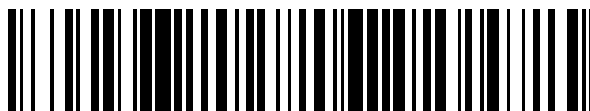


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 185**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2013** **E 13382184 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2805732**

54 Título: **Conjugados polímero-fármaco para el tratamiento de la amiloidosis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2017

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN COMUNIDAD VALENCIANA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE
(100.0%)**

**Avda. Eduardo Primo Yufera, 3
46012 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**VICENT DOCÓN, MARÍA JESÚS y
CONEJOS SÁNCHEZ, INMACULADA**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 611 185 T3

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

Conjugados polímero-fármaco para el tratamiento de la amiloidosis

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos conjugados químicos así como a composiciones farmacéuticas que los contengan para usar en terapia y diagnosis y, más particularmente, pero no exclusivamente, a nuevos conjugados de polímeros que se han unido a un resto que marca como diana y uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de la amiloidosis. La presente invención ser refiere a nuevos conjugados poliméricos que se unen a al menos un agente disruptor de fibrillas y/o un agente bloqueante de agregados además de opcionalmente un resto que marca como diana y/o una sonda para uso terapéutico y diagnóstico.

Específicamente, la presente invención se refiere a un conjugado polímero-fármaco, donde la plataforma polimérica transporta al menos un agente bioactivo, seleccionado del grupo de antraciclinas antibióticas tales como la tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina y/o doxiciclina y sus derivados, capaces de disgregar o romper las fibrillas amiloides y/o bloquear los agregados. Este conjugado puede contener en su estructura uno o más restos que marcan como diana, que proporcionarán un marcaje de diana eficaz del conjugado polímero-fármaco hacia el área seleccionada para la actividad del fármaco, aumentando la eficacia terapéutica en el tratamiento de la amiloidosis.

Antecedentes de la invención

La amiloidosis es un grupo de enfermedades caracterizado por la deposición de una proteína en forma fibrilar en el espacio extracelular llamada amiloide, de la que son ejemplos la enfermedad del Alzheimer (AD) o la polineuropatía familiar amiloide (PAF).

La polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) es un trastorno neurodegenerativo caracterizada por una deposición sistémica extracelular de fibrillas amiloides de transtirretina (TTR) en varios órganos, principalmente en el sistema nervioso periférico. Esta enfermedad se caracteriza por una polineuropatía sensitivo-motora ascendente y la progresiva desautonomía, volviéndose normalmente fatal 10 a 15 años tras su aparición. La TTR, un homotetrámero principalmente sintetizado en el hígado y el plexo coroide, es responsable del transporte de tiroxina y retinol. Se han identificado más de 100 mutaciones en TTR y asociadas a PAF; esta enfermedad presenta su foco más grande en Portugal y de esta manera, representa un tópico importante de investigación. El mecanismo por el cual la TTR se deposita y se vuelve patológica no se entiende completamente pero se ha establecido actualmente que la proteína se somete a una serie de eventos que dan lugar a su disociación en monómeros cuya agregación culmina con la formación de fibrillas amiloides. Aunque con resultados variables, el trasplante hepático ortotópico (OLT) se reconoce como la única modalidad terapéutica actualmente disponible para PAF. Actualmente, no hay tratamiento eficaz para este trastorno y la búsqueda de fármacos capaces de interferir con la cascada amiloidogénica ha sido bastante intensa.

Subyacente a las estrategias terapéuticas está la necesidad de identificar y caracterizar las especies de TTR formadas a lo largo del proceso y la identificación de biomarcadores para evaluar el progreso de la enfermedad y el seguimiento de los tratamientos. Saraiva et. al contribuyeron previamente a la caracterización de las dinámicas de la formación de fibrillas de la TTR, incluyendo la caracterización de las diferentes especies de TTR generadas a lo largo del proceso de la formación de fibrillas [1] lo cual permitió el cribado de diversos fármacos *in vitro*, actuando en diferentes fases de la cascada amiloidogénica [2,3] e *in vivo* [4]. El fármaco seleccionado en la presente invención, la doxiciclina (doxy) es el agente bajo estudio disruptor de fibrillas más avanzado, siendo el más eficaz desagregando las fibrillas maduras de TTR. Doxy fue capaz de romper las fibrillas amiloides *in vitro*, en los animales tratados y también logró otras mejoras respecto a marcadores de amiloide [2, 4]. La combinación de doxy con el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase II. TUDCA es un ácido biliar con actividad antiapoptótica y antioxidante. En estudios recientes, la combinación de doxiciclina con TUDCA administrada a ratones con deposición de amiloide fue más eficaz que ambos fármacos administrados por separado. Se observó una disminución significativa de los depósitos de TTR y de diversos marcadores de tejido asociados. El efecto sinérgico observado con la combinación de doxy/TUDCA en un modelo de PAF con ratones transgénicos, cuyas dosis se situaron dentro del intervalo de cantidades tolerables en humanos, impulsó su aplicación para el tratamiento de PAF, particularmente en estadios tempranos de la enfermedad. Durante este estudio, se sugirió que el posible mecanismo para la agregación extracelular de la TTR es la influencia de metabolitos segregados generados por el estrés oxidativo y la apoptosis en TTR [5]. El efecto neuroprotector de esta clase de compuestos, además de sus propiedades anti-microbacterianas, se describió en otros muchos modelos de enfermedad incluyendo isquemia cerebral, lesión de médula espinal, enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y EA. Dentro de este ámbito, la doxiciclina en combinación con rifampin se ensayó en pruebas clínicas como terapia antibiótica en la enfermedad de Alzheimer aunque no hubo resultados estadísticamente significativos de rechazo/deterioro en comparación con el grupo placebo [7, 8]. Sin embargo, varias publicaciones evidencian las propiedades beneficiosas de las tetraciclinas para el

tratamiento de EA, tales como su actividad anti-amiloideogénica [2, 9-12]. Es importante remarcar el trabajo realizado por Cardoso et al., donde se ha demostrado la prevención de la toxicidad por beta-amiloide ($A\beta$) *in vitro* e *in vivo* [13].

5 Además, se ha descrito que la TTR se une a la proteína beta-A, la cual desempeña el papel principal en la enfermedad de Alzheimer (EA). Puede actuar como una "chaperona" previniendo la formación de agregados de beta-amiloide y por lo tanto podría paralizar la progresión de EA [14]. Este trastorno, también una enfermedad amiloidótica, afecta a un 5 % de la población por encima de los 65 años de edad y alrededor de un 20 % a los 80.

10 Sin embargo los avances en el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de amiloidosis todavía revelan una necesidad de tratamientos más eficaces por medio de potenciar la especificidad del fármaco y disminuir su toxicidad sistémica.

15 La presente invención proporciona una respuesta a esta necesidad con nuevos conjugados polímero-fármaco capaces de potenciar la actividad ya encontrada con la doxiciclina en tratamientos de enfermedades que implican amiloidosis, por ejemplo, PAF, mostrando una mayor especificidad así como una toxicidad sistémica reducida.

20 Los Polímeros Terapéuticos (PT), primeras nanomedicinas poliméricas [15, 16] son la base para el desarrollo de la invención que se basa en la conjugación de los compuestos anteriormente mencionados (de forma directa o a través de un espaciador al polímero vehículo) mediante un enlace covalente para obtener novedosos conjugados polímero-fármaco con potencial terapéutico para el tratamiento estos trastornos neuropáticos por primera vez en el campo. Los procedimientos de conjugación han demostrado una mayor especificidad y aumento o retención de la actividad de las moléculas originales; permitiendo, gracias a la multivalencia de los polímeros, la posible obtención efectos sinérgicos mediante terapia de combinación [17-19]. La conjugación también proporciona estabilidad al fármaco y puede reducir su toxicidad logrando un mejor valor terapéutico.

25 Los Polímeros Terapéuticos se conocen bien como sistemas eficaces de transporte de fármacos con beneficios clínicos demostrados desde los 90 [20, 21]. En particular, los conjugados polímero-fármaco se consideran nuevas entidades químicas (NEQ) capaces de mejorar las propiedades bioactivas de un compuesto (cambiando su farmacocinética a nivel corporal (efector EPR) y a nivel celular (endocitosis) permitiendo incluso superar mecanismos de resistencia [15, 22]) y disminuyendo sus limitaciones inherentes (corta vida media, toxicidad no específica, baja solubilidad y estabilidad, inmunogenicidad,...). Más de 16 conjugados polímero-fármaco ya han logrado el desarrollo clínico [23, 24] principalmente como agentes anticancerígenos y actualmente, se está desarrollando una segunda generación de conjugados centrada en estructuras poliméricas mejoradas, terapia de combinación o nuevas dianas moleculares para mover esta plataforma tecnológica adicionalmente [20, 21, 23, 25, 26]. El conjugado poliglutamato-paclitaxel OPAXIOTM (PGA-PTX) ya en fase II de ensayos es el ejemplo más avanzado [27, 28].

30 En la solicitud de patente internacional WO2007060524 también se describe ciertos compuestos 1,4-diazepane-2,5-diona que son capaces de conjugarse a un ácido poliglutámico a través de una unión covalente tal como un enlace amida. Se han propuesto para el tratamiento de EP, EM e ictus. El diseño del conjugado en la presente invención contempla también la presencia de un espaciador peptídico entre el fármaco y la cadena polimérica.

35 Adicionalmente, debido a la complejidad molecular de las enfermedades (tales como trastornos neurodegenerativos), la terapia de combinación se está convirtiendo en una herramienta importante para un mejor pronóstico a largo plazo y disminuir los efectos secundarios. Por lo tanto, una de las principales dianas de la presente invención es el uso de nanofármacos avanzados basados en la terapia de combinación buscando la sinergia de los agentes bioactivos empleados. Mientras los sistemas nanométricos están bien establecidos para el transporte de agentes terapéuticos de un único agente, recientemente su uso se ha extendido a la administración de una terapia multi-agente. De hecho, el único ejemplo en clínica se encuentra en una compañía canadiense, Celator Technologies Inc., la cual ha desarrollado una aproximación metódica para la terapia de combinación dentro de su tecnología de liposomas [29-33]. Esta tecnología ha dado lugar al desarrollo de diferentes formulaciones liposómicas que están bajo evaluación en ensayos clínicos de fase II, es decir CPX-1 y CPX-351. Estos primeros estudios revelaron el potencial terapéutico de esta aplicación, pero a su vez han planteado nuevos retos que necesitan ser tratados para optimizar con éxito el sistema hacia su aplicación clínica.

45 Siguiendo estos conceptos, la presente invención proporciona nuevos nanoconjugados para el tratamiento de amiloidosis involucradas en polineuropatías utilizando como plataforma polimérica el ácido poli-glutámico (PGA) y sus derivados.

50 Uno de los mayores inconvenientes que poseen los fármacos de péptidos/proteínas de bajo peso molecular en su aplicación en terapias es su solubilidad variable, baja biodisponibilidad y estabilidad limitada, por lo tanto uno de los objetos de la presente invención es dar un paso más en esta terapia potenciando la actividad hallada para la doxy en PAF y EA con conjugados polímero-fármaco, aumentando su especificidad y disminuyendo su toxicidad sistémica. Estos vehículos presentan ventajas no solo para péptidos si no también para compuestos de bajo peso molecular, permitiendo el control de su liberación en el sitio deseado. Además, la propiedad de multivalencia que poseen los

polímeros permite la conjugación de varios compuestos dentro del mismo vehículo polimérico. Además, la propiedad de la multivalencia del polímero permite la conjugación de varios compuestos activos en el mismo vehículo polimérico, la combinación de doxy y otro fármaco en el mismo polímero potenciaría sinérgicamente el valor terapéutico de estos profármacos. La sinergia puede también ser eficaz cuando los conjugados de cada fármaco se administran por separado [18]. Debido a la complejidad molecular de PAF y EA se espera lograr mejor rendimiento terapéutico si se marca como diana más de una ruta molecular de la enfermedad

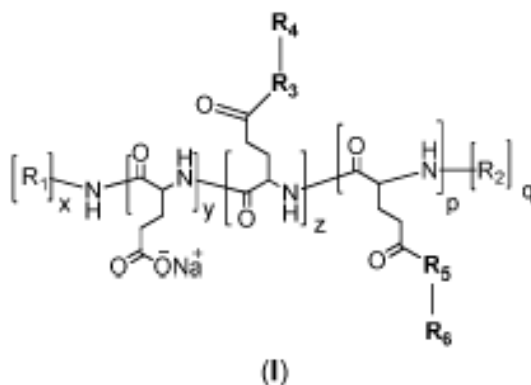
Sumario de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a nuevos conjugados poliméricos y a los usos de los mismos en terapia y diagnóstico y, más particularmente, pero no exclusivamente, a nuevos conjugados de polímeros que tienen unidos al mismo uno o más agentes terapéuticos y opcionalmente un resto que marca como diana y/o una sonda de marcaje, para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con amiloidosis.

En particular, la presente invención se refiere a un conjugado polímero-fármaco donde el soporte polimérico es portador de al menos un agente disruptor fibrilar seleccionado del grupo que incluye: antraciclinas antibióticas como la tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina y/o doxiciclina y sus derivados, etc.,... capaces de disgregar o romper las fibrillas amiloides y/o bloquear agregados. Este conjugado puede además contener en su estructura restos que marcan como diana, que proporcionan un direccionamiento efectivo del conjugado polímero-fármaco hacia la zona de actuación del fármaco, proporcionando de esta forma una mayor efectividad terapéutica en el tratamiento de enfermedades relacionadas con amiloidosis, incluyendo amiloidosis relacionadas con trastornos polineuropáticos y enfermedades neurodegenerativas como PAF y AD.

Los conjugados polímero-fármaco de la presente invención demuestran tener una marcada especificidad y aumento o retención de la actividad de las moléculas bioactivas permitiendo, gracias a la multivalencia de los polímeros, la posible obtención de efectos sinérgicos mediante terapia de combinación, además de aportar estabilidad al fármaco y reducir su toxicidad inherente logrando un mejor índice terapéutico.

De esta manera, la presente invención proporciona un conjugado polímero-fármaco representado en la fórmula general I, también representado en la Figura 1:



En la que:

R₁ representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol).

R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

R₃ representa el enlace o espaciador entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo (R₄) como tal o derivado, y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de n=2-16), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

R₄ es el fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende las antraciclinas antibióticas, tales como, tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados, y el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica como él mismo o derivatizarse previamente (incluyendo la introducción de grupos amina, tiol, carbonilo, vinilo o carboxilo).

R₅ representa el espaciador o el enlace entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo R₆ en sí mismo o derivatizado y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de n=2 a n=16), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

R₆ es el segundo fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende antraciclinas antibióticas tales como tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados (el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica en sí misma o derivarse previamente); o un resto de marcaje explotado para monitorizar el conjugado, para ensayos de biodistribución o como sonda diagnóstica donde el agente de marcaje comprende sondas fluorescentes para la formación de imágenes ópticas tales como Cy5,5, complejos de coordinación para MRI o un trazadores para PET y SPECT, incluyendo los agentes quelantes DTPA, DOTA, NOTA NODA y ligandos metálicos tales como galio, tecnecio, gadolinio, indio.

x son las unidades de monómero incluidas en R₁, de 1 a 1000.

y es un número entero que tiene un valor tal que $y/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

z es un número entero que tiene un valor tal que $z/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

p es un número entero que tiene un valor tal que $p/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

q son las unidades de monómero incluidas en R₂, de 1 a 1000.

R₂, R₃ y R₅ pueden usarse para la conjugación de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas cercanas al infrarrojo, complejos de coordinación para MRI, trazadores para PET y SPECT.

Adicionalmente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados descritos en el presente documento junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El conjugado polímero-fármaco es para su uso en un método para el tratamiento o el diagnóstico de amiloidosis en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado polímero-fármaco como se describe en el presente documento.

FIGURAS

Figura 1: Fórmula general I.

Figura 2A: Estructura química PGA.

Figura 2B: Estructura química Doxy.

Figura 2C: Estructura química Doxy-NH₂.

Figura 2D: Estructura química Bz-Gly-Gly-CONH-Doxy.

Figura 2E: Estructura química Bz-Leu-Gly-CONH-Doxy.

Figura 2F: Estructura química Gly-Gly-CONH-Doxy.

Figura 2G: Estructura química Leu-Gly-CONH-Doxy.

Figura 2H: Estructura química PGA-CONH-Doxy.

Figura 2I: Estructura química PGA-COO-Doxy.

Figura 2J: Estructura química PGA-CONH-AA-Doxy.

Figura 2K: Estructura química Doxy-NH-Gly-Leu.

Figura 2L: Estructura química Doxy-NH-Gly-Gly.

Figura 2M: Estructura química PGA-Doxy.

Figura 3: Reacción de derivatización de la doxiciclina.

Figura 4: Síntesis del conjugado PGA-CONH-Doxy – Método A (NHS, DMAP).

Figura 5: Síntesis del conjugado PGA-CONH-Doxy – Método B (DIC/HOBt).

Figura 6: Síntesis del conjugado PGA-CONH-Doxy – Método C (acoplamiento DMTMM).

