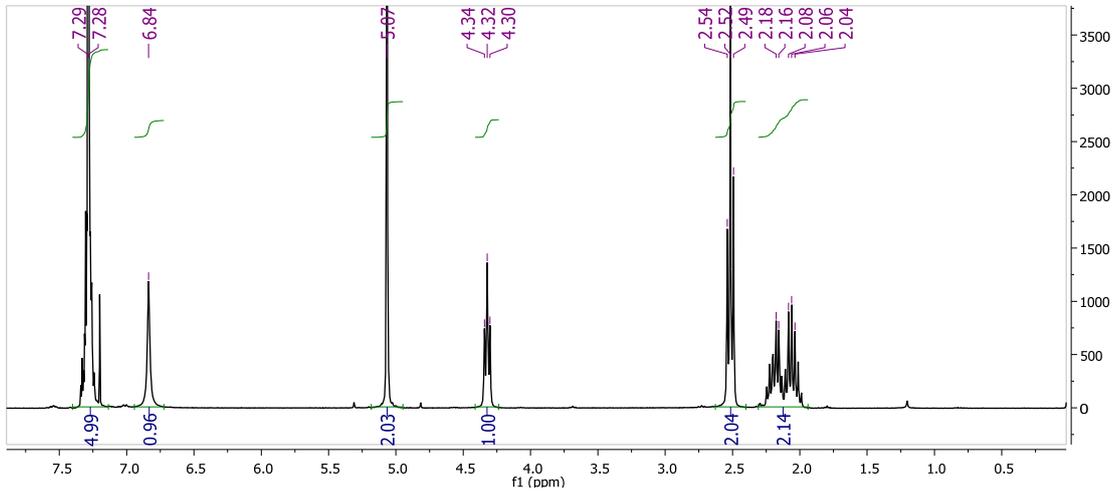
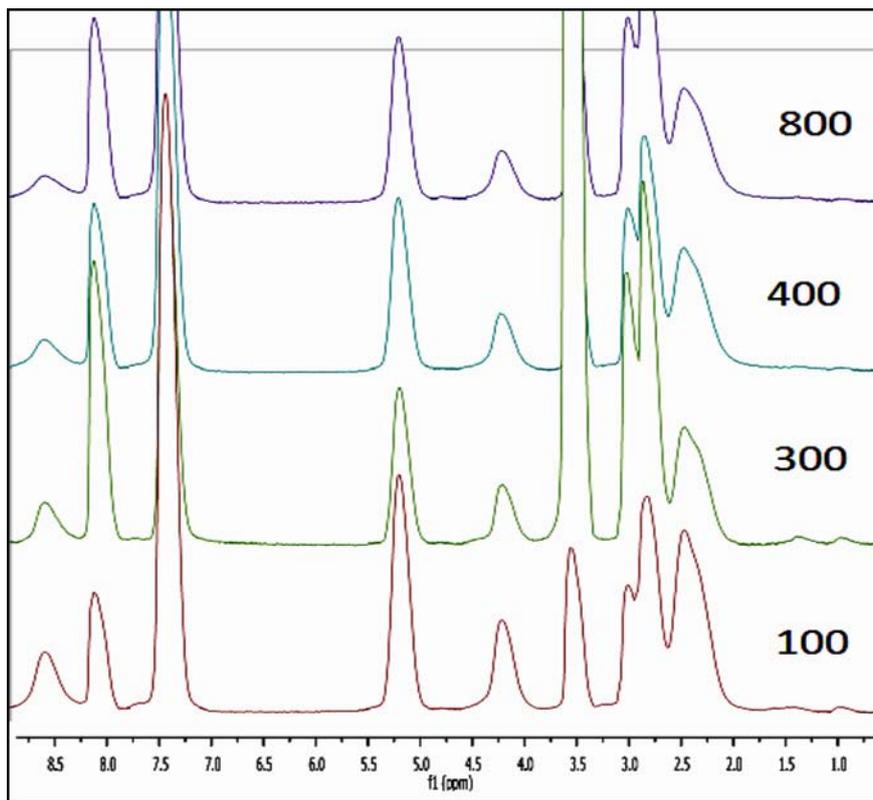