Figura 7: Síntesis del conjugado PGA-COO-Doxy.

Figura 8: Síntesis del conjugado PGA-CONH-AA-Doxy.

Figura 9: Análisis RMN-¹H (300Hz, MeOD) del amino-derivado de la doxiciclina (Doxy-NH₂).

5 Figura 10: Análisis por MS-MALDI TOF del amino-derivado de la doxiciclina (Doxy-NH₂).

Figura 11: Ejemplo de un cromatograma de GPC de un conjugado PGA-Doxy (absorbancia a 273nm, fase móvil: PBS pH7,4, t_R=14min).

Figura 12: Análisis de la doxiciclina en LCMS. Espectros obtenido en el UPLC (A) y por espectrometría de masas (modo barrido) (B).

10 Figura 13: Liberación de la doxiciclina en condiciones hidrolíticas de los conjugados PGA-COO-Doxy incubados en PBS a diferentes pH a 37 °C. En el gráfico se representa en el eje Y el área bajo la curva obtenido del HPLC, (abs 273) como porcentaje del área inicial del conjugado.

Figura 14: Estabilidad de los conjugados PGA-X-Doxy en condiciones *in vitro*. (A) Representación del área bajo la curva (AUC) frente al tiempo de incubación (días). (B) Ejemplo de los cromatogramas de HPLC obtenidos al analizar las alícuotas de un conjugado.

15 Figura 15: Diagrama de SANS de soluciones de conjugados PGA-CONH-Doxy en PBS deuterado. (A) gráfico, (B) datos numéricos (r = radio, L = longitud).

Figura 16: El efecto de los conjugados de doxiciclina se evaluó en un modelo de PAF *in vitro*. En la situación control, tras 13 días de incubación, los agregados iniciales de TTR se mostraban organizados en fibrillas maduras. (A) Cuando los conjugados doxy eran activos (es decir conjugados PGA-X-Doxy) las fibrillas se rompían produciendo pequeñas partículas redondas y fibras más cortas. (B) Cuando se aumentó la concentración de doxy, se observó actividad. (C) Doxy-NH₂ mostró actividad comparable al fármaco parental original.

20 Figura 17: Análisis del tamaño de partícula (radio (nm)) medido por Dispersión de Luz Dinámica (* datos significativos con respecto al control (t=3 días), # datos significativos con respecto al control (t=6 días), p<0,05).

Figura 18: Actividad hemolítica del conjugado PGA-CO-NH-Doxy. Datos expresados como promedio (n=3). j

Figura 19: Etiquetado del conjugado PGA-CONH-Doxy con la sonda fluorescente Cy5,5.

Figura 20: Biodistribución del conjugado fluorescente PGA-CONH-Doxy-Cy5,5. Análisis *ex vivo* de los órganos 4/24h post-administración por imagen óptica monitorizada con IVIS®.

30 Figura 21: Biodistribución del conjugado fluorescente PGA-CONH-Doxy-Cy5,5. Cuantificación de la fluorescencia obtenida tras homogeneizar los órganos extraídos.

Figura 22: Ensayo de inmunohistoquímica para evaluar la deposición no-fibrilar de la TTR en determinados órganos (hígado, intestino, esófago y estómago) de los animales tratados (grupo B: animales control con enfermedad, grupo A: animales tratados con el conjugado PGA-CONH-Doxy, grupo D (grupo de combinación): animales tratados con el conjugado PGA-CONH-Doxy y un agente bloqueante de agregados de TTR. Representación semi-cuantitativa de los resultados.

35 Figura 23: Ejemplos de imágenes de histología (tinción hematoxilina/eosina) de órganos laminados y fijados (hígado e intestino (I1/I4)).

40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a nuevos conjugados polímero-fármaco químicos para usar en terapia y, más particularmente, pero no exclusivamente, a nuevos conjugados de polímeros que tienen unido a los mismos un agente disruptor de fibrillas y/o un agente bloqueante de agregados y/o un resto que marca como diana y/o un resto de marcaje y a los usos de los mismos para tratar amiloidosis. La presente invención se refiere a un conjugado polímero-fármaco donde el esqueleto polimérico lleva, al menos, un agente disruptor fibrilar capaz de disgregar o romper las fibrillas amiloides y/o bloquear agregados. Este conjugado puede contener también en su estructura restos que marcan como diana que permiten un marcaje como diana eficaz del conjugado polímero-fármaco hacia el área deseada, proporcionando una mayor eficacia en el tratamiento y/o diagnóstico de la amiloidosis.

50

La presente invención proporciona nuevos conjugados polímero-fármaco y composiciones farmacéuticas que los contengan para usar como agentes farmacéuticos frente a enfermedades que implican amiloidosis, incluyendo amiloidosis relacionadas con trastornos polineuropáticos y enfermedades neurodegenerativas como PAF y EA.

55

En una realización de la presente invención los conjugados polímero-fármaco donde el esqueleto polimérico lleva, al menos, un agente activo frente al tratamiento de la amiloidosis y al menos un resto que marca como diana y una sonda de marcaje, son para usar en diagnóstico para realizar estudios de biodistribución del agente bioactivo en modelos animales de enfermedades que cursan con amiloidosis.

60

La presente invención se refiere a conjugados polímero-fármaco que comprenden una cadena polimérica a la cual se encuentra unido de forma covalente al menos un agente bioactivo, con capacidad disruptora de fibrillas y/o actividad bloqueante de agregados.

La frase "amiloide disruptor/rompedor de fibrillas", como se usa en la presente invención, describe cualquier agente terapéutico que directamente disgregue o rompa las fibrillas amiloides y/o sus depósitos y promueva una concatenación de efectos para mejorar las condiciones relacionadas con la enfermedad como se observa por los estudios de marcadores de amiloide.

5 Los agentes disruptores de amiloides incluyen, antraciclinas antibióticas, tales como la tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina y/o doxiciclina y sus derivados, siendo preferible el uso de doxiciclina, como se representa en la Figura 2B, y su derivado Doxy-NH₂.

10 La frase "agente bloqueante de agregados", como se usa en el presente documento, describe cualquier agente terapéutico que interactúe directamente con la proteína mal plegada en su estado agregado, siendo capaz de evitar la interacción con su receptor y por lo tanto evitar la cascada de muerte celular.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, los conjugados descritos comprenden un esqueleto polimérico que representa la pluralidad total de unidades en la cadena principal, de las cuales, algunas de estas unidades se unen al primer agente terapéuticamente activo unido, opcionalmente otra relación de dichas unidades posee el segundo agente bioactivo unido, y opcionalmente otra porción de dichas unidades se ha etiquetado con una sonda para la monitorización del conjugado y opcionalmente algunas de dichas unidades del esqueleto polimérico permanecen libre y otras opcionalmente pueden unirse a un ligando director que permita al sistema cruzar la barrera hematoencefálica.

20 El agente bioactivo o los agentes bioactivos se unen a la matriz polimérica directamente o a través de un espaciador o enlace, siendo el enlace biodegradable y seleccionado del grupo que consiste en un enlace sensible al pH y enzimáticamente escindible. En el caso de enlaces sensibles a enzimas, éstos se escinden como consecuencia de la presencia de enzimas sobre expresadas en áreas inflamadas.

25 La unión entre comprende un enlace de covalente naturaleza del principio activo, a través de amida, éster, acetal, hidrazona o puente disulfuro; y puede incluir cualquier secuencia de aminoácidos, incluyendo, sustratos de metaloproteasas, (es decir MMP-9 (PVGLIG)), catepsina B (GPLG; R; PL) y otras secuencias peptídicas capaces de ser reconocidas y liberadas en presencia de enzimas localizadas en el área determinada de liberación del fármaco. Preferentemente se usan las secuencias Gly-Gly y Leu-Gly en la presente invención.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la cadena polimérica deriva de un ácido glutámico (PGA). De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la cadena polimérica deriva de poliglutamatos tales como los copolímeros en bloque, tribloques, donde los otros bloques incluyen sin limitación, polietilenglicol (PEG), poliamonoácidos solubles en agua, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-glicólico (PLGA), poli-(D,L-láctico-co-glicólico) (PLA/PLGA), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poliglicerol, poliamidoamina (PAMAM) y/o polietilenimina, (PEI) y diferentes estructuras del ácido poli-glutámico (PGA) representado en la Figura 2A, por ejemplo PGA estrella, PGA brocha, etc.), siendo preferible el uso de ácido poli-L-glutámico, ácido poli-D-glutámico o ácido poli-D,L-glutámico.

35 40 La presente patente incluye todas las posibles uniones fármaco-polímero derivadas de la modificación de las cadenas laterales del PGA (por ejemplo: alquino, azida, tiol, haluros, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidas, grupos maleimida, acetales, etilenglicol (EG) de varios pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG de 100 a 20000 g/mol), así como la modificación de los fármacos para formar todos los correspondientes enlaces con la cadena polimérica, de forma directa o a través de espaciadores. Todas las combinaciones posibles están incluidas en la presente invención.

45 50 Opcionalmente el conjugado polímero-fármaco de la presente invención podría contener un resto que marca como diana capaz de cruzar barreras biológicas específicas, como por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE). Este resto que marca como diana puede seleccionarse del grupo que comprende péptidos, proteínas o un anticuerpo monoclonal. Son ejemplos de restos que marcan como diana son cualquier ligando capaz de marcar como diana el receptor de la transferrina (por ejemplo la holo- y apo-transferrina), los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, el monoclonal (mAb) OX26, el péptido cíclico CRTIGPSVC etc.) o para marcar como diana otro receptor presente en la BHE tal como la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP-1) como el péptido Angiopep2.

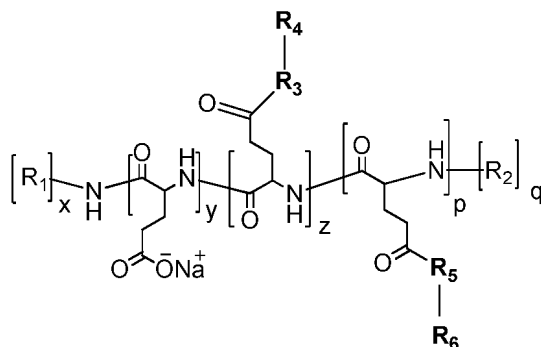
55 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención se contempla la incorporación de una sonda de marcaje, tal como sonda fluorescente del infrarrojo cercano para imagen óptica, complejos de coordinación para MRI y trazadores para PET y SPECT. Preferentemente se contempla la utilización de la sonda Cy5,5 en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la frase "% en moles" describe el número de moles de un resto unido por 1 mol del conjugado polimérico, multiplicado por 100. De esta manera, es decir, una carga de 1 % mol de un agente disruptor de fibrillas describe un conjugado polimérico compuesto por 100 unidades de cadena principal, en la cual

una unidad posee el agente bioactivo unido a la misma y las otras unidades 99 están libres o bien tienen otros agentes unidos a ellas.

- 5 El grado óptimo de carga del agente (o agentes) terapéuticamente activo y el de resto que marca como diana para un conjugado dado y un uso dado se determina empíricamente basándose en las propiedades deseadas del conjugado (por ejemplo, solubilidad en agua, la eficacia terapéutica, el perfil farmacocinético, requisitos de toxicidad y dosis), y, opcionalmente, de la cantidad de la fracción de conjugado que puede conjugarse a un esqueleto polimérico a través de la ruta sintética elegida.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la carga de fármaco unido al polímero soluble en agua puede variar. En general, los conjugados polímero-fármaco se caracterizan por contener una carga de agente terapéuticamente eficaz o resto que marca como diana en el polímero mayor del 0,5 % molar.
- 15 En ciertos aspectos de la invención, la cantidad de fármaco conjugado disruptor de fibrillas por polímero soluble en agua puede variar. En el extremo inferior, tal composición puede comprender de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, o alrededor de 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12%, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, de aproximadamente 21%, sobre 22%, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 % (w / w) masa de fármaco disruptor respecto a la masa del conjugado. En el extremo superior, dicha composición puede comprender de aproximadamente 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31% sobre 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34%, aproximadamente el 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, a alrededor de 40% o más (w / w) masa de fármaco disruptor respecto a la masa del conjugado.
- 25

Por lo tanto la presente invención proporciona un conjugado polímero-fármaco representado en la fórmula general I, también representada en la Figura 1:



30

(I)

En la que:

35 R₁ representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol).

40 R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

45 R₃ representa el enlace o espaciador entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo (R₄) como tal o derivado, y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de n=2-16), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

50

R₄ es el fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende las

antraciclina antibiótica, tales como, tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados, y el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica como él mismo o derivatizarse previamente (incluyendo la introducción de grupos amina, tiol, carbonilo, vinilo o carboxilo).

5 R_5 representa el espaciador o el enlace entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo R_6 en sí mismo o derivatizado y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de $n=2$ a $n=16$), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

15 R_6 es el segundo fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende antraciclina antibiótica tales como tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados (el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica en sí misma o derivarse previamente); o un resto de marcaje explotado para monitorizar el conjugado, para ensayos de biodistribución o como sonda diagnóstica donde el agente de marcaje comprende sondas fluorescentes para la formación de imágenes ópticas tales como Cy5,5, complejos de coordinación para MRI o un trazadores para PET y SPECT, incluyendo los agentes quelantes DTPA, DOTA, NOTA, NODA y ligandos metálicos tales como galio, tecnecio, gadolinio, indio.

20 x son las unidades de monómero incluidas en R_1 , de 1 a 1000.

25 y es un número entero que tiene un valor tal que $y/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

30 z es un número entero que tiene un valor tal que $z/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

35 p es un número entero que tiene un valor tal que $p/(x+y+z+p+q)$ multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

q son las unidades de monómero incluidas en R_2 , de 1 a 1000.

35 R_2 , R_3 y R_5 pueden usarse para la conjugación de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas cercanas al infrarrojo, complejos de coordinación para MRI, trazadores para PET y SPECT.

40 Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos básicos de nitrógeno, y por lo tanto, pueden formar sales con ácidos que también formarían parte de esta invención. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, la adición de sales con ácidos inorgánicos como el hidrocórico, hidrobromico, hidroiódico, nítrico, perclórico, sulfúrico y fosfórico, y también la adición de ácidos orgánicos como el acético, metanosulfónico, trifluorometanosulfónico, etanosulfónico, benzenosulfónico, p-toluensulfónico, benzoico, camforsulfónico, mandélico, oxálico, succínico, fumárico, tartárico y maleico. De forma similar, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más protones ácidos y, por lo tanto, pueden formar sales en presencia de bases, las cuales también forman parte de la presente invención. Los ejemplos de estas sales incluirían por ejemplo cationes metálicos, como un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio; o podrían coordinarse con una base orgánica o inorgánica. Una base orgánica aceptable incluye, entre otras, dietilamina y trietilamina. Una base inorgánica aceptable incluye, entre otras, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, carbonato sódico e hidróxido sódico.

50 Las sales derivadas de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables orgánicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que ocurren naturalmente, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como arginina, betaina, cafeína, colina, N, N-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares.

60 No hay limitación en el tipo de sal que puede usarse, siempre que ésta sea farmacéuticamente aceptable cuando se utilizan con fines terapéuticos. Las sales pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse por reacción del ácido libre o las formas base de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, tal como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo o en una mezcla de ellos.

Alguno de los compuestos de **fórmula I** de la presente invención pueden existir en su forma no solvatada así como solvatada, como por ejemplo los hidratos. En la presente invención se engloba las formas mencionadas anteriormente siendo las mismas farmacéuticamente activas.

5 Alguno de los compuestos de formula **I podrían** exhibir polimorfismo, englobando la presente invención todas las posibles formas polimórficas, y la mezcla de las mismas.

10 Varios polimorfos podrían ser preparados por cristalización bajo diferentes condiciones o mediante el calentamiento o fusión del compuesto seguido de un enfriamiento gradual o rápido. La presencia de polimorfos podría determinarse por espectroscopia RMN en estado sólido, espectroscopia infrarroja, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X u otras técnicas tales. Otro aspecto de la presente invención también proporciona un proceso de preparación del conjugado polimérico de **fórmula I**, sus derivados, sus análogos, sus formas tautómeras, sus estereoisómeros, sus polimorfos o sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende, como ingrediente activo, el conjugado de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición se envasa en un material de envasado e identificado en la impresión, en o sobre el material de envasado para uso en el tratamiento de la condición médica asociada con amiloidosis.

25 El conjugado polímero-fármaco es para su uso en un método de tratamiento de la amiloidosis en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado como se describe en el presente documento.

30 Alternativamente, el conjugado polímero-fármaco es para su uso en un método para monitorizar el conjugado en el cuerpo del paciente; el método incluye: la administración al paciente del conjugado que tiene un agente de marcaje como se describe en el presente documento unido al mismo; y empleando una técnica de imagen para monitorizar la distribución del conjugado en el cuerpo.

35 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de cualquier formulación farmacéutica. La formulación farmacéutica dependerá de la naturaleza del compuesto activo y su vía de administración. Cualquier vía de administración puede usarse, como por ejemplo, administración oral, bucal, pulmonar, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), ocular (oftálmica), transdérmica, inhalación, intranasal, transmucosa o rectal. Sin embargo la administración oral, intranasal o parenteral son las rutas preferidas. Se usarán las técnicas y métodos conocidos en el estado de la técnica para la preparación de cada una de las distintas formulaciones contempladas en la presente descripción, así como se utilizarán los excipientes comúnmente utilizados en farmacia para la preparación de las distintas formulaciones.

40 Las composiciones sólidas para administración oral incluyen entre otros, los comprimidos, granulados y cápsulas de gelatina dura, formuladas tanto para una liberación inmediata o como formulaciones de liberación retardada.

45 De forma alternativa, los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en preparaciones líquidas orales tales como emulsiones, soluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de cápsulas de gelatina blanda. Pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados, tales como agua purificada, etanol, sorbitol, glicerol, polietilenglicoles (macrogoles) y propilenglicol. Las composiciones de ayuda también pueden contener coadyuvantes tales como agentes humectantes, de suspensión, edulcorantes, saborizantes, conservantes, tampones, agentes quelantes y antioxidantes.

50 Las preparaciones inyectables para la administración parenteral comprenden soluciones estériles, suspensiones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener coadyuvantes, tales como de suspensión, estabilizantes, agentes de tonicidad o agentes dispersantes. El compuesto también puede formularse para su aplicación intranasal. Las formulaciones incluyen partículas, polvos, soluciones en las que el compuesto se dispersa o disuelve en excipientes adecuados. En una realización de la invención la composición farmacéutica está en forma de nanoesferas, micropartículas y nanopartículas.

55 La dosificación eficaz del ingrediente activo puede variar dependiendo del compuesto particular administrado, la vía de administración, la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar, así como la edad, el estado general y el peso corporal del paciente, entre otros factores. Un ejemplo representativo de un intervalo de dosificación adecuado es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, que puede administrarse como dosis única o dividida. Sin embargo, la dosificación administrada se deja generalmente bajo criterio médico.

60 Tal como se usa en la presente invención, el término "tratamiento" incluye tratamiento, prevención y control de tal afección. La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a aquellos compuestos, composiciones y/o formas de dosificación 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.

De acuerdo con un aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un procedimiento para sintetizar el conjugado descrito en el presente documento, comprendiendo el procedimiento:

5 (a) Co-polimerizar una pluralidad de unidades monoméricas del polímero, al menos una de las unidades monoméricas de terminación por un primer grupo reactivo, y al menos una de las unidades monoméricas terminando por un segundo grupo reactivo, para obtener de esta manera un copolímero que comprenda una pluralidad de unidades en la cadena, al menos una unidad que tenga el primer grupo reactivo y al menos una unidad tenga el segundo grupo reactivo, siendo capaz de reaccionar el primer grupo reactivo con el resto que marca como diana y siendo capaz el segundo grupo reactivo de reacciona con el agente terapéuticamente activo, o:

15 (b) Polimerización de una única unidad monomérica por medio de un bloque polimérico como iniciador, y/ o, Modificación posterior después de la polimerización del primer bloque polimérico sintetizado obteniendo dos o más grupos reactivos terminales en la cadena polimérica inicial con longitudes poliméricas modificables a la cadena principal, dando distintas estructuras poliméricas y / o conformaciones en solución, y/o, Construcción de un tribloque polimérico basado en una estructura donde el bloque central posee el primer grupo reactivo capaz de reaccionar con el agente o agentes terapéuticos y/o el agente de marcaje y uno de los bloques poliméricos finales termina por un segundo grupo reactivo siendo capaz de reaccionar con el agente de marcaje, el resto que marca como diana o un segundo agente terapéutico.

20 (c) Hacer reaccionar el polímero vehículo con el resto que marca como diana o un derivado del mismo, a través del primer grupo reactivo, para obtener de esta manera un vehículo polimérico que lleva el resto que marca como diana unido a una cadena polimérica del mismo; y

25 (d) Hacer reaccionar el polímero vehículo con el agente terapéuticamente activo o un derivado del mismo, a través del segundo grupo reactivo, para obtener de esta manera el conjugado de Formula I o hacer reaccionar el polímero vehículo con el primer agente terapéuticamente activo o un derivado del mismo y en segundo lugar el siguiente agente terapéutico o un derivado del mismo (ya unido a otro polímero o para unirse al polímero inicial post-modificado) con la cadena polimérica principal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención la etapa (b) puede llevarse a cabo de forma previa, concomitante o posterior a (c).

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos una de las unidades monoméricas terminales del primero o segundo grupo reactivo comprende además un espaciador a modo de unión entre la unidad monomérica y el grupo reactivo.

40 A menos que se indique otra cosa, todas las técnicas y/o términos científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en las prácticas o los ensayos de las realizaciones de la invención, se describen a continuación ejemplos de métodos y/o materiales. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo definiciones, lo controlará.

45 EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

50 Todas las reacciones que requieren condiciones anhidras se realizaron en atmósfera de nitrógeno o argón.

Los reactivos y disolventes utilizados eran de grado A.R. o bien se purificaron por técnicas convencionales.

55 Cromatografía por exclusión de tamaño: Se utilizaron columnas con resina Sephadex®G25/PD10 utilizando H₂O como eluyente. El análisis SEC se realizó usando un sistema HPLC se empleó de Waters (Milford, EE.UU.) compuesto por un automuestreador 717, una unidad detectora de matriz de fotodiodo 2996 (modelo Z996), 3 bombas 515 y un detector de fluorescencia multi lambda 2475, con dos columnas en serie TSK-gel (G300 y G25000 PWXL). Se utilizó un flujo de 1 ml/min y tampón PBS 0,1 M como fase móvil. También para el análisis SEC de conjugados PEGilados, Zorbax® column GF-250 (4.6x250mm, 4µm) de Agilent technologies (EE.UU.). Para la cromatografía en fase reversa se empleó una columna LiChroCART®, Cat.1.50943 LiChrospher® 100, RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm) de Waters Ltd. (Hertfordshire, RU). Como fase móvil, se grabaron diferentes gradientes de acetonitrilo en 0,1 % de TFA acuoso. Los espectros de UV se grabaron en un espectrofotómetro Jasco V-630 UV/Vis.

60 Análisis de Resonancia magnética nuclear (RMN): Los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y espectroscopía de RMN

ordenada por difusión bidimensional (DOSY) se realizaron con un Bruker Advance AC-300 (300MHz) o AV500 (500MHz). Los desplazamientos químicos están expresados como δ en relación a la señal de TMS ($\delta = 0$ ppm) y las constantes de acoplamiento J en Hz. Los espectros se gravaron en disolventes deuterados indicados en cada caso, a 300K.

5 Cromatografía líquida-espectrometría de masas (CLEM). El equipamiento utilizado fue un Acquity Ultra Performance LC (Waters) con un detector PDA acoplado a un espectrómetro de masas Micromass ZQ Waters 400 LC Single quadrupole. La columna cromatográfica utilizada con este equipo fue una columna de fase reversa RP-18 Kinetex (2.6 μ m x100mm).

10 Microscopio electrónico de transmisión (MET): Las muestras se adsorbieron en rejillas de cobre recubiertas por una película de carbón de malla 200. Tras someter las rejillas a un proceso de descarga luminiscente las muestras fueron depositadas sobre la rejilla y se sometieron a una tinción de contraste negativo con una disolución de acetato de uranilo al 1 %. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss operado a 60kV. Dispersión de luz
15 dinámica (DLS): El tamaño de partícula se midió usando un dispositivo Malvern Zetasizer Nano ZS equipado con un láser (532nm) a un ángulo de dispersión fijo de 90°. Se determinó el radio de la partícula (nm) en solución a 37 °C para los conjugados de Doxociclina y en PBS 0,020 M a 25 °C para conjugados de péptido RAGE.

20 La detección de absorbancia o fluorescencia de ensayos de muestras procesadas *in vitro* o *in vivo* se realizaron en un equipo Victor² Wallac 1420 Multilabel HTS Counter Perkin Elmer (Northwolk, CT, EEUU) utilizando las correspondientes placas de 96 pocillos. La longitud de onda de excitación fue 595 nm y la de emisión 680 nm.

25 Imagen óptica in vivo: Para los ensayos de biodistribución por fluorescencia se utilizó la plataforma IVIS®Spectrum Xenogen equipado con el software Living Image®3.2 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

Los experimentos de dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS) se llevaron a cabo en un instrumento D11 en el instituto Laue-Langevin, (Grenoble, Francia). Los datos de dispersión se expresan en función del vector Q, el cual viene dado por la expresión $Q=4\pi/\lambda \cdot \sin(\theta/2)$ donde λ es la longitud de onda y θ el ángulo al cual los neutrones son dispersados. Las longitudes de onda de los neutrones incidentes fue 6 ± 1 Å y 12 Å, dando valores accesibles de Q en los intervalos desde 0,0017 a 0,42 Å⁻¹ utilizando cuatro distancias diferentes de la muestra al detector. Las muestras en disolución fueron preparadas con una concentración de conjugado de 0,5-% en peso en escala de 1 g en D₂O (pH 5,5, 0,1M PBS) y se colocaron en células de cuarzo de 2 mm de camino óptico, manteniendo una temperatura de 37 °C ($\pm 0,2$). Estas condiciones permiten el estudio de los conjugados al pH, temperatura y fuerza iónica que experimentan los conjugados en los experimentos in vivo. Los datos fueron corregidos para la transmisión de intensidad y el fondo electrónico, y normalizados con una dispersión plana acorde a los procedimientos estándar del instrumento. Los perfiles de dispersión obtenidos, I(Q) frente a Q fueron analizados de acuerdo a $I(Q) \propto \phi V_p P(Q) S(Q) + Binc$, donde ϕ es el volumen de la fracción y V_p el volumen de la partícula. El modelo FISH se ha utilizado para el análisis de los datos [35]. FISH incorpora parámetros de factores de forma (P(Q)) y de factores de estructura (S(Q)) para describir las dimensiones de la partícula y de las interacciones entre las partículas.

40 **Declaración de ética:** todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo con las directrices de la legislación local y los protocolos aprobados por el comité institucional del cuidado y el uso animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España) y el Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC, Porto, Portugal). El peso corporal se midió una vez a la semana.

45 **ABREVIATURAS**

% p = carga de fármaco en porcentaje en peso
4TP = 4-tiopiridina
50 Ab = anticuerpo
ACN = acetonitrilo
EA = Enfermedad de Alzheimer
ELA = esclerosis amiotrófica lateral
anh. = anhidro
55 AUC = área bajo la curva
BHE = barrera hematoencefálica
Bz = bencilo
Cy = ciano
DCC = N,N'-diciclohexilcarbodiimida ddH₂O = agua milliQ
60 DIC = N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIEA = diisopropiletilamina
DLS = dispersión de luz dinámica
DMF = dimetilformamida
DMTMM·Cl = cloruro de 4-(4,6-dimetoxi[1,3,5]triazin-2-il)-4-metilmorfolinio

	DOTA = Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
	Doxy = doxiciclina
	DTPA= ácido dietilenotriaminapentaacético
	FAP = polineuropatía amiloidea familiar
5	FLI= imagen de fluorescencia
	FPLC = cromatografía ligera de proteína rápida
	Ga = galio
	GA = ácido glutámico
	Gd = gadolinio
10	GI = tracto gastrointestinal
	Gly = glicina
	GPC=cromatografía de permeación en gel
	Hb = hemoglobina
	EH = enfermedad de Huntington
15	HOBt = hidroxibenzotriazol
	HPLC= cromatografía líquida de alta presión
	i.v. = intravenoso
	IHC = inmunohistoquímica
	LCMS=cromatografía líquida - espectrometría de masas
20	LRP1= proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
	m/z = masa/carga
	MALDI TOF = desorción/ionización láser asistida por matriz
	MRI=imagen por resonancia magnética
	MS= espectrometría de masas
25	EM = esclerosis múltiple
	MW = peso moleculclar
	NHS=N-hidroxisuccinimida
	NIR = cercano al infrarrojo
	NMR=resonancia magnética nuclear
30	NODA= 1,4,7-triazaciclononano-1,4-diacetato
	NOTA= ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-triacético
	PAMAM= poliamidoamina
	PB = tampón fosfato
	PBS=tampón fosfato salino
35	EP = enfermedad de Parkinson
	PDC = conjugado de polímero fármaco
	PEG = polietilenglicol
	PEI = polietilenimina
	PET = tomografía por emisión de positrones
40	PGA = ácido poli-L-glutámico
	PLA = ácido poliláctico
	PLGA = ácido poliláctico-glicólico
	SNP = sistema nervioso periférico
	PPC = conjugado polímero proteína
45	PT = terapéuticos de polímero
	RAGE = receptor para productos finales de glicación avanzada
	RBC= eritrocitos
	RP = fase reversa
	RP-HPLC = cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
50	TA = temperatura ambiente
	SANS=dispersión de neutrones a bajos ángulos
	SEC=cromatografía por exclusión de tamaño
	SPECT=tomografía computarizada por emisión de fotones individuales
	MET=microscopía de transmisión de electrones
55	Tf = transferrina
	TFA = ácido trifluoroacético
	TfR = receptor de transferrina
	T _R = tiempo de retención
	TTR = transtirretina
60	UPLC = cromatografía ligera de ultra rendimiento
	UV = ultravioleta
	v/v = volumen/volumen

Ejemplo 1: Síntesis de los conjugados polímero-fármaco

PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACIÓN DE LA DOXICICLINA (DOXY-NH₂)

El proceso general de derivatización de la doxiciclina resulta en la obtención de Doxy-NH₂ (compuesto mostrado en la Figura 2C) y se encuentra esquematizado en la Figura 3.

Doxiciclina hidrocloreto (0,5000g, 512,94g/mol) fue añadida lentamente a una solución concentrada de H₂SO₄ (1,75 ml). Tras finalizar la liberación de gas, la solución naranja fue precipitada lentamente en 100ml de dietileter frío en un baño de hielo. La sal de hidrosulfato se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó bajo flujo de N₂. El producto (polvo color naranja, 542,12 g/mol) se re disolvió en H₂SO₄ (5 ml), se enfrió a 0° C y NaNO₃ (1,56eq, 101 mg, 84,99g/mol) se añadió durante 10 min mientras la reacción se agitaba. Después de 3 horas a 0° C, la reacción se precipitó directamente en 200 ml de dietileter frío y se dejó enfriar en un baño de hielo. Después la mezcla se filtró a vacío. El precipitado se lavó con éter y se secó al aire, obteniendo un polvo naranja que se usó sin más purificación. El producto se analizó mediante RMN-1H (MeOD) (Figura 9). La nitración se puede producir en dos posiciones diferentes (orto-(C9) y para-(posiciones C7) respecto al grupo hidroxilo. C9 es la posición preferente.

El bruto (0,3634g) se disolvió en 5 ml de MeOH y se añadió un 10% de Pd / C (25 mg). El matraz se purgó con H₂ y se dejó conectado a un globo lleno de H₂. La reacción se dejó bajo agitación durante 2 h. Después de la filtración del catalizador a través de celite, la solución se diluyó con 7,5 ml de MeOH y se precipitó en 100 ml de éter dietílico previamente enfriado. La mezcla se centrifugó (8000 rpm, 4 °C, 5 minutos) y el éter fue eliminado por decantación. El sólido naranja se secó bajo flujo de nitrógeno y se analizó por RMN-1H (MeOD) y espectroscopia de masas MALDI-TOF (Figura 10.).

Rendimiento= 70 % (derivatización en C9 80 %). RMN-¹H (300 MHz, MeOD) Derivado en C9 δ 7,57ppm (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,06ppm (d, J = 8,4 Hz, 1H), derivado en C7 δ 7,15ppm (s, 1H). Análisis por espectrometría de masas: [M+1]. =460,1180 Da.

SÍNTESIS DE CONJUGADOS PGA- DOXY

La conjugación de doxiciclina a PGA se ha logrado a través de diferentes enlaces utilizando para ello distintas rutas químicas, obteniendo la unión de la doxy de forma directa a la cadena principal del polímero, así como a través de espaciadores escindibles. La síntesis explicada a continuación muestra ejemplos tales como enlaces éster y amida.

El porcentaje molar de fármaco conjugado fue modificado en toda la síntesis que se describen a continuación con el fin de obtener una familia de conjugados y explotar las diferentes propiedades (actividad, conformación en solución, estabilidad) obtenidos en cada uno de los conjugados finales. Los resultados varían desde un 1 al 60 % en peso.

En ciertos aspectos de la invención, la cantidad de conjugado de fármaco disruptor de fibrillas por polímero hidrosoluble puede variar. En el extremo inferior, dicha composición comprende de aproximadamente 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, o alrededor de 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, de aproximadamente 21 %, sobre 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 % (p / p) masa de fármaco disruptor respecto a la masa del conjugado. En el extremo superior, dicha composición comprende de aproximadamente 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 % sobre 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, a alrededor de 40 % o más (w / w) masa de fármaco disruptor respecto a la masa del conjugado.