FIGURA 2



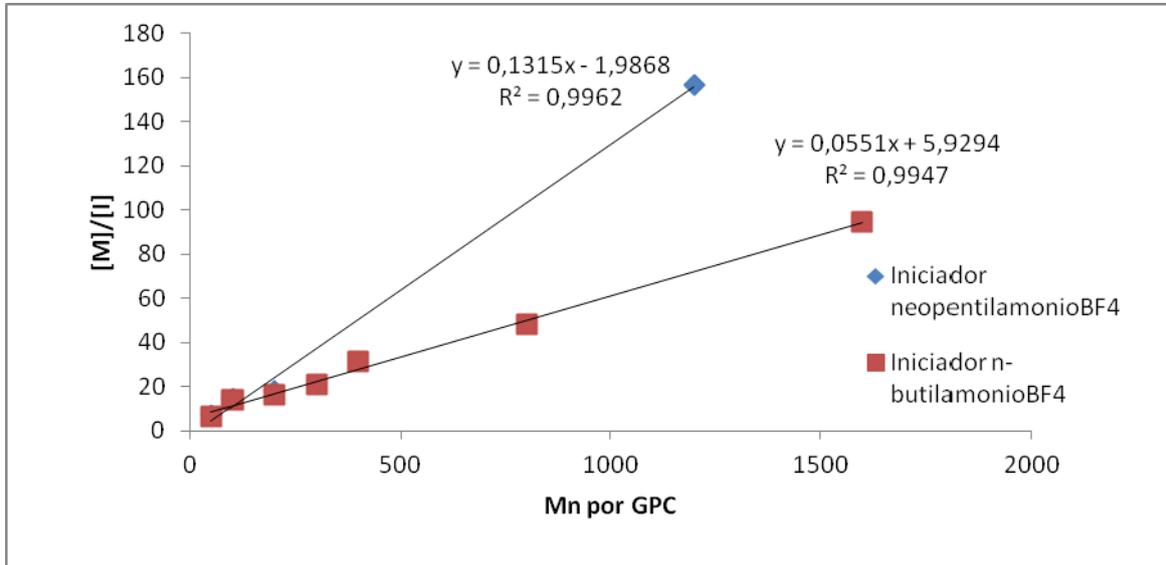


FIGURA 3

FIGURA 4

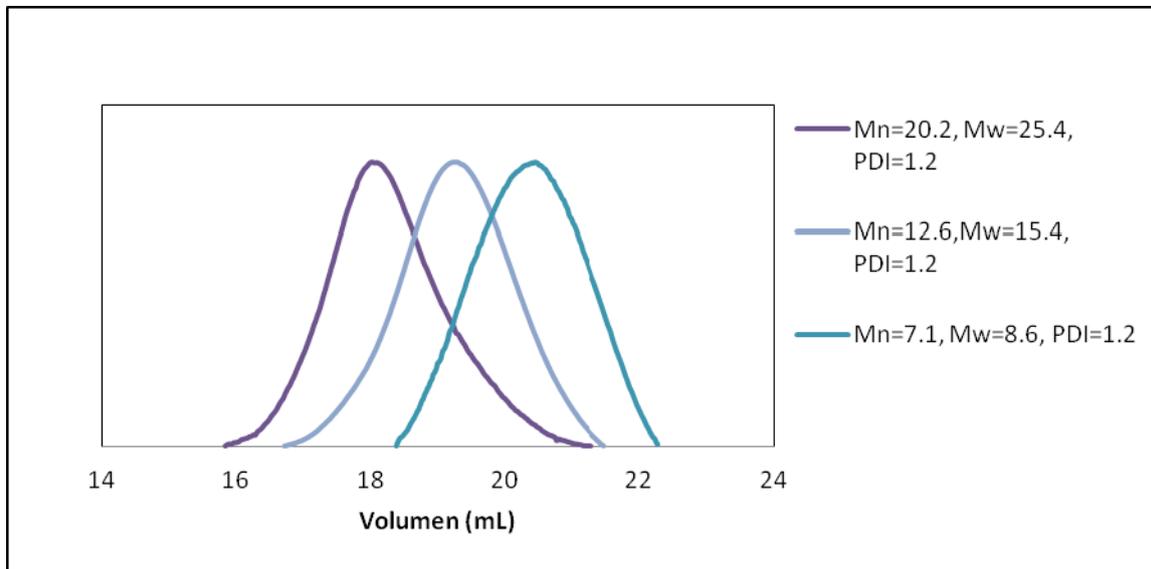


FIGURA 5