Síntesis de PGA-COO-Doxy

La síntesis general del conjugado PGA-COO-Doxy se representa en la Figura 6. La estructura química del conjugado PGA-COO-Doxy se encuentra ilustrada en la Figura 2I. Se explica a continuación la metodología utilizada para la unión de los grupos carboxilo a grupos alcohol.

De forma resumida, los grupos carboxilo de PGA se activaron previamente con N-hidroxisuccinimida (NHS). PGA-NHS (MW de la unidad promedio depende del porcentaje de activación NHS, por ejemplo: para un 52 % de activación MWunidad = 179,6 g/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en DMF anhídrico bajo una atmósfera inerte de N₂. En un vial separado, doxy (512,94 g/mol) se disolvió en las mismas condiciones. Una vez disuelta, la doxy fue añadida a la solución de PGA-NHS. A continuación, se añadió una cantidad catalítica de DMAP y el pH se ajustó a 8 con DIEA. Después de 12-16 h bajo agitación a temperatura ambiente protegido de la luz, la DMF se evaporó a alto vacío hasta que el producto se secó. Los reactivos no reaccionados, así como subproductos de reacción se eliminaron por lavado con una mezcla de CHCl₃: acetona (4:1) en hielo durante 30 min. Después, el disolvente se separó por centrifugación y el residuo sólido se secó a vacío.

Síntesis de PGA-CONH-Doxy

La síntesis general del conjugado PGA-CONH-Doxy se representa en la Figura 4, 5 y 6. La estructura químicas del conjugado PGA-CONH-Doxy se ilustra en la Figura 2H. Se explica a continuación la metodología utilizada para la unión de los grupos carboxilo a grupos amino.

5 Método A (Figura 4): NHS.DMAP

El PGA activado previamente con NHS MW de la unidad promedio depende del porcentaje de activación NHS, por ejemplo: para un 52 % de activación MWunidad = 179,6g/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en DMF anhidra bajo una atmósfera de N₂. Por separado, doxy-NH₂ (557,13g/mol) se disolvió en las mismas
10 condiciones. Una vez disuelto, doxy-NH₂ se añadió en la solución principal de PGA-NHS. A continuación, se adicionó una cantidad catalítica de DMAP y el pH se ajustó a 8 con DIEA. Después de 5 h bajo agitación a temperatura ambiente protegido de la luz, la DMF se evaporó a alto vacío hasta que el producto se secó. Los reactivos excedentes así como subproductos de reacción se eliminaron por lavado con una mezcla de CHCl₃: acetona (4:1) en hielo durante 30 min. Después, el disolvente se eliminó por centrifugación y el residuo sólido se
15 secó a vacío.

Método B (Figura 5): DIC/HOBt

PGA (MWunidad ácido glutámico = 129,1/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en DMF anhidra bajo una atmósfera de N₂. Dependiendo del porcentaje molar de carga del fármaco a incorporar, la cantidad reactivos fue modificada. A continuación se detalla el protocolo para 15 mol %: DIC (0,035mmol, 1,5 eq por grupo carboxilo, 0,836g/cm³, 126,20g/mol) fue añadido a la reacción y después de 5 min, HOBt (0,035mmol, 1,5 eq por grupo carboxilo, 135,10 g / mol) fue incorporado en forma sólida. 10min después, doxy-NH₂ (0.035mmol, 557,13g/mol) disuelto en DMF anhidra fue incorporada a la reacción principal. El pH se ajustó a 8 con DIEA.
25 Después de 12-16h bajo agitación a temperatura ambiente protegido de la luz, la DMF se evaporó a alto vacío hasta que el producto se secó. Los reactivos excedentes así como subproductos de reacción se eliminaron por lavado con una mezcla de CHCl₃: acetona (4:1) en hielo durante 30 min. Después, el disolvente se eliminó por centrifugación y el residuo sólido se secó a vacío

30 Método C (Figura 6): acoplamiento vía DMTMM

Previamente, se colocó PGA en forma de sal sódica en un matraz de fondo redondo y se disolvió en ddH₂O. Separadamente y como ejemplo para una activación del 30 % de grupos carboxilo, doxy-NH₂ (0,6 eq, 557,53 g/mol) y DMTMM • Cl (0,3 eq, 276,77g/mol)) se disolvieron también en ddH₂O y después se añadieron al matraz. pH = 8 La
35 reacción se dejó bajo agitación 24 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de reacción, el producto se secó por liofilización y se purificó.

Síntesis de PGA-CONH-AA-Doxy

La síntesis general del conjugado PGA-CONH-AA-Doxy se representa en la Figura 8. La estructura química del conjugado PGA-CONH-AA-Doxy se encuentra en la Figura 2J. Se detalla a continuación la unión de los grupos carboxilo a grupos amino. Primero, el espaciador amino-prottegido (gly-gly o leu-gly) se unió al fármaco, a continuación se procedió a la desprotección y finalmente a su conjugación a través de un enlace amida al polímero portador.
45

Síntesis de Leu-Gly-NH-Doxy (Figura 2K)

Z-Leu-Gly-OH (0,064mmol, 322,36g/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en 0,5 ml de DMF anhidra bajo una atmósfera inerte y agitación continua. Después, se añadió DMTMM • BF₄ (0,07 mmol, 1,1 eq, 328,07g/mol) previamente disuelto en 0,5 ml de DMF anhidro. Tras 10 minutos, doxy-NH₂ (0,014mmol, 2,2 eq, 557,13g/mol) se añadió disuelta en 2 ml de DMF anh. Después de comprobar el pH (8), la reacción se dejó bajo agitación durante 14h a temperatura ambiente y protegida de la luz. A continuación, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se lavó varias veces con ddH₂O, separando cada vez la fase líquida por centrifugación (4 ° C, 4000 rpm, 10 min). Todo el sobrenadante se recogió y se liofilizó. El producto sólido obtenido (28.3mg) se analizó por RMN-1H, y posteriormente se disolvió en 5 ml de MeOH para proceder a eliminar el grupo protector de la secuencia peptídica. La disolución se colocó en un matraz de fondo redondo. A continuación, una cantidad catalítica de Pd(OH)₂ /carbón activo y el matraz se purgó primero con N₂ y después con H₂. La reacción se dejó en agitación durante 12 h bajo presión de H₂ y protegido de la luz. Después, la reacción se filtró a través de una columna de celite y se precipitó sobre dietileter frío. El éter se separó por centrifugación y el gel obtenido se secó sobre vacío.
60

Rendimiento: 70 %. RMN-¹H Doxy-NH-Gly-Leu-Z (300 MHz, MeOD) δ 7,64(m, 1H, C8 Doxy-NH-), 7,40 – 7,08 (m, 5H+1H C7 Doxy-NH-), 5,19 – 4,93 (m, 2H), 4,14 (dd, J = 9,5, 5,3 Hz, 3H), 4,02 – 3,63 (m, 3H), 1,80 – 1,41 (m, 3H), 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 6H),etc.

Análisis por espectrometría de masas: Doxy-NH-Gly-Leu (desprotegido): [M+1]=673,26g/mol

Síntesis de Gly-Gly-NH-Doxy (Figura 2L)

5 Z-Gly-Gly-OH (0,079mmol, 266,25/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en 0,5 ml de DMF anhidra bajo una atmósfera inerte y agitación continua. Después, se añadió DMTMM·BF₄ (0,087mmol, 1,1eq, 328,07g/mol) previamente disuelto en 0,5 ml de DMF anhidro. Tras 10 minutos, doxy-NH₂ (0,014mmol, 2,2 eq, 557,13g/mol) se añadió disuelta en 2 ml de DMF anh. Después de comprobar el pH (8), la reacción se dejó bajo agitación durante 14h a temperatura ambiente y protegida de la luz. A continuación, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se lavó varias veces con ddH₂O, separando cada vez la fase líquida por centrifugación (4 ° C, 4000 rpm, 10 min). Todo el sobrenadante se recogió y se liofilizó. El producto sólido obtenido (27.1mg) se analizó por RMN-1H, y posteriormente se disolvió en 5 ml de MeOH para proceder a eliminar el grupo protector de la secuencia peptídica. La disolución se colocó en un matraz de fondo redondo. A continuación, una cantidad catalítica de Pd(OH)₂ /carbón activo y el matraz se purgó primero con N₂ y después con H₂. La reacción se dejó en agitación durante 12 h bajo presión de H₂ y protegido de la luz. Después, la reacción se filtró a través de una columna de celite y se precipitó sobre dietileter frío. El éter se separó por centrifugación y el gel obtenido se secó sobre vacío. Rendimiento=70 %. RMN-¹H Doxy-NH-Gly-Gly-Z (300 MHz, MeOD) δ 7,64 (m, 1H, C8 Doxy-NH-), 7,26 (5H+1H C7 Doxy-NH-), 4,96 (s, 2H), 3,69 (d, 2H), 3,57 (2H),etc.

15 Análisis por espectrometría de masas: Doxy-NH-Gly-Gly (desprotegido): [M+1]=617.20g/mol.

20 Síntesis de PGA-CONH-AA-DOXY (Figura 8.)

PGA (52 mg, 0,4 mmol unidad de ácido glutámico) se colocó en un matraz de fondo redondo y se disolvió en DMF anhidra (5 ml), bajo agitación y atmósfera de inerte (N₂). Los grupos carboxilo de las cadenas laterales se activaron con DMTMM • BF₄ (ej. para 30 % de activación, 19 mg, 0,06 mmol, 328,07g/mol) que fue añadido a la reacción principal previamente disuelto en DMF anhidra. Después de 10 min, AA-doxy-NH₂ se añadió ya disuelto en DMF anh. El pH fue comprobado (8) y la reacción se dejó bajo agitación durante 24 h protegida de la luz a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente se eliminó por evaporación a alto vacío y el residuo se lavó con MeOH a 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante por centrifugación, el producto sólido se secó bajo flujo de nitrógeno. Rendimiento: 50 %.

30

PURIFICACIÓN DE LOS CONJUGADOS PGA-X-DOXY

El término PGA-X-Doxy incluye todos los conjugados de doxiciclina y sus derivados, unidos directamente o a través de un espaciador a la cadena de PGA, mediante cualquier tipo de enlace.

35 Después de disolver el bruto (NaHCO₃ 1 M) para obtener la forma soluble en agua del conjugado, éste se purificó por cromatografía de exclusión molecular (SEC, columna G25 o G10; ddH₂O como eluyente). Las fracciones se analizaron por HPLC utilizando columnas de exclusión molecular para GPC (longitud de onda = 273 nm). Tiempo de retención = 12min. Método: gradiente isocrático, fase móvil PBS 0,1 M, pH=7.4, flujo=1ml/min, duración del método=50min. Las fracciones que contenían el conjugado se juntaron y después de la liofilización, se procedió a la caracterización del conjugado. Se muestra un ejemplo de cromatograma del producto en la Figura 11.

40

Ejemplo 2: Caracterización físico-química de los conjugados polímero-fármaco.

45 En este ejemplo se determina la carga del fármaco, estabilidad de los conjugados en diferentes medios (en plasma y condiciones hidrolíticas etc) y su conformación en solución. PGA-X-Doxy engloba todos los conjugados de doxiciclina, independientemente del tipo de unión/espaciador entre el fármaco y el polímero vehículo.

Determinación de la carga total de fármaco por espectroscopia UV

50 Para cuantificar el contenido total de doxiciclina, se determinó el porcentaje en peso del fármaco. Previamente, se realizó una curva de calibrado utilizando el fármaco. Con el conjugado PGA-X-Doxy se preparó una disolución madre en ddH₂O a 1 mg/ml. Para obtener mediciones de absorbancia apropiadas y reproducibles, las muestras se diluyeron con H₂O. La carga de fármaco total de los conjugados se determinó midiendo la densidad óptica a 273nm en H₂O. Como blanco, se utilizó el portador polimérico (PGA) en el mismo intervalo de concentración analizado como conjugado (0-5mg/ml) en H₂O.

55

Determinación del contenido de fármaco libre mediante LCMS

60 Los conjugados PGA-X-Doxy se disolvieron en tampón fosfato salino (pH=7.4) a una concentración de 6mg/ml. Inmediatamente, se tomaron alícuotas de 100µL que fueron analizadas directamente por LC-MS sin extracción adicional (aprox. 20 µL, columna Kinetex (2.6µm, C18, 100A 100x4.6mm, fases móviles: ddH₂O/ACN ambos con 0,1 % ácido fórmico). Tanto doxy como doxy-NH₂ fueron detectados bajo estas condiciones (Mw = 444g/mol, M 445 g / mol; Mw = 459g/mol, M 460 g / mol, respectivamente) con un tiempo de retención de aprox. 10 minutos (Figura 12). En la evaluación directa de las alícuotas de PBS no se detectó doxy libre (límite de detección <0.012mg/ml). Para

corroborar el resultado, cada alícuota fue liofilizada y el residuo se lavó con MeOH y se sometió a ultrasonidos. Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron evaluados por LC-MS. De nuevo, en todos los casos las señales de fármaco fueron indetectables concluyendo que la cantidad de fármaco libre es inferior al delimitado para el desarrollo de cualquier conjugado para fase clínica. De forma paralela, el fármaco libre fue también evaluado por HPLC. Los conjugados PGA-X-Doxy se disolvieron en tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4) a una concentración de 6mg/ml. Se tomaron alícuotas (100µL) que fueron liofilizadas y cuyo residuo se lavó con MeOH (100uL). Tras sonicarlos, las muestras fueron centrifugadas (12000rpm, 5 min, 4 °C) y cada sobrenadante se purificó a través de una columna POROS 50R2 para extraer el fármaco libre. Se recogieron fracciones de 1ml que se analizaron por HPLC (columna RP-18, flujo = 1 ml/min, disolvente A: ACN 0,1 % de ácido trifluoroacético, disolvente B: H₂O 0.1% de ácido trifluoroacético; método: t = 0 min, 95 % B , t = 33 min B 5 %, t = 35 min B 5%, t = 40 min B 95%, longitud de onda = 273 nm). El tiempo de retención de la doxicilina bajo las condiciones especificadas fue de 13.7min. Como rutina, la no existencia de picos en las alícuotas evaluadas determinó una concentración de fármaco libre por debajo del límite de detección de la técnica (0,01mg/ml) y rara vez las concentraciones fueron de aproximadamente 0,098 % en peso.

Estudios de estabilidad bajo condiciones hidrolíticas

La capacidad de los conjugados de la presente invención para liberar el fármaco conjugado en presencia de diferentes pH fue evaluada. Los pHs investigados fueron 5.5 (pH áreas inflamadas), y 7,4 (condiciones fisiológicas). Los resultados se presentan en la Figura 13. Los conjugados se disolvieron a los distintos pHs a una concentración de 6 mg/ml se incubaron a 37 °C durante 17 días. El pH se comprobó diariamente y fue ajustado en caso necesario. Alícuotas de 100µl de las muestras fueron tomadas a diversos tiempos. Una vez tomada la alícuota, se procedió a su neutralización con tampón de fosfato de amonio (1M) con el fin de evitar una mayor degradación. El análisis de pérdida de Mw del conjugado se realizó por HPLC (tiempo de retención = 12min, método: gradiente isocrático con PBS 0.1 M pH = 7.4 como fase móvil, flujo = 1ml/min, 50min).

Los conjugados con enlace amida (PGA-CONH-Doxy) o espaciador unido por enlace amida PGA-CONH-AA-Doxy) demostraron ser estables en las condiciones de pH y tiempo ensayados, mientras que los conjugados con enlaces éster (PGA-COO-Doxy) mostraron una liberación del fármaco en función del tiempo dependiente del pH.

Estabilidad de los conjugados PGA-X-Doxy en plasma

La estabilidad en plasma se evaluó mediante la incubación de cada uno de los conjugados (6mg/ml) durante 24 horas a 37 °C disueltos en el plasma recién extraído de roedores. El fármaco libre se usó como control positivo y plasma sin compuesto como control negativo. Se tomaron alícuotas (100µL) de cada disolución a determinados tiempos (0min, 1h, 4h, 8h y 24. A cada muestra, se añadieron 100µl de ACN para precipitar las proteínas del plasma. Después de la centrifugación (12000 rpm, 5 min, 4 °C), los sobrenadantes (sobrenadante 1) se recogieron y se sometieron a análisis por HPLC como se ha descrito anteriormente. Los pellets se lavaron con MeOH (100µL) para extraer el fármaco libre mediante su agitación en vórtex y posterior sonicación. Tras la centrifugación (12000 rpm, 5 min, 4 °C), cada sobrenadante se recogió (sobrenadante 2) y se analizó por HPLC. La cantidad de doxicilina liberada por los conjugados en presencia de plasma resultó ser no significativa, demostrando la estabilidad de estos y su adecuación para la posterior administración intravenosa.

Estabilidad de los conjugados PGA-X-Doxy en las condiciones de los ensayos *in vitro*

Los estudios de disgregación de fibrillas se llevaron a cabo mediante la incubación de los con fibrillas de TTR en PBS pH=7.4 a 37 °C. Se realizaron estudios de estabilidad bajo las mismas condiciones, se estableció un ensayo de estabilidad de PBS con los mismos parámetros. Los conjugados (6 m/ml) se disolvieron en PBS 0.1M pH=7.4 y se incubaron a 37 °C durante 16 días. Se utilizaron condiciones estériles. Se tomaron alícuotas de 100 µl de las muestras en diferentes puntos de tiempo de hasta 16 días. La pérdida de MW de los conjugados se evaluó con columnas de GPC en un sistema de HPLC, utilizando la metodología y parámetros anteriormente descritos antes. Además, se realizó la extracción de fármaco que de nuevo fue analizado con el sistema de LC-MS. La Figura 14 (A / B) muestra los resultados del estudio.

Estabilidad de los conjugados PGA-X-Doxy en plasma

La estabilidad en plasma se evaluó incubando cada uno de los conjugados (3-6 mg/ml) durante 24 h a 37 °C en plasma recientemente extraído de roedores. Se usó fármaco libre como un control positivo y suero sin compuesto como uno negativo. A varios puntos de tiempo (0min, 1 h, 4h, 8h y 24h), se recogieron alícuotas de 100ul. A cada muestra, se añadieron 100ul de ACN para precipitar las proteínas séricas. Después de la centrifugación (12000 rpm, 5 min, 4 °C), se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a análisis por HPLC como se describe anteriormente. Los gránulos se lavaron con MeOH (100ul) para extraer el fármaco libre fuera de los gránulos. Para redissolver el fármaco libre en MeOH, el sólido se sometió a vórtex y después se sometió a ultrasonidos. Posterior a la centrifugación, (12000 rpm, 5 min, 4 °C), se recogieron los sobrenadantes 2 y se analizaron por HPLC como se informa a continuación. La cantidad de liberación de Doxy de los conjugados en presencia de suero se determinó ser

insignificante.

Conformación en solución de conjugados PGA-X-Doxy a través de estudios de dispersión de neutrones en ángulo pequeño (SANS)

5 La conformación en solución es una herramienta útil para explicar la actividad de los conjugados ya sea *in vitro* o *in vivo*. La disponibilidad del fármaco dependiendo de la conformación adoptada podría estar directamente relacionada con la actividad observada. Con el fin de elucidar las diferencias en la actividad observada *in vitro* en los conjugados de PGA-Doxy, dos compuestos con carga de fármaco diferente, 17 y 43 %, fueron estudiados por SANS. Las
10 muestras fueron evaluadas en PBS deuterado 0,1 M, pH=5,5 entre un intervalo de concentraciones de 0,5-2% en peso a 37°C (\pm 0.2). Los resultados obtenidos (Figura 15 A/B) mostraron una conformación similar de ambos compuestos que no ajustan a modelos simples como bobinas o esferas. Se pudo concluir del ensayo que no hay cambios significativos en la conformación entre ambos conjugados pero la estructura podría ser de mayor tamaño en el caso del conjugado con mayor carga (43% en peso).

Ejemplo 3: Estudios de actividad *in vitro* de los conjugados polímero-fármaco: Estudios de disrupción de fibrillas TTR de los conjugados PGA-X-Doxy

Preparación de las fibrillas amiloideas

20 La proteína mutante TTR (variante Leu55Pro) se dializó en agua a pH = 7.4 durante 24 horas a 4 °C. La solución dializada se centrifugó, el sedimento obtenido se lavó y re suspendió en PBS estéril. La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry. La concentración de la muestra se ajustó a 1mg/ml y a continuación la disolución de la proteína se incubó a 37 °C durante 10-13 días hasta la formación de fibrillas, la cual fue demostrada
25 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Cribado de disruptores de fibrillas de TTR

30 Hallazgos anteriores revelaron que la doxiciclina actúa como un disruptor de fibrillas de TTR tanto *in vitro* como *in vivo* [5]. Todos los conjugados de PGA-X-Doxy sintetizados fueron evaluados para determinar su capacidad como disruptores en comparación con el fármaco original (doxy). Entre ellos se incluyeron conjugados con el fármaco enlazado directamente al PGA: (1) PGA-COO-Doxy (enlace éster), (2) PGA-CONH-Doxy-NH2 (enlace amida) y a través de espaciadores peptídicos (3) PGA-CONH-AA-Doxy; con diferentes cargas de fármaco.

35 En condiciones estériles, se prepararon disoluciones madre en agua de todos los compuestos a una concentración equivalente de fármaco (3.36mM Doxy), se filtraron antes de su uso). Como controles, PGA, Doxy y Doxy-NH2 fueron evaluados. Tras alicuotar las fibrillas de TTR L55P, se añadieron los conjugados y controles en una concentración de 6.7-veces de exceso molar de doxy (180 μ M). Todas las muestras fueron analizadas por TEM y DLS tras 3 y 6 días para monitorizar la rotura de fibrillas.

40 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis de MET, se tomaron alícuotas de las muestras en un entorno estéril. Tras vortear la alícuota, se procedió a su absorción sobre una rejilla (ver materiales y métodos). Para la tinción negativa, las rejillas se lavaron con agua desionizada y se tificaron con una solución de acetato de uranilo al 1. En la Figura 16 se muestra un
45 ejemplo de las imágenes obtenidas.

La visualización de las muestras por MET reveló que, a la concentración de fibrillas [6.7x10⁻⁵/100 μ g] evaluada en presencia de los conjugados, las fibrillas fueron disgregadas tras los 3 o 6 días de incubación debido a la aparición de fibrillas de menor extensión o una desagregación completa (Fig16). Varios conjugados demostraron mayor
50 actividad que el fármaco original a igualdad de equivalentes de fármaco.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Las mismas muestras analizadas por MET fueron evaluadas en paralelo por DLS, como técnica complementaria para testar la disgregación de las fibrillas por su acción de los conjugados PGA-X-Doxy. Los resultados se muestran en la Figura 17.

Ejemplo 4: Ensayo de hemólisis de los conjugados polímero-fármaco sintetizados

60 Para confirmar la idoneidad de los nanoconjugados para su administración intravenosa en los estudios *in vivo*, se testó la actividad hemolítica del conjugado PGA-Doxy.

Se prepararon disoluciones de PGA-X-Doxy, dextrano (Mw = 74000g/mol) y poli(etilenimina) (PEI; Mn ~ 60000, Mw ~ 750000, 50% en peso en H₂O) con un intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 2mg/ml en PBS a pH 7,4, 6,5 y 5,5. Se sembraron (100 μ L) en placas estériles de 96 pocillos. Se extrajo sangre de ratones adultos

mediante punción cardiaca inmediatamente después de sacrificarlos (por asfixia con CO₂ 4%) y ésta se colocó en un tubo heparinizado en hielo. Los eritrocitos (RBC) se aislaron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. El plasma (sobrenadante) se descartó y los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS. Después del tercer lavado, el sedimento de RBC fue dividido en partes iguales y se re suspendieron en disoluciones de PBS con valores de pH adecuados (es decir, 7,4, 6,5, 5,5). De cada solución de glóbulos rojos, se añadieron 100µL a las placas previamente preparadas que contenían los compuestos de ensayo. Como referencia del 100% de lisis de eritrocitos se utilizó Triton X-1% w/v. PBS se utilizó como referencia de control de absorbancia. Las placas se incubaron durante 16h a 37 °C. A continuación, las placas se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Cada sobrenadante se colocó en una nueva placa de 96 pocillos y la liberación de hemoglobina (H_b) se midió espectrofotométricamente (570nm). La liberación de H_b para cada muestra se expresó como porcentaje de la liberación producida respecto al Triton-X. PEI y dextrano representaron, respectivamente, el control positivo y el control negativo del ensayo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. El ejemplo del del conjugado PGA-CONH-Doxy 17% en peso se muestra en la figura 18. Tal y como se esperaba, el conjugado no resultó hemolítico y por lo tanto se considera apropiado para administración i.v.

Ejemplo 5: Estudios de evaluación *in vivo* de los conjugados polímero-fármaco

Síntesis del conjugado etiquetado con una sonda fluorescente

Mediante la conjugación de un colorante de infrarrojo cercano (Cyane 5.5), los conjugados fueron etiquetados para posteriores estudios de biodistribución utilizando técnicas de imagen óptica, permitiendo de esta forma su monitorización *in vivo* así como *ex vivo* de fluorescencia.

Etiquetado del conjugado PGA-CONH-Doxy con una sonda fluorescente

El proceso general de etiquetado del conjugado PGA-Doxy (compuesto Figura 2M.) está esquematizado en la Figura 19. Brevemente, 15 mg de PGA-CONH-Doxy (19% en peso, 6.8%mol, MWunidad de ácido glutámico = 180,4g/mol) se añadió a un matraz de fondo redondo y se disolvió en 3 ml de tampón borato pH = 9. Después, se adicionó 1-etil-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimida (EDAC, 155,24g/mol, 0,0032 mmol) y 10 minutos más tarde, N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, 217,13g/mol, 0,00013mmol). Finalmente, Cy5.5 (6-SIDCC, 1339g/mol, 0,011mmol) diluido en 1ml de la disolución tampón fue incorporado a la reacción. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24h protegida de la luz. Después de la liofilización de la mezcla, el residuo se purificó por columna PD10 (fracciones de 250µL) y se midió la fluorescencia de cada fracción (λ_{em} : 595/ λ_{exc} : 680nm). Las fracciones con el conjugado se juntaron y liofilizaron. Eficiencia del etiquetado:62 % (1,07 % mol Cy5.5).

Estudios de biodistribución en ratón de los conjugados polímero-fármaco mediante imagen óptica

Utilizando como modelo murino ratones sanos Balb/c (9-12 meses de edad) se realizaron estudios de biodistribución de los conjugados PGA-Doxy. Para los experimentos de monitorización del conjugado *in vivo*, los animales fueron anestesiados (previamente los animales habían sido afeitados para eliminar la interferencia de pelo en señal de fluorescencia). La monitorización del compuesto tanto *in vivo* como *ex vivo* a posteriori se realizó a través de la técnica no invasiva de imagen por fluorescencia (FLI), utilizando el IVIS® Spectrum Imaging System. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación Príncipe Felipe, y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la institución.

Biodistribución del conjugado PGA-CONH-Doxy-Cy5.5

La biodistribución del conjugado PGA-CONH-Doxy (17% en peso) etiquetado con la sonda cyane5.5 (Figura 2M.) fue evaluada por imagen óptica. El conjugado se disolvió en suero salino

(1.40mg conj/ml) y los animales fueron inyectados por vía intravenosa una dosis única de 100µL de la solución. Como controles, se emplearon ratones no inyectados. Los animales fueron anestesiados usando isoflurano en un intervalo del 1 al 3%. Cinco ratones fueron monitorizados a la vez y la configuración de imagen se ajustó en función de la fluorescencia de los animales. La fluorescencia emitida por el conjugado se detectó, fue digitalizada y se mostró superpuesta con una imagen del animal en escala de grises. La señal fluorescente se cuantificó como Eficiencia. A los distintos tiempos elegidos (0, 4 y 24h post-inyección), grupos de animales fueron sacrificados y se recolectó inmediatamente la sangre y los órganos principales (hígado, pulmones, bazo, riñones, corazón y cerebro). Los órganos fueron analizados con la misma técnica (análisis *ex vivo*). Los órganos fueron pesados, congelados y almacenados a -80 °C para cuantificar la fluorescencia posteriormente. Las imágenes de monitorización *in vivo* y *ex vivo* se muestran en las Figura 20 y 21.

Los órganos fueron homogenizados en tampón fosfato salino (PBS pH=7.4) a una determinada concentración mediante un Ultraturax (aprox. 1min, 13000rpm). La suspensión fue centrifugada durante 1h a 4000g a 4°C. Los sobrenadantes fueron recolectados para medir la fluorescencia. La cuantificación se encuentra representada en la

Figura 21. Para asegurar la extracción completa del conjugado del órgano, los pellets fueron lavados con ddH₂O pero la señal encontrada no fue significativa. Para las muestras de sangre, inmediatamente después de la extracción la sangre se centrifugó (10 min, 4000 rpm, 4 ° C) y el plasma (sobrenadante) y pellet fueron congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis. El plasma fue analizado directamente (100µL) por triplicado en placa de 96 pocillos por el detector de fluorescencia. Los resultados no mostraron acumulación específica en ninguno de los órganos testados y se observó la ruta renal para la secreción del compuesto, por la señal observada en riñones y vejiga.

Estudios preliminares de actividad en un modelo animal de PAF

10 Todos los animales fueron mantenidos y utilizados en estricta conformidad con las normas nacionales y de las Comunidades Europeas la Directiva del Consejo (86/609/CEE), y todos los estudios realizados fueron aprobados por la Junta General de Veterinaria Portuguesa (número 024976 autorización de DGV-Portugal). Los ratones transgénicos para TTR V30M humana fueron amablemente proporcionados por el profesor Suichiro Maeda de Yamanashi Universidad. En estudios anteriores, estos animales fueron analizados previamente y ~ 60% de los animales de más de 1 año de edad se encontró que tenían como deposición amiloide TTR, es decir, rojo Congo (CR)-positivo material [37] mostrando depósitos no-fibrilares de en estadios tempranos.

15 Un grupo de animales (9-11 meses de edad, n=8) fueron tratados por vía intravenosa con el conjugado de PGA-CONH-Doxy según se muestra en la siguiente Tabla 1. Los animales recibieron doble dosis por semana durante 6 semanas. Ratones no tratados fueron empleados como controles.

20 Una vez terminado el tratamiento, los animales fueron sacrificados después de la anestesiarnos con la mezcla ketamina / xilazina. Los órganos (incluyendo hígado, riñón, esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, corazón, bazo, páncreas) fueron extirpados inmediatamente y procesados. Es importante remarcar que en este modelo animal de PAF, el tracto gastrointestinal presenta la mayoría de acumulación de depósito de fibrillas. Los tejidos se fijaron en 4% de formalina tamponada neutra y embebidos en parafina o congelados inmediatamente, para su evaluación mediante microscopía o para la extracción de proteína, respectivamente.

Tabla 1:

Grupo	Conjugado	% en peso	Cantidad de fármaco por dosis
A	PGA-CONH-Doxy	43	8mg fármaco/Kg

30 Estudios de inmunohistoquímica (IHC) de los órganos procedentes de los ratones tratados

La deposición no-fibrilar de TTR en los tejidos extraídos se evaluó por inmunohistoquímica de los órganos extraídos, de los cuales también se investigó la posible toxicidad de estos depósitos (apoptosis).

35 Se cortaron secciones de 5 micras de espesor que fueron deparafinadas en xilol y se deshidrataron en una serie de alcohol con porcentaje descendiente del mismo. La actividad peroxidasa endógena fue inhibida con la mezcla 3% peróxido de hidrógeno/100% metanol, y las secciones fueron bloqueadas en 4% de suero bovino y 1% de suero de albúmina bovina en tampón PBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-TTR policlonal de conejo (Dako, 1:1000), anti-Fas policlonal de conejo (St Cruz, 1:200), y anti-Bip policlonal de conejo (St Cruz, 1:50), que se diluyeron en una solución de bloqueo y se incubaron durante 16h a 4 ° C. La visualización de antígenos se realizó con el kit de biotina-peroxidasa ExtrAvidin (Sigma Aldrich), utilizando 3-amino-9-etil carbazol (Sigma) o diaminobenzidina como sustrato. En la figura 22, se ha representado de forma semi-cuantitativa los resultados obtenidos para la deposición no-fibrilar de TTR.

40 En el modelo animal utilizado de PAF, el tracto gastrointestinal (GI) es el órgano más afectado en cuanto a la deposición fibrilar. Los resultados inmunohistoquímicos (Figura 22) obtenidos no mostraron diferencias significativas aunque

45 Brevemente, Fas juega un papel clave en la regulación de la muerte celular por apoptosis (inducida en este experimento por la TTR no-fibrilar). Fas es un receptor de necrosis tumoral que se une el ligando de Fas resultando en la formación de un complejo que induce la muerte, provocando la cascada de la apoptosis. Bip es una chaperona molecular cuya síntesis se altera cuando existen problemas en el plegamiento de proteínas. El proceso está directamente relacionado con el estrés celular. Cuando los fármacos paralizan el avance de la enfermedad, los niveles de Fas y Bip deben disminuir por las razones explicadas. Los experimentos de inmunotinción de Fas y BIP no produjeron ningún resultado analizable, ya que de nuevo los animales tratados tenían el mismo patrón que los animales control con enfermedad.

55 Análisis histológico de los órganos procedentes de los animales tratados

60 Para la evaluación de la toxicidad relacionada con el conjugado administrado se procedió al análisis histológico de las secciones de tejido tomadas como se ha descrito anteriormente. Esta técnica permite una mejor evaluación de la toxicidad severa. Las secciones embebidas en parafina se tiñeron con soluciones de hematoxilina / eosina solución (H & E). Tras la tinción, los cortes fueron examinados a fondo mediante la observación al microscopio óptico con

aumentos ((25 × y × 50) y (100 × e × 200)). Los órganos analizados fueron hígado, intestino delgado y grueso y el riñón.

Después del examen de los cortes histológicos de todos los grupos todos los órganos mostraron una morfología normal sin evidencias de toxicidad provocadas por el tratamiento. La única excepción se encontró en el hígado del grupo de control con la enfermedad, donde se observó necrosis focal, congestión moderada e infiltrado inflamatorio y vascular. En la Figura 23 se muestran algunos de los resultados del experimento.