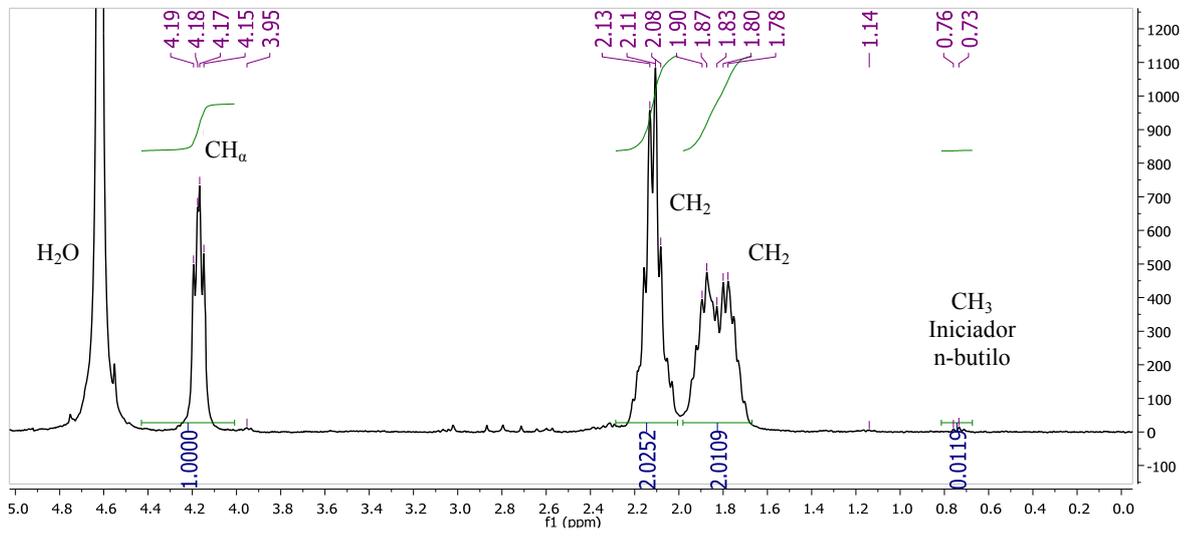


FIGURA 6

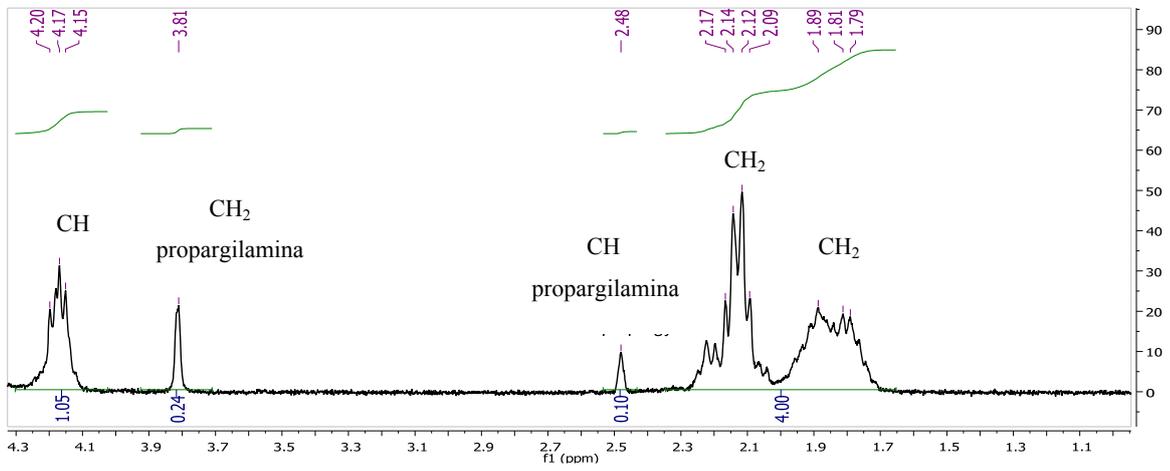
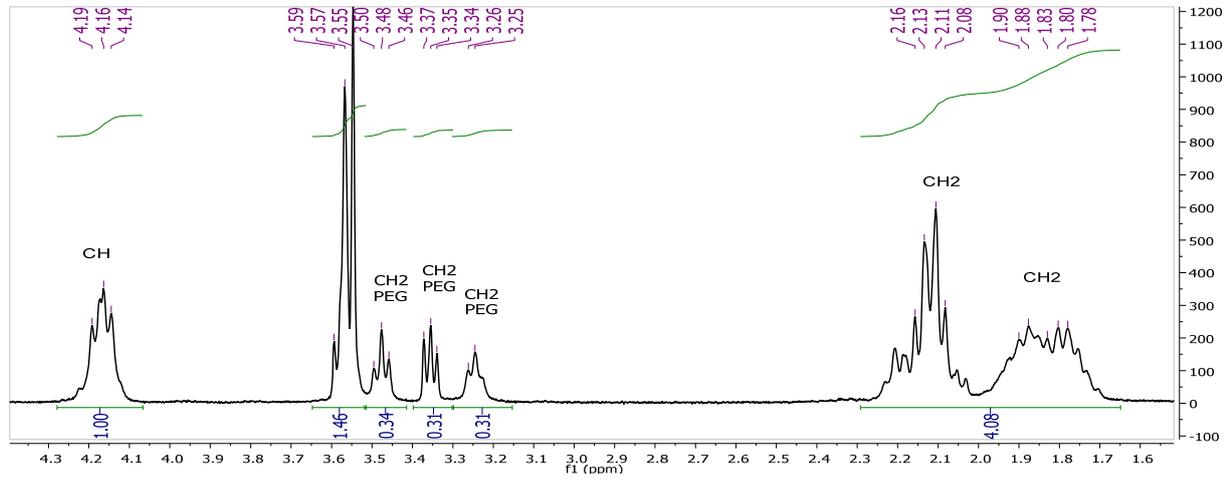