En resumen, los resultados indican que los animales tratados no mostraron toxicidad atribuida al conjugado administrado. Todos los animales tratados mostraron patrones normales en la morfología de los tejidos respectivos. El hígado no es un órgano afectado por los depósitos de TTR, únicamente es el principal productor de la proteína. El conjugado administrado no provocó toxicidad en los órganos analizados. Los grupos ilustrados en la figura 22 son:

- Grupo A: Grupo tratado con el conjugado PGA-Doxy
- Grupo B: Grupo control (animales con enfermedad)
- Grupo C: Grupo control (animales sin enfermedad, ratones sanos)

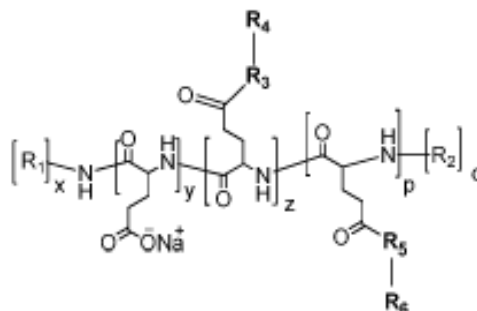
Bibliografía

1. M.J. Saraiva, et al., Family studies of the genetic abnormality in transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familiar amyloidotic polyneuropathy. *Ann NY Acad Sci*, 1984. 43: p. 86-100.
2. Cardoso, I., et al., Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for in vitro assembled transthyretin amyloid-like fibrils. *J. Mol. Biol.*, 2002. 317(5): p. 683-695.
3. Cardoso, I., G. Merlini, and M.J. Saraiva, 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB J*, 2003. 17(8): p. 803-9.
4. Cardoso, I., et al., Comparative in vitro and ex vivo activities of selected inhibitors of transthyretin aggregation: relevance in drug design. *Biochem J*, 2007. 408(1): p. 131-8.
5. I. Cardoso and M.J. Saraiva, Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. *The FASEB Journal*, 2006. 20: p. 234-239.
6. Cardoso, I., et al., Synergy of combined Doxycycline/TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *Journal of Translational Medicine*, 2010. 8(74).
7. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00439166>.
8. Molloy, D.W., et al., A multicenter, blinded, randomized, factorial controlled trial of doxycycline and rifampin for treatment of Alzheimer's disease: the DARAD trial. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2012.
9. Loeb, M.B., et al., A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*, 2004. 52(3): p. 381-7.
10. Forloni, G., et al., Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett*, 2001. 487(3): p. 404-7.
11. Familian, A., et al., Inhibitory effect of minocycline on amyloid beta fibril formation and human microglial activation. *Glia*, 2006. 53(3): p. 233-40.
12. Ryu, J.K., et al., Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia*, 2004. 48(1): p. 85-90.
13. Monteiro, F.A., et al., In vitro inhibition of transthyretin aggregate-induced cytotoxicity by full and peptide derived forms of the soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FEBS Lett*, 2006. 580(14): p. 3451-6.
14. R. Costa, et al., Testing the therapeutic potential of doxycycline in a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2011. 286(48): p. 41647-55.
15. J. Buxbaum, J. Koziol, and L.H. Connors, Serum transthyretin levels in senile systemic amyloidosis: effects of age, gender and ethnicity. *Amyloid*, 2008. 15(4): p. 255-61.
16. R. Duncan, The dawning era of Polymer Therapeutics. *Nature Rev Drug Discov*, 2003. 2(5): p. 347.
17. M.J. Vicent, H.R., R. Duncan, Polymer therapeutics: Clinical applications and challenges for development. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2009. 61 (13): p. 1117.
18. M. J. Vicent, et al., Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005. 44(26): p. 4061-6.
19. F. Greco and M.J. Vicent, Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2009. 61(13): p. 1203-13.
20. C. Deladriere, R. Lucas, and M.J. Vicent, Future trends, challenges and opportunities with polymer-based combination therapy in cancer. *Drug Delivery in Oncology: from basic research to cancer therapy*, 2011 (Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA): p. 805-837.
21. M. J. Vicent, H. Ringsdorf, and R. Duncan, Polymer therapeutics: Clinical applications and challenges for development. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2009. 61(13): p. 1117.
22. Duncan, R., Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. *Curr Opin Biotech*, 2011. 22.

23. Duncan, R., H. Ringsdorf, and R. Satchi-Fainaro, Polymer therapeutics-polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunities. *J Drug Target*, 2006. 14(6): p. 337-41.
- 5 24. F. Canal, J. Sanchis, and M.J. Vicent, Polymer-drug conjugates as nano-sized medicines. *Curr opin Biotech*, 2011. 22(894-900).
25. R. M. England, I. Conejos-Sánchez, and M.J. Vicent, Drug delivery strategies: Polymer Therapeutics. 2012. Chapter 8.2(RSC publishing): p. 456-482.
26. R. Duncan and R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*, 2011. 8(6): p. 2101-41.
- 10 27. J. Sanchis, et al., Polymer-drug conjugates for novel molecular targets. *Nanomedicine*, 2010. 5(6): p. 915-935.
28. Sabbatini, P., et al., A phase II trial of paclitaxel poliglumex in recurrent or persistent ovarian or primary peritoneal cancer (EOC): a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*, 2008. 111(3): p. 455-60.
29. Chipman, S.D., et al., Biological and clinical characterization of paclitaxel poliglumex (PPX, CT-2103), a macromolecular polymer-drug conjugate. *Int J Nanomedicine*, 2006. 1(4): p. 375-83.
- 15 30. Lim, W.S., et al., Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk Res*, 2010. 34(9): p. 1214-23.
31. Lim, W.S., et al., Schedule- and dose-dependency of CPX-351, a synergistic fixed ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in consolidation treatment against human leukemia xenografts. *Leuk Lymphoma*, 2010. 51(8): p. 1536-42.
- 20 32. Harasym, T.O., B.D. Liboiron, and L.D. Mayer, Drug ratio-dependent antagonism: a new category of multidrug resistance and strategies for its circumvention. *Methods Mol Biol*, 2010. 596: p. 291-323.
33. <http://www.celator.ca>.
34. Bendeck, M.P., et al., Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol*, 2002. 160(3): p. 1089-95.
- 25 35. Heenan, R.K., FISH data analysis program. Rutherford Appleton Laboratory, Didcot, U.K.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado polímero-fármaco de fórmula general I:



Donde el esqueleto polimérico lleva, al menos, un agente bioactivo, y opcionalmente un segundo agente bioactivo, opcionalmente una sonda para la monitorización del conjugado y opcionalmente un resto que marca como diana, y En la que:

R₁ representa un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol).

R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG, de 100 a 20000 g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

R₃ representa el enlace o espaciador entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo (R₄) como tal o derivado, y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de n=2-16), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

R₄ es el fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende las antraciclina antibióticas, tales como, tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados, y el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica como él mismo o derivatizarse previamente (incluyendo la introducción de grupos amina, tiol, carbonilo, vinilo o carboxilo).

R₅ representa el espaciador o el enlace entre la cadena polimérica principal y el agente bioactivo R₆ en sí mismo o derivatizado y es un grupo alquilo, punto de unión C-terminal definido (alquino, azida, tiol, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminas protegidas, grupo maleimida, acetales, grupos carboxílicos activados, etc.), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo poli(etilenglicol) (PEG de n=2 a n=16), aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol, histidina, cisteína y grupos amino secundarios o terciarios y secuencias de amino ácidos.

R₆ es el segundo fármaco seleccionado para el tratamiento de amiloidosis, seleccionado del grupo que comprende antraciclina antibióticas tales como tetraciclina, rolitetraciclina, minociclina, doxiciclina y sus derivados (el fármaco puede unirse covalentemente a la cadena polimérica en sí misma o derivarse previamente); o un resto de marcaje explotado para monitorizar el conjugado, para ensayos de biodistribución o como sonda diagnóstica donde el agente de marcaje comprende sondas fluorescentes para la formación de imágenes ópticas tales como Cy5,5, complejos de coordinación para MRI o un trazadores para PET y SPECT, incluyendo los agentes quelantes DTPA, DOTA, NOTA NODA y ligandos metálicos tales como galio, tecnecio, gadolinio, indio.

x son las unidades de monómero incluidas en R₁, de 1 a 1000.

y es un número entero que tiene un valor tal que y/(x+y+z+p+q) multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

z es un número entero que tiene un valor tal que z/(x+y+z+p+q) multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

p es un número entero que tiene un valor tal que p/(x+y+z+p+q) multiplicado por 100 está en el intervalo de 0,01 a 99,9.

q son las unidades de monómero incluidas en R₂, de 1 a 1000.

R₂, R₃ y R₅ pueden usarse para la conjugación de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas cercanas al infrarrojo, complejos de coordinación para MRI, trazadores

para PET y SPECT,

y sus sales, polimorfos, solvatos e hidratos para usar en el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la amiloidosis.

- 5 2. Un conjugado polímero-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
- Hay un fármaco conjugado en R4, unido directamente a la cadena polimérica o bien a través de un espaciador (R3),
 - 10 - Hay un fármaco conjugado en R4 (unido directamente a la cadena polimérica o bien a través de un espaciador (R3)) y un resto que marca como diana en R6 o (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - Hay un fármaco conjugado en R4 (unido directamente a la cadena polimérica o bien a través de un espaciador (R3)); un resto que marca como diana en R6 o (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2; y una sonda de marcaje para el diagnóstico en R6 (unido directamente a la
 - 15 - Hay un fármaco conjugado en R4 (unido directamente a la cadena polimérica o bien a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - Hay un fármaco conjugado en R4 (unido directamente a la cadena polimérica o bien a través de un espaciador (R3)); y una sonda de marcaje para el diagnóstico en R6 (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - Hay dos fármacos conjugados en R4 y en R6 (unidos de forma independiente directamente a la cadena polimérica, a través de un espaciador (R3 y R5, respectivamente)).
 - 20 - Hay dos fármacos conjugados en R4 y en R6 (unidos de forma independiente directamente a la cadena polimérica, a través de un espaciador (R3 o R5, respectivamente)), un resto que marca como diana en R6 (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2; y una sonda de marcaje para el diagnóstico en R6 o (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - 25 - Hay dos fármacos conjugados en R4 y en R6 (unidos de forma independiente directamente a la cadena polimérica, a través de un espaciador (R3 o R5, respectivamente)), y un resto que marca como diana en R6 (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - Hay dos fármacos conjugados en R4 y en R6 (unidos de forma independiente directamente a la cadena polimérica, a través de un espaciador (R3 o R5, respectivamente)), y una sonda de marcaje para el diagnóstico en R6 o (unido directamente a la cadena polimérica o a través de un espaciador (R3)) o en R2.
 - 30
3. Un conjugado polímero-fármaco para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, seleccionado del grupo que consiste en: PGA-COO-Doxiciclina, PGA-CONH-Doxiciclina, PGA-Leu-Gly-Doxiciclina, PGA-Gly-Gly-Doxiciclina, PGA-Doxiciclina-Cy5.5, PGA-Doxiciclina-DOTA/Ga, con distinta carga de fármaco/sonda de marcaje en cada grupo.
- 35
4. Un conjugado polímero-fármaco para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 **caracterizado por** contener una carga de agente bioactivo o resto que marca como diana en el polímero mayor del 0,5 % molar.
- 40
5. Un conjugado polímero-fármaco para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 4, en el que el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades relacionadas con amiloidosis se selecciona de la polineuropatía familiar amiloide (PFA) y la enfermedad de Alzheimer (AD).
- 45
6. Un conjugado polímero-fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un conjugado polímero-fármaco para usar de acuerdo con la reivindicación 6 formulada para su administración parental, oral, tópica, nasal y/o rectal.
- 50
8. Un método para obtener los conjugados polímero-fármaco de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las siguientes etapas:
- (a) Co-polimerizar una pluralidad de unidades monoméricas del polímero, al menos una de las unidades monoméricas de terminación por un primer grupo reactivo, y al menos una de las unidades monoméricas terminando por un segundo grupo reactivo, para obtener de esta manera un copolímero que comprenda una pluralidad de unidades en la cadena, al menos una unidad que tenga el primer grupo reactivo y al menos una unidad tenga el segundo grupo reactivo, siendo capaz de reaccionar el primer grupo reactivo con el resto que marca como diana y siendo capaz el segundo grupo reactivo de reaccionar con el agente terapéuticamente activo, o:
 - 55 (b) Polimerización de una única unidad monomérica por medio de un bloque polimérico como iniciador, y/ o, Modificación posterior después de la polimerización del primer bloque polimérico sintetizado obteniendo dos o más grupos reactivos terminales en la cadena polimérica inicial con longitudes poliméricas modificables a la cadena principal, dando distintas estructuras poliméricas y / o conformaciones en solución, y/o, Construcción de un tribloque polimérico basado en una estructura donde el bloque central posee el primer grupo
 - 60

reactivo capaz de reaccionar con el agente o agentes terapéuticos y/o el agente de marcaje y uno de los bloques poliméricos finales termina por un segundo grupo reactivo siendo capaz de reaccionar con el agente de marcaje, el resto que marca como diana o un segundo agente terapéutico.

5 (c) Hacer reaccionar el polímero vehículo con el resto que marca como diana o un derivado del mismo, a través del primer grupo reactivo, para obtener de esta manera un vehículo polimérico que lleva el resto que marca como diana unido a una cadena polimérica del mismo; y

10 (d) Hacer reaccionar el polímero vehículo con el agente terapéuticamente activo o un derivado del mismo, a través del segundo grupo reactivo, para obtener de esta manera el conjugado de Formula I o hacer reaccionar el polímero vehículo con el primer agente terapéuticamente activo o un derivado del mismo y en segundo lugar el siguiente agente terapéutico o un derivado del mismo (ya unido a otro polímero o para unirse al polímero inicial post-modificado) con la cadena polimérica principal.

FIG.1

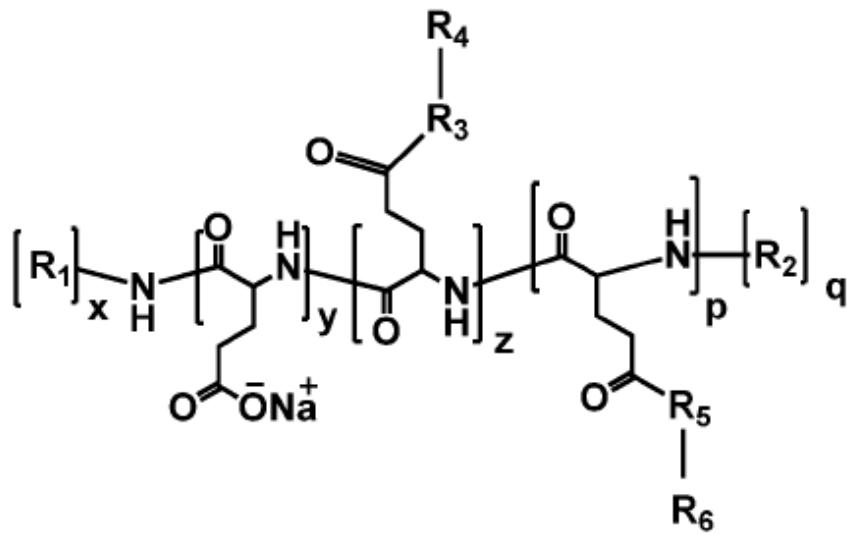
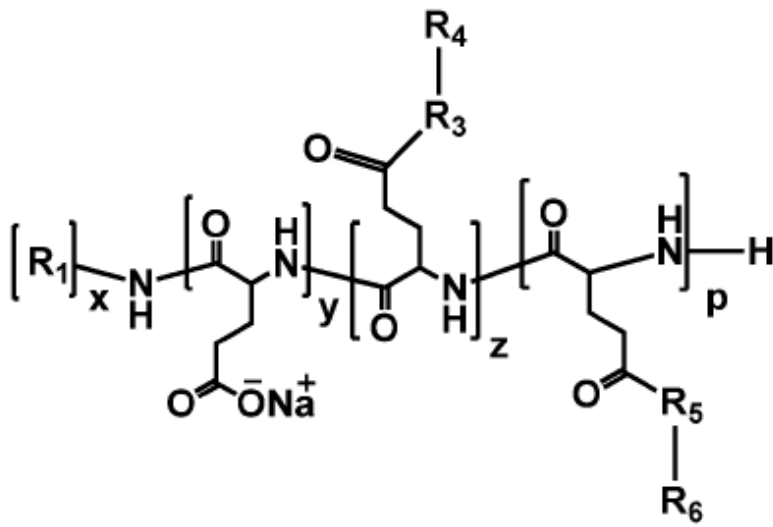


FIG.2A

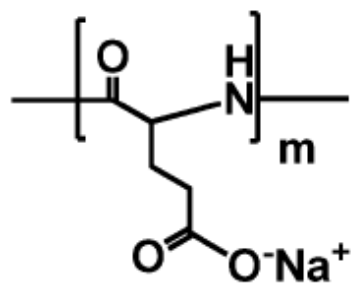


FIG.2B

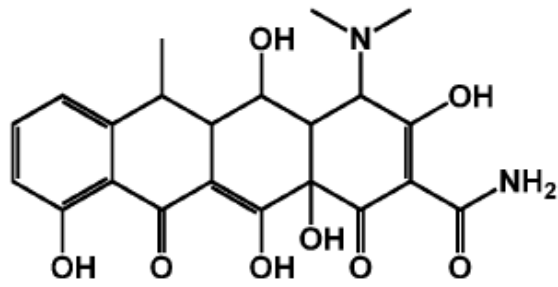


FIG.2C

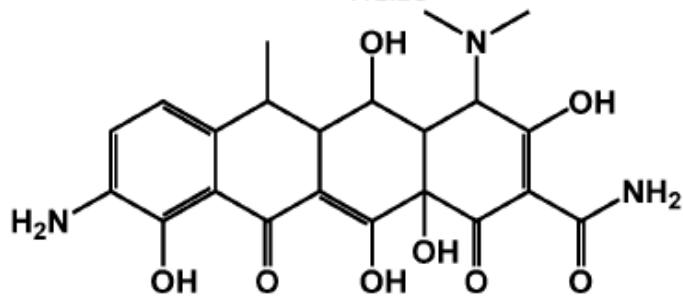


FIG. 2D

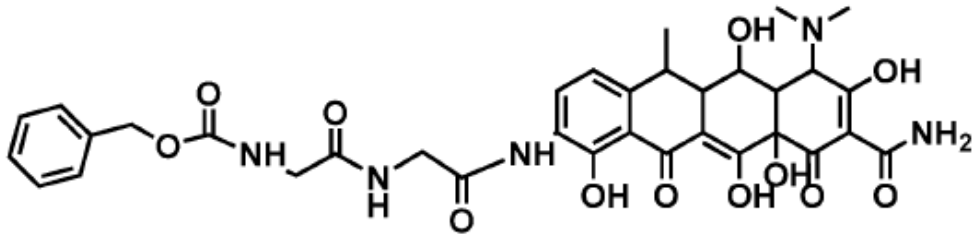


FIG.2E

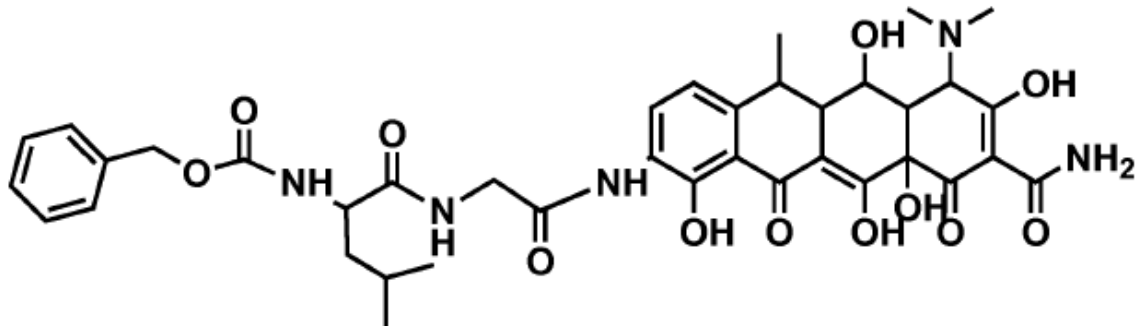


FIG. 2F

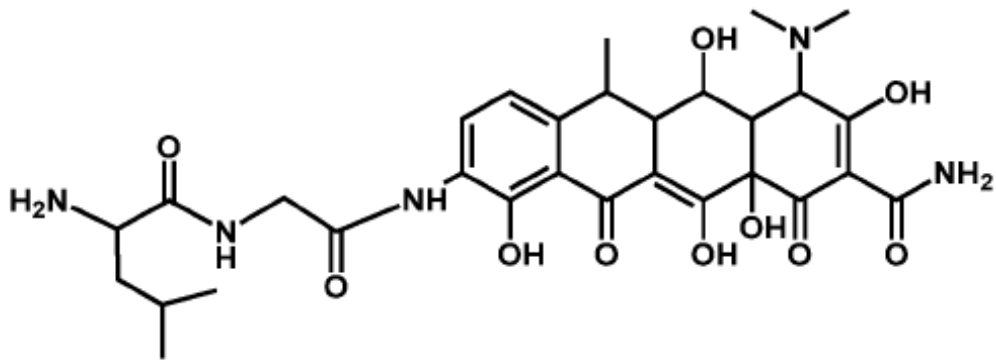


FIG. 2G

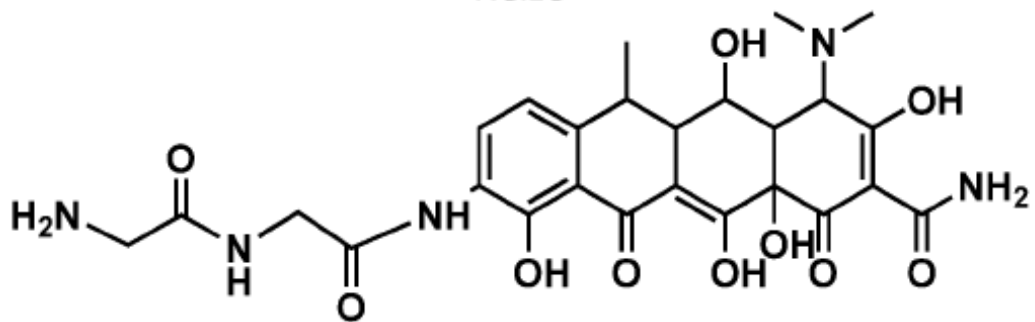


FIG. 2H

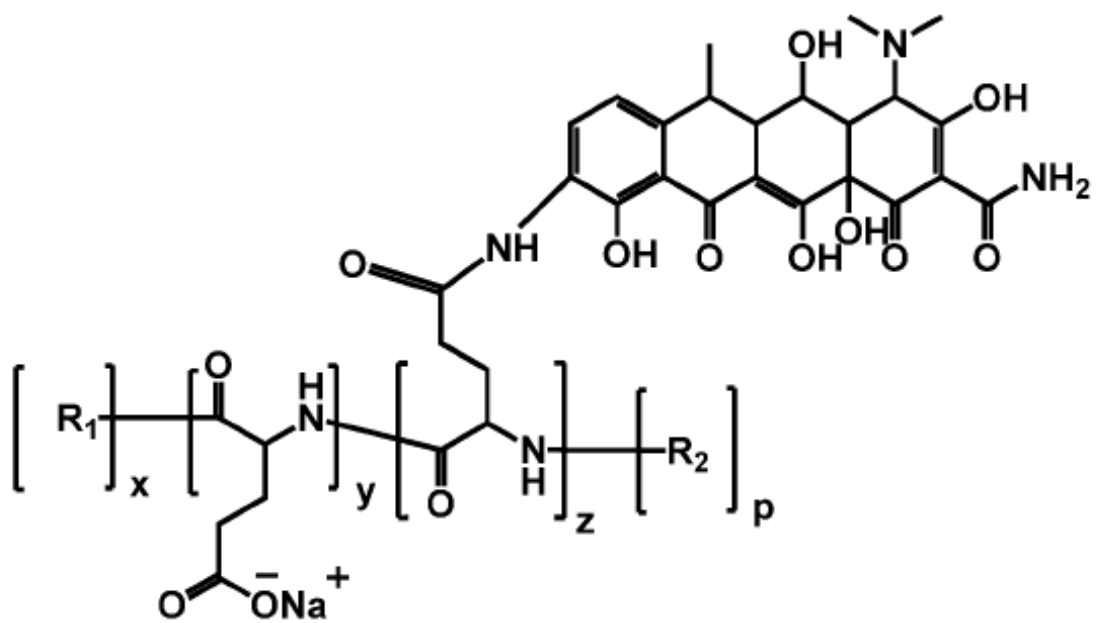


FIG.2I

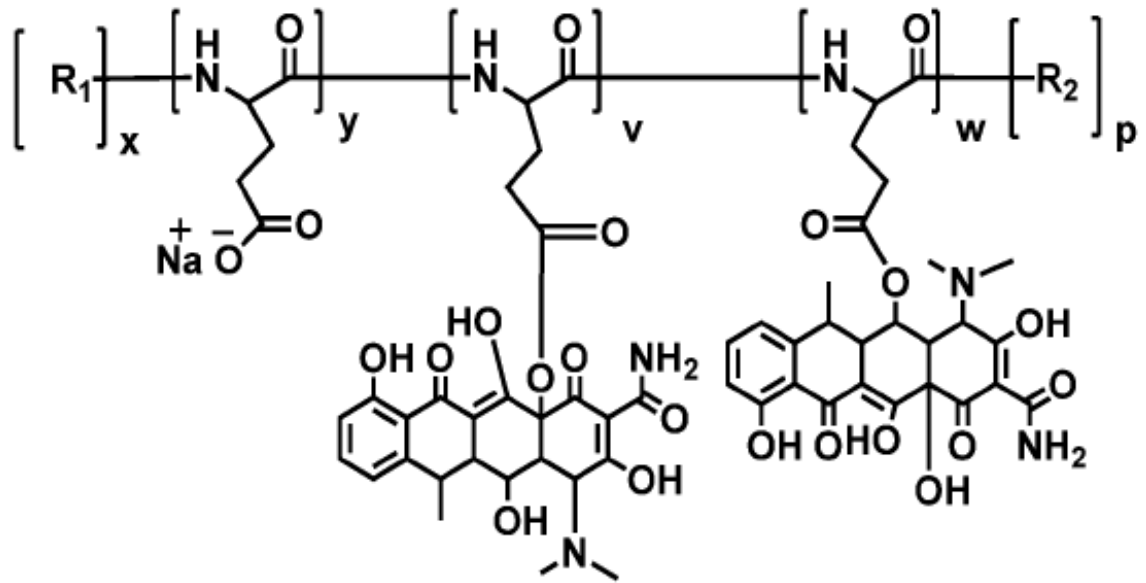