FIGURA 7



CH

FIGURA 8

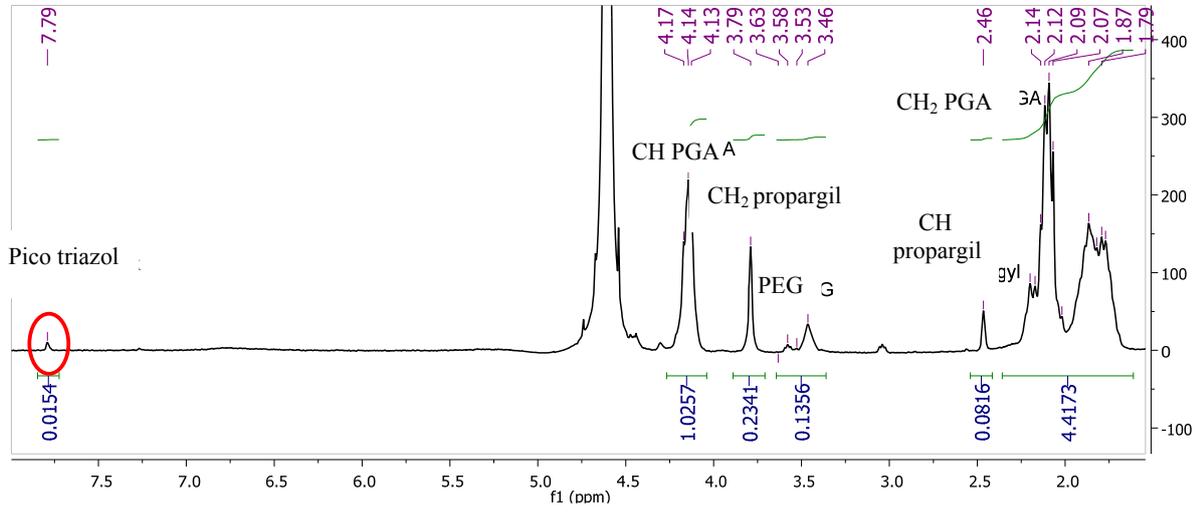
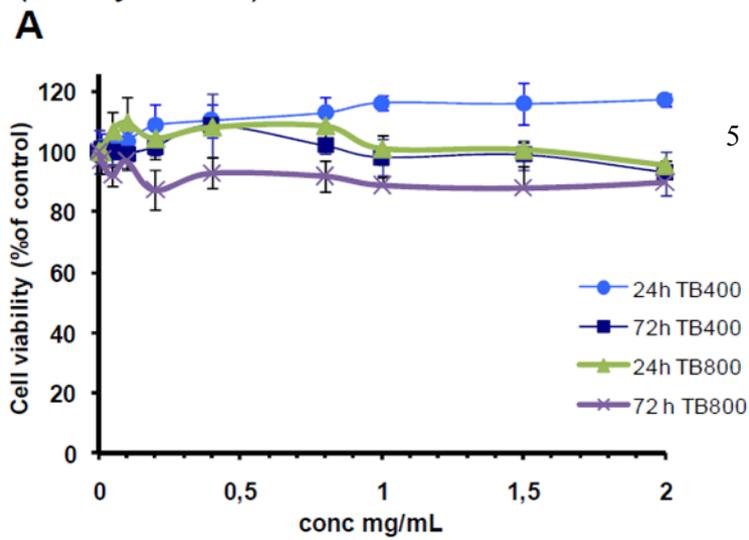


FIGURA 9



5

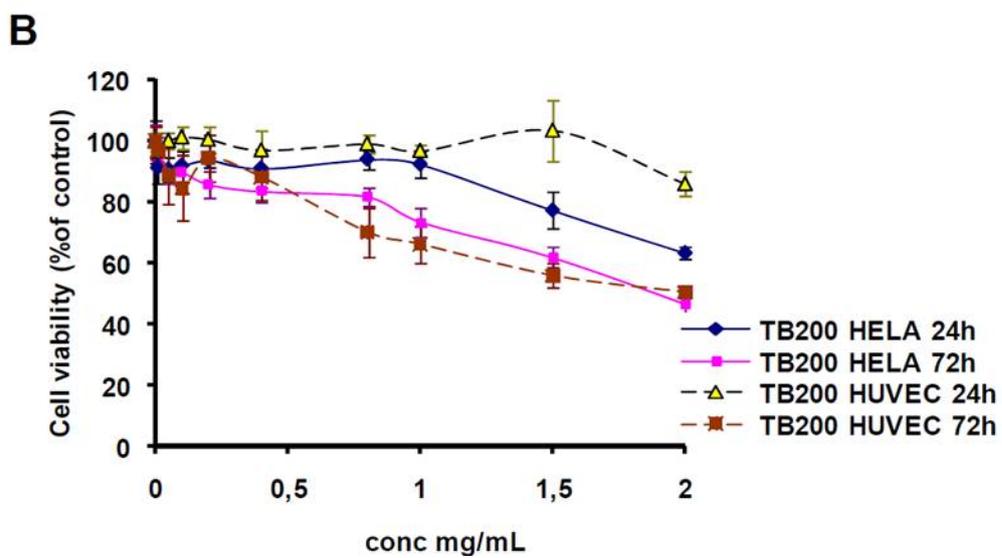
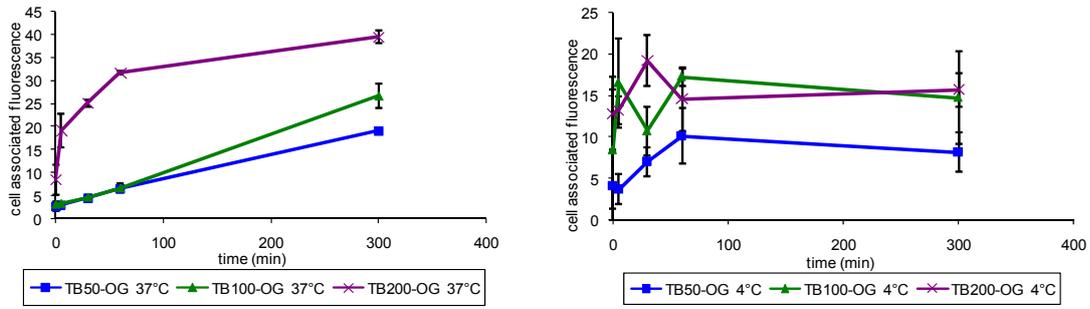


FIGURA 10

A



B

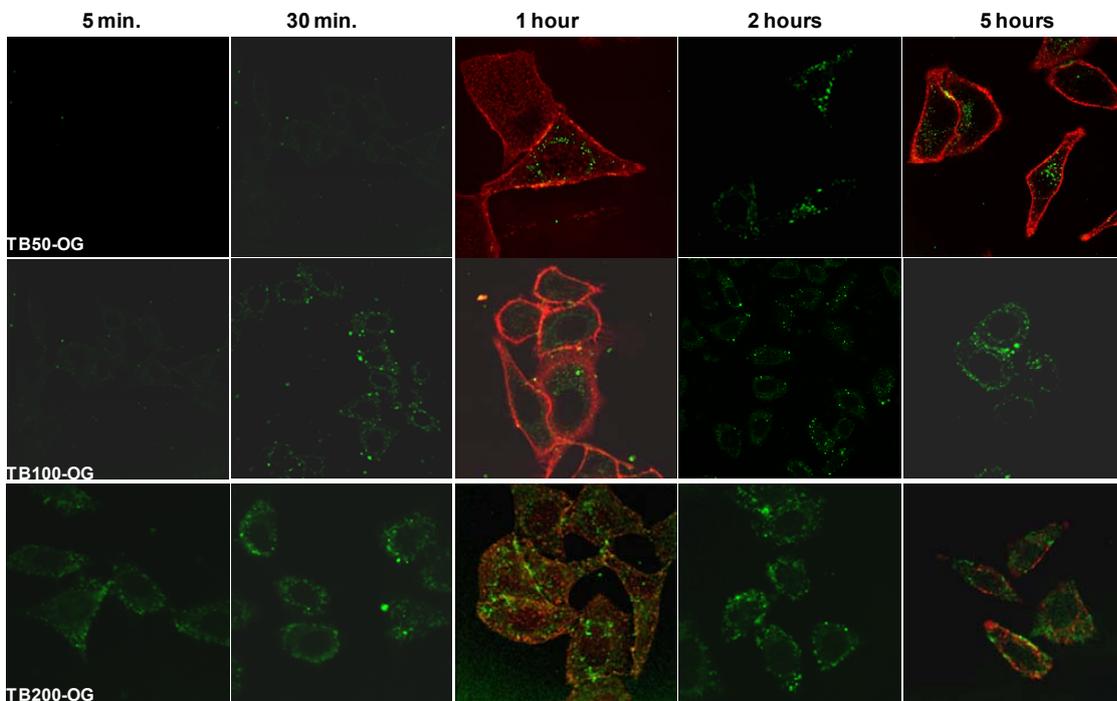
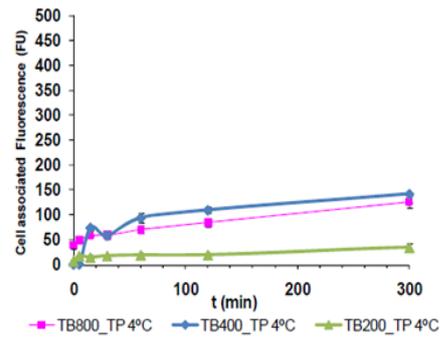
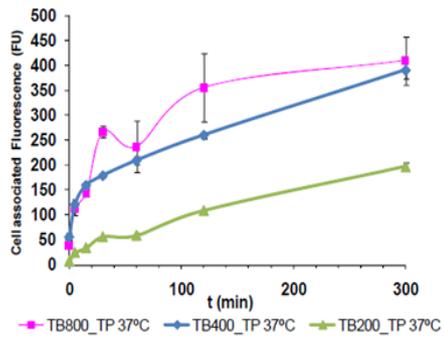


FIGURA 11

A)



B)

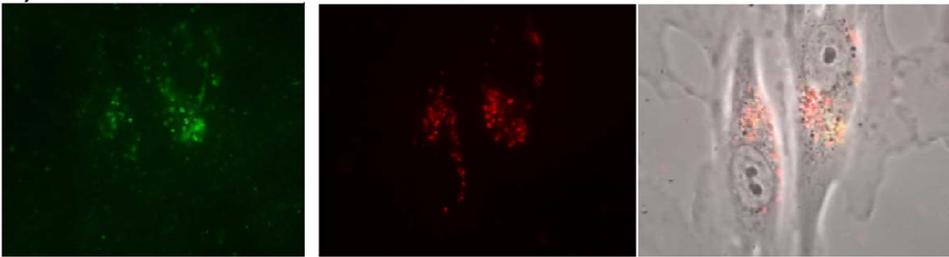


FIGURA 12A

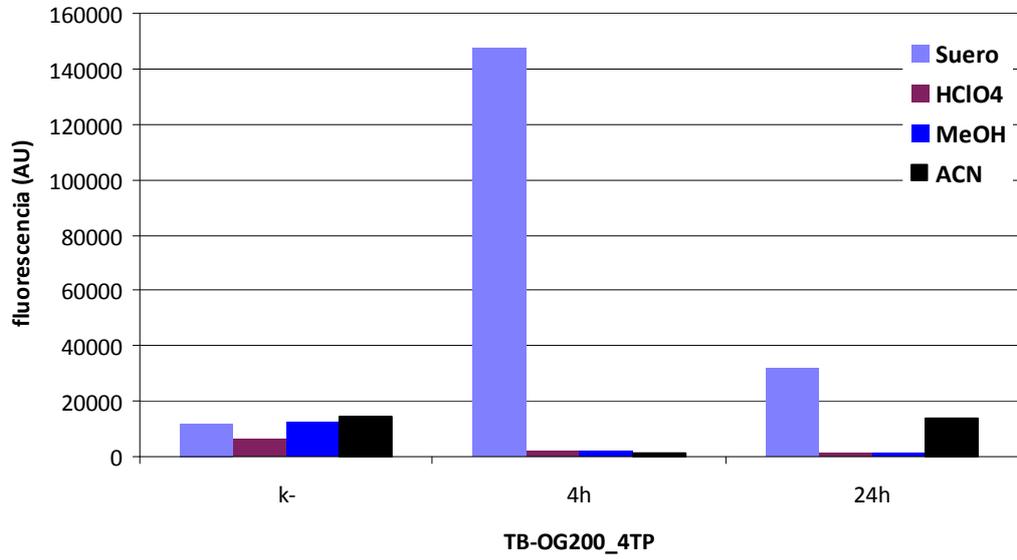


FIGURA 12B

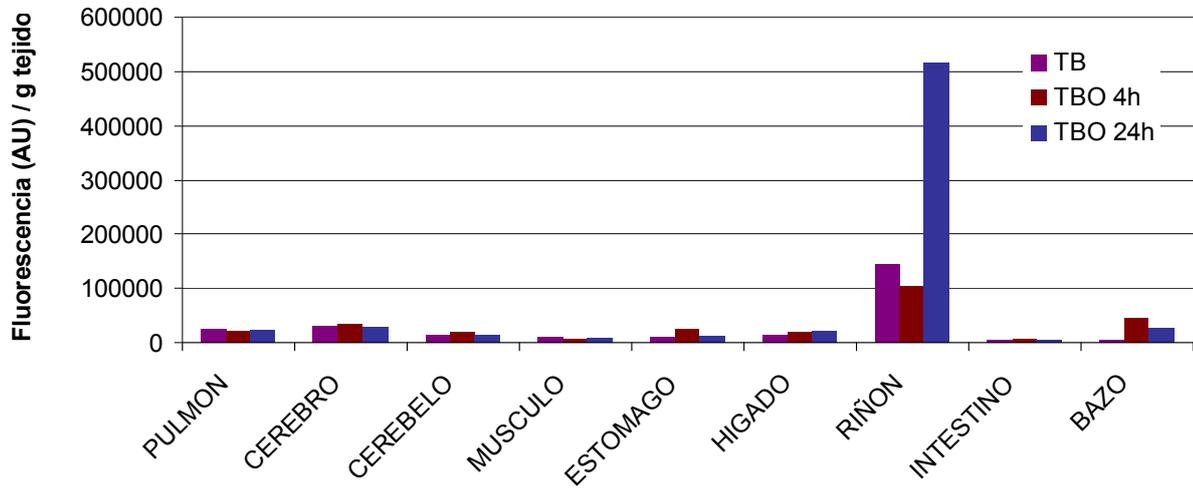
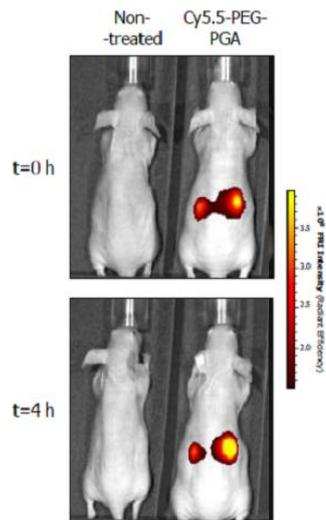
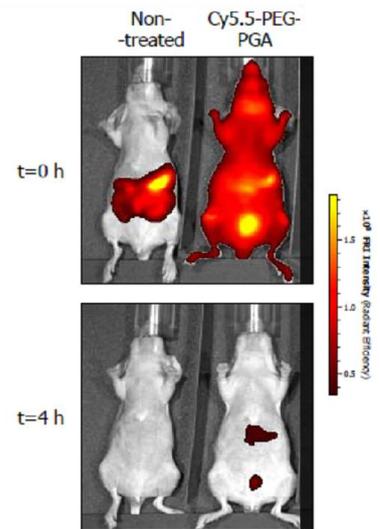


FIGURA 13

(A)



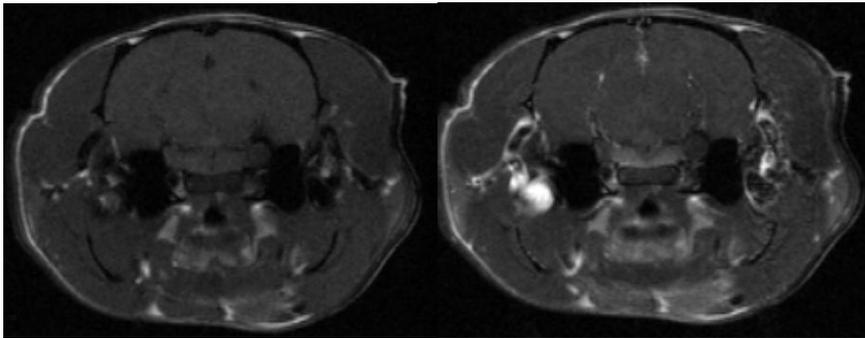
(B)



**FIGURA 14**

A

B





②① N.º solicitud: 201131713

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	H. MORI et al., "Ring-opening polymerization of $\gamma$ -benzyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride in ionic liquids", Polymer, 2007, vol. 48, nº 20, páginas 5867-5877	9 1-8
X	US 2008/0279778 A1 (S. VAN et al. ) 13-11-2008, todo el documento	9-11
A	I. DIMITROV et al., "Synthesis of nearly monodisperse polystyrene-polypeptide block copolymers via polymerization of N-carboxyanhydrides", Chem. Commun., 2003, vol. 23, páginas 2944-2945	1-8
A	H. SCHLAAD et al., "Ammonium-mediated polymerization of amino acid N-carboxyanhydrides: Kinetic investigations", PMSE Preprints, 2007, vol. 97, páginas 183-184	1-8
A	Y. KAMEI et al., "Synthesis of polypeptide-polyether conjugates from an activated urethane derivative of $\gamma$ -benzyl-L-glutamate as a monomer", Polymer Bulletin, 2008, vol. 60, nº 5, páginas 625-634	1-8
A	T. J. DEMING, "Polypeptide and polypeptide hybrid copolymer synthesis via NCA polymerization", Adv. Polym. Sci., 2006, vol. 202, páginas 1-18	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.10.2012

Examinador  
E. Davila Muro

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K2/00** (2006.01)  
**C07K1/107** (2006.01)  
**C08G69/10** (2006.01)  
**C08G63/91** (2006.01)  
**A61K47/48** (2006.01)  
**A61K49/12** (2006.01)

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

C07K, C08G, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 9-11	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 9-11	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	H. MORI et al., Polymer, 2007, vol. 48, nº 20, pgs. 5867-5877	
D02	I. DIMITROV et al., Chem. Commun., 2003, vol. 23, pgs. 2944-2945	
D03	H. SCHLAAD et al., PMSE Preprints, 2007, vol. 97, pgs. 183-184	
D04	Y. KAMEI et al., Polymer Bulletin, 2008, vol. 60, nº 5, pgs 625-634	
D05	US 2008/0279778 A1	13.11.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de poliglutamatos, como homopolímeros y copolímeros dibloque y tribloque, mediante la polimerización controlada de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos (NCAs) utilizando como iniciador una amina primaria en forma de sal de amonio cuaternario con el anión tetrafluoroborato  $\text{BF}_4^-$ . La invención también se refiere a los poliglutamatos obtenidos y a la utilización de los mismos como transportadores y administradores de fármacos o como agentes de diagnóstico por imagen molecular.

El documento D01 divulga un procedimiento de polimerización por apertura de anillo del N-carboxianhidrido de  $\gamma$ -bencil-L-glutamato (BLG-NCA) utilizando n-butilamina como iniciador a 30°C y en presencia de diferentes líquidos iónicos, entre los que se mencionan está el [BMI][ $\text{BF}_4$ ] 1-n-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (ver página 5869, Tabla 1, entrada 2). En el documento se hace referencia al efecto que los aniones  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$  del líquido iónico tienen sobre la polimerización del BLG-NCA (ver página 5870, Tabla 2) y se menciona la existencia de interacciones entre el líquido iónico y el monómero NCA, así como entre el líquido iónico y el iniciador amina primaria (ver páginas 5872, 5873, 5876). La diferencia entre la polimerización descrita en D01 y la que se realiza en la invención radica en que no se utiliza como iniciador una amina primaria previamente en forma de sal de amonio cuaternario con el anión  $\text{BF}_4^-$ , aunque en D01 se menciona la presencia en el medio de dicho anión.

El documento D02 divulga la síntesis de copolímeros en bloque de poliestireno-polipéptido mediante polimerización por apertura de anillo de N-carboxianhidridos de  $\alpha$ -aminoácidos como L-lisina utilizando como iniciadores aminas primarias en forma de hidroclouros. También en el documento D03 se divulga la polimerización por apertura de anillo de N-carboxianhidridos de aminoácidos utilizando 2-feniletilamina hidrocloruro como iniciador. En ambos casos no se trata de sales de amonio con el anión  $\text{BF}_4^-$ .

El documento D04 divulga la síntesis de conjugados polipéptido-poliéter a partir de monómeros N-carboxianhidrido de  $\gamma$ -bencil-L-glutamato sustituidos (BLG-NCA). A partir de la reacción de polimerización de N-(4-nitrofenoxicarbonil)- $\gamma$ -bencil-L-glutamato utilizando *p*-(terc-butil)fenilmetilamina como iniciador se obtiene el poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamato); en presencia de polietilenglicoles con grupos amino terminales se produce la policondensación que permite obtener copolímeros en bloque que contienen segmentos de poli( $\gamma$ -bencil-L-glutamato) y segmentos de polietilenglicol. Tampoco en este caso se emplea como iniciador sales tetrafluoroborato de las aminas primarias.

En el documento D05 se divulgan poliglutamatos conjugados con diferentes fármacos, sistemas de administración de fármacos, marcadores y agentes de diagnóstico por imagen molecular (ver reivindicaciones).

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos en los que se mencione la obtención de poliglutamatos mediante polimerización por apertura de anillo de los correspondientes NCAs en las que se utilicen como iniciadores aminas primarias cuaternizadas con el anión  $\text{BF}_4$ . Por lo tanto, las características de las reivindicaciones 1-8 se consideran nuevas y con actividad inventiva y aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.

Por otra parte, la reivindicación de un producto definido por el proceso que se sigue para su obtención solo se considera nueva si el producto como tal cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva. Esto quiere decir que un producto no se considera nuevo simplemente por el hecho de que sea obtenido por un procedimiento nuevo (ver Directrices de Examen OEPM, apartado 3.2.2). Únicamente cuando el procedimiento de fabricación confiere características distintivas al producto final se puede considerar la novedad del producto obtenido por ese procedimiento.

Los procedimientos descritos en D01-D04 conducen a unos poliglutamatos que son esencialmente iguales a los de la invención (ver por ejemplo en D01, Esquema 1). Consecuentemente, no es posible reconocer novedad ni actividad inventiva a la invención recogida en la reivindicación 9, en tanto que se trata de una reivindicación de producto

Tampoco sería posible reconocer novedad ni actividad inventiva a las reivindicaciones independientes 10 y 11 relativas al uso de dichos poliglutamatos como transportadores y administradores de fármacos o como agentes de diagnóstico por imagen molecular, a la vista de lo divulgado en D05.

Por lo tanto, el objeto de la invención según las reivindicaciones 9-11 se considera que no implican novedad ni actividad inventiva y no satisfacen los criterios establecidos en los arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986.