FIG.2J

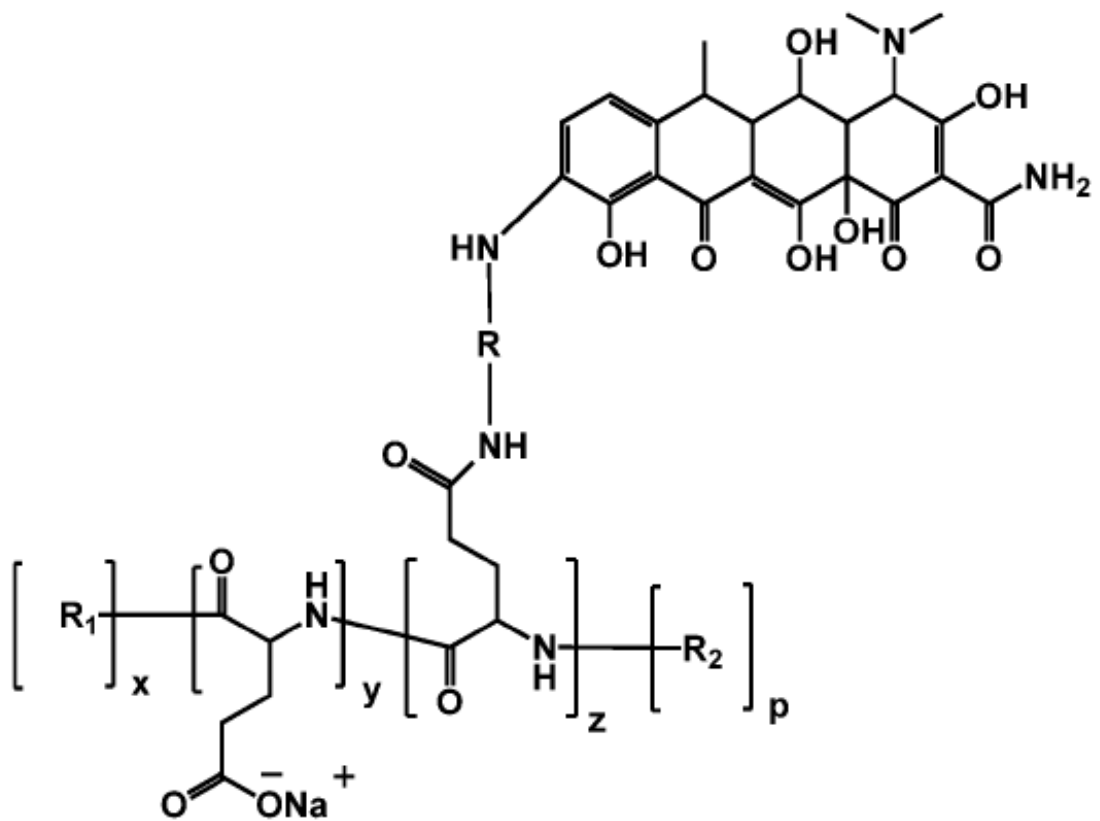


FIG. 2K

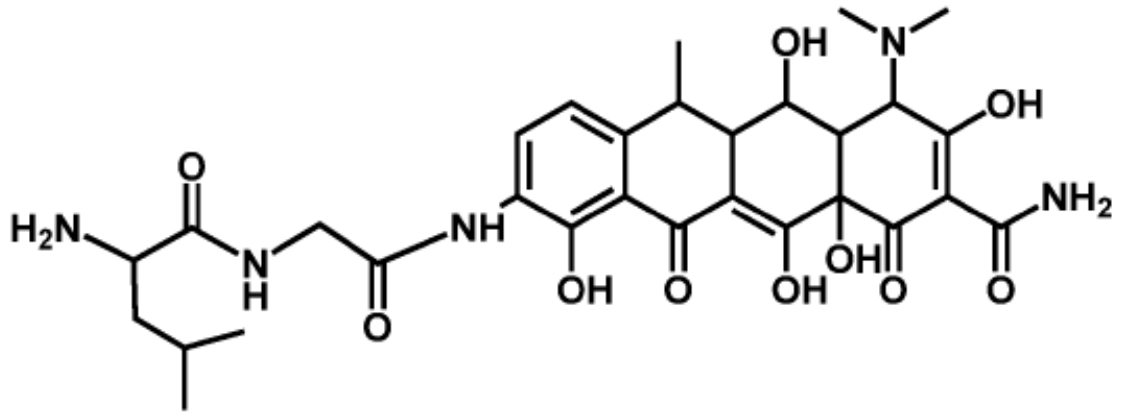


FIG. 2L

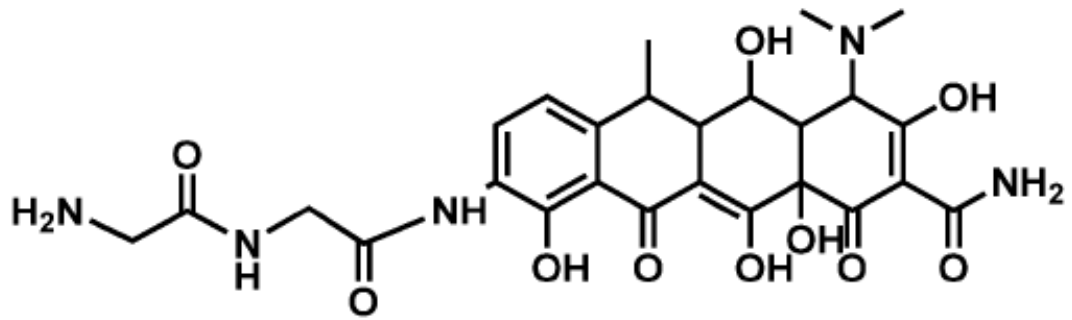


FIG.2M

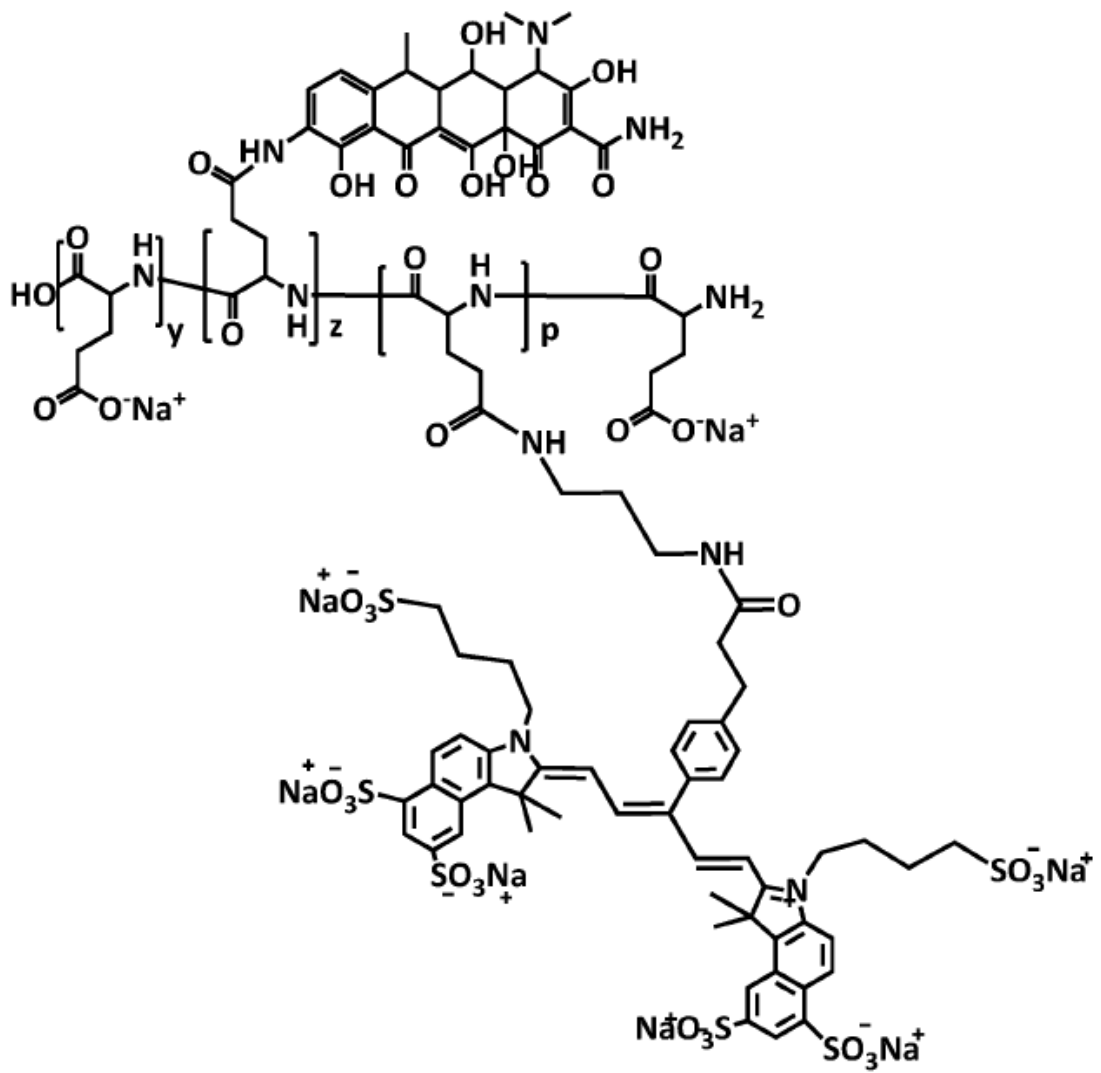


FIG.5

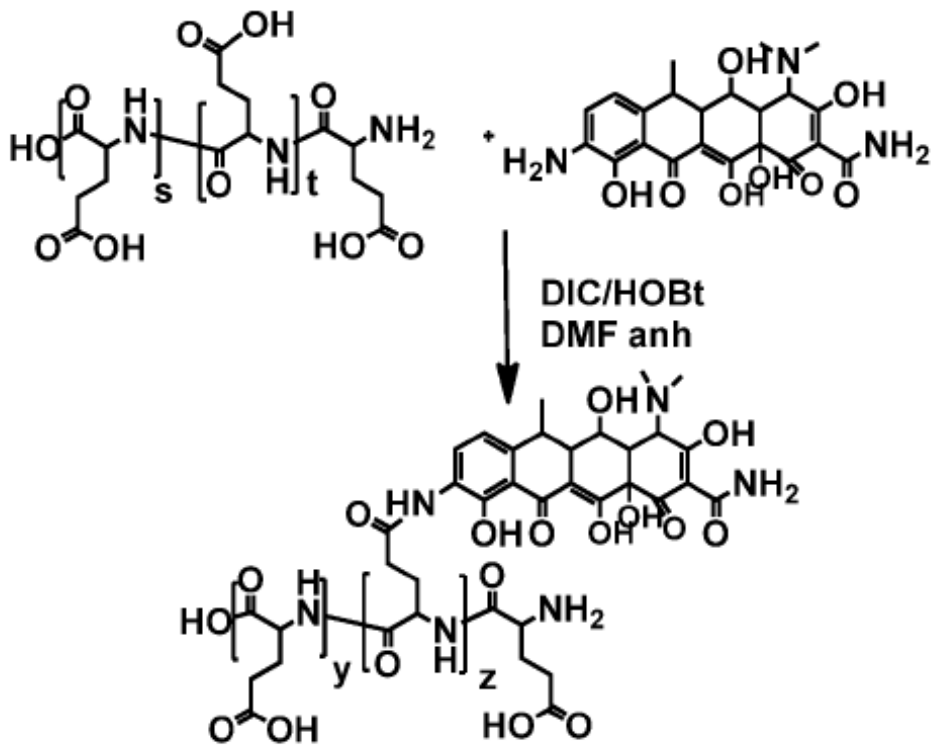


FIG.6

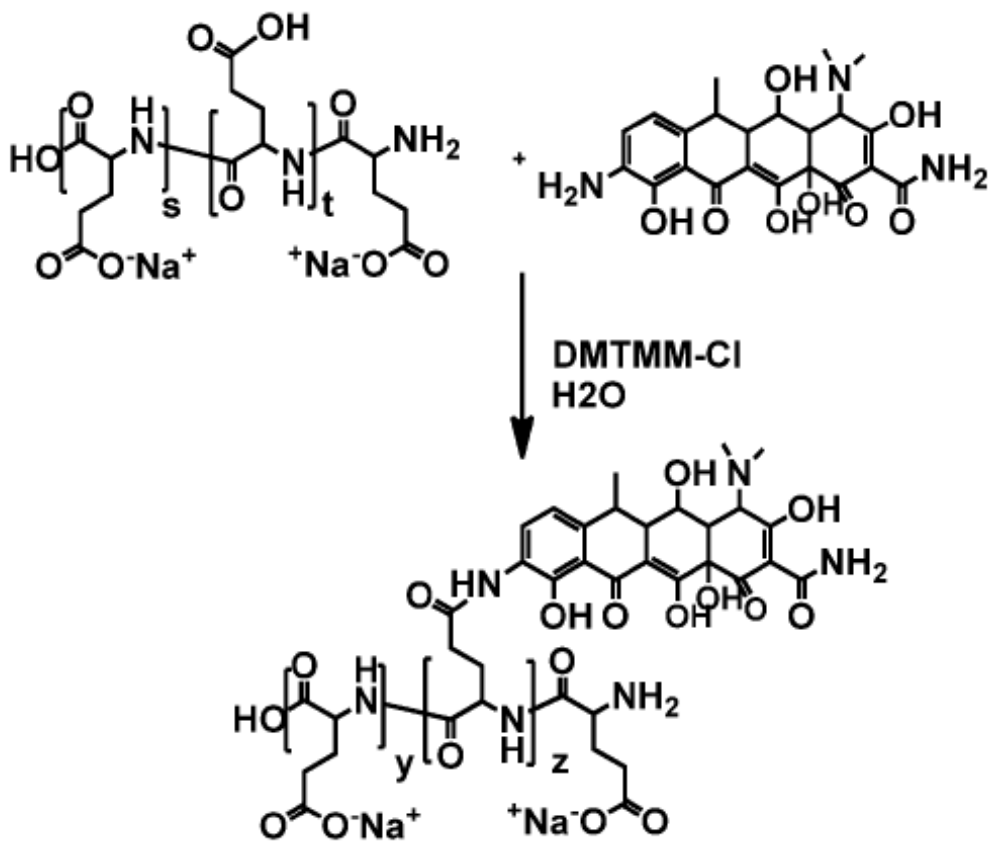


FIG.7

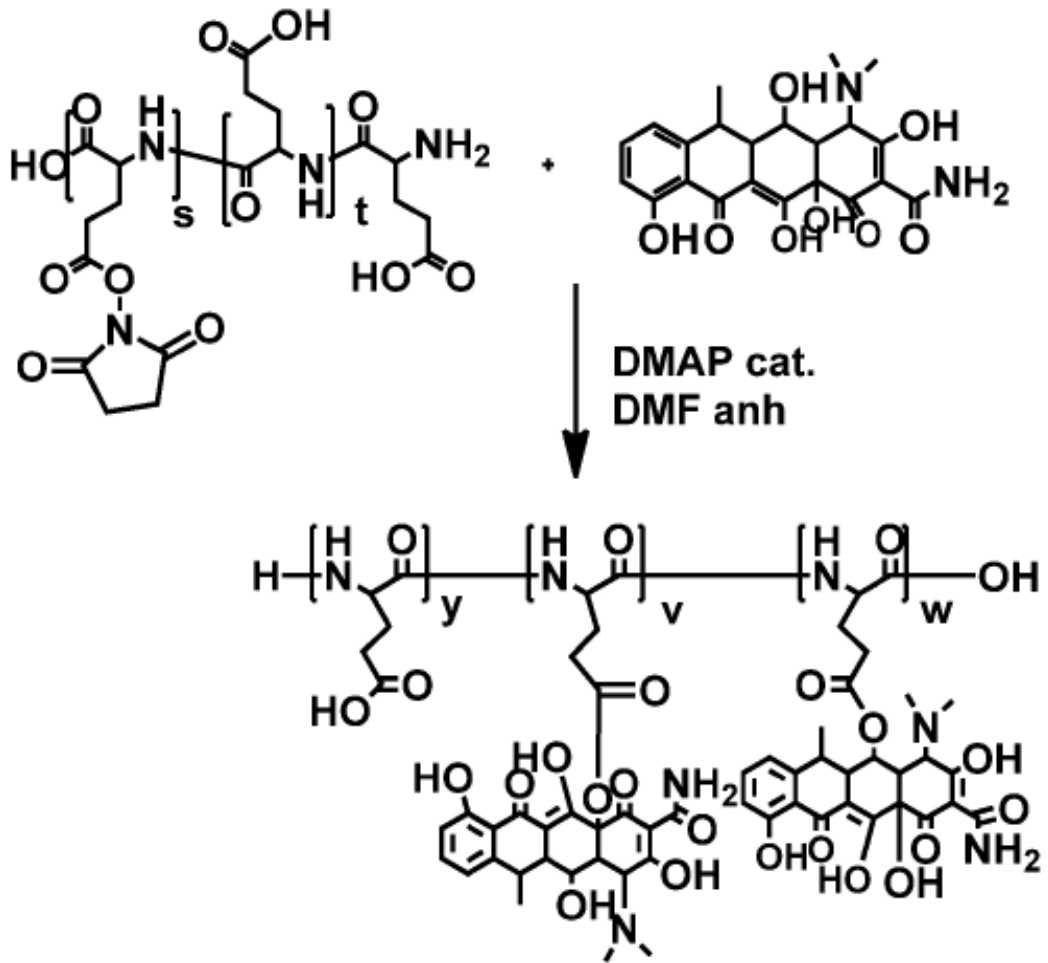


FIG.8

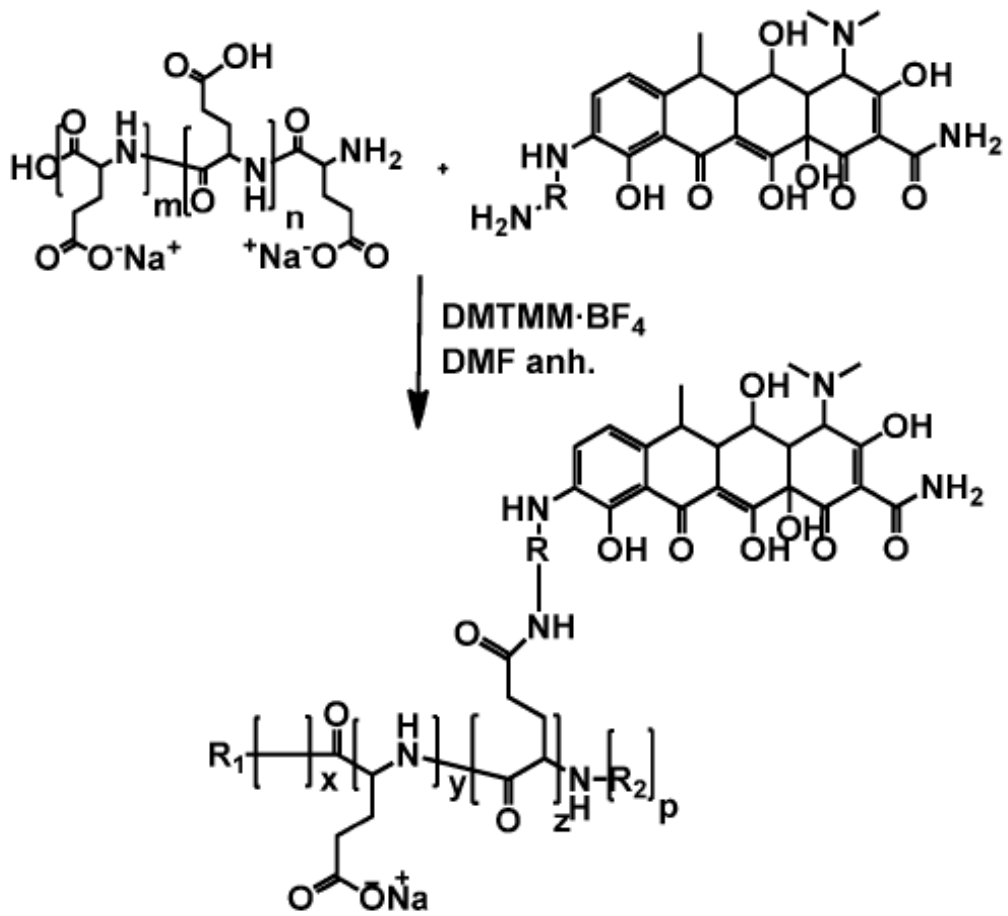


FIG.9

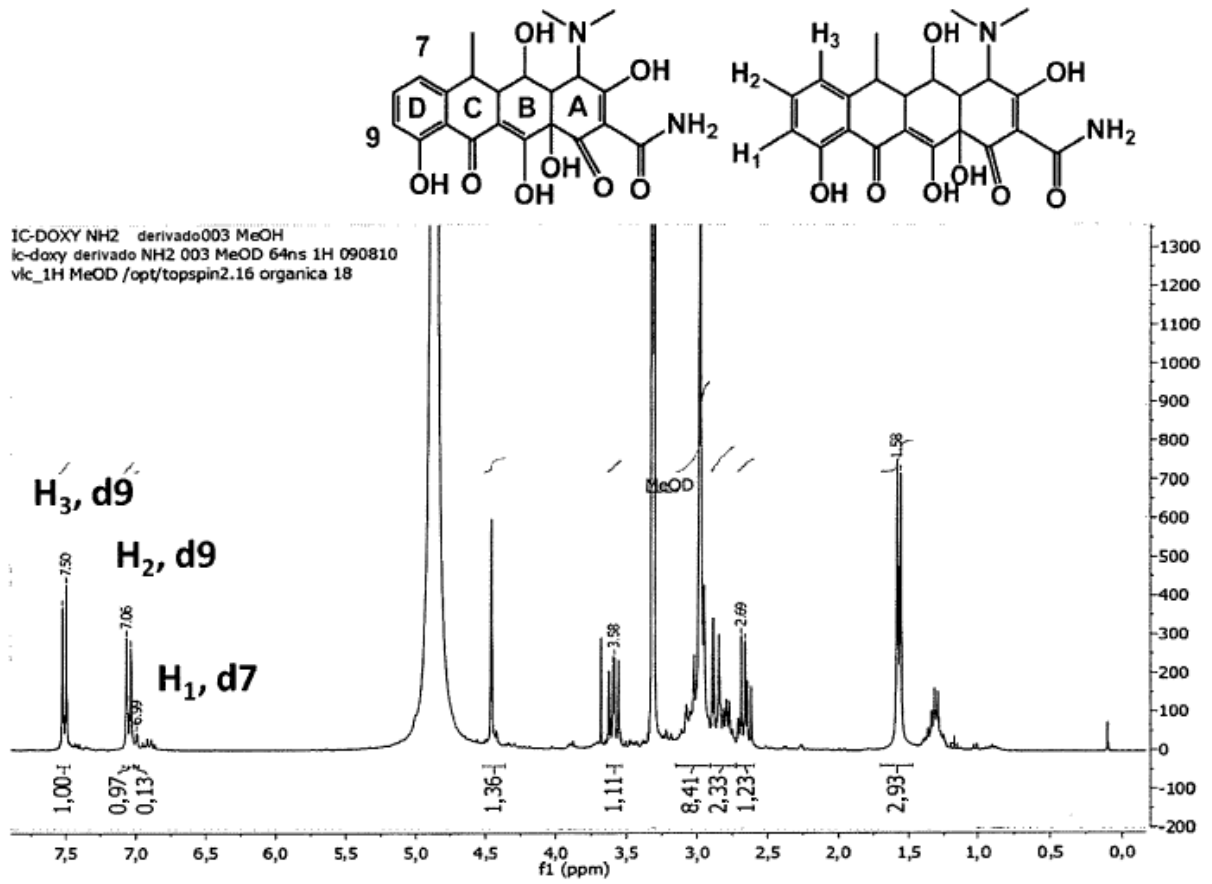


FIG. 10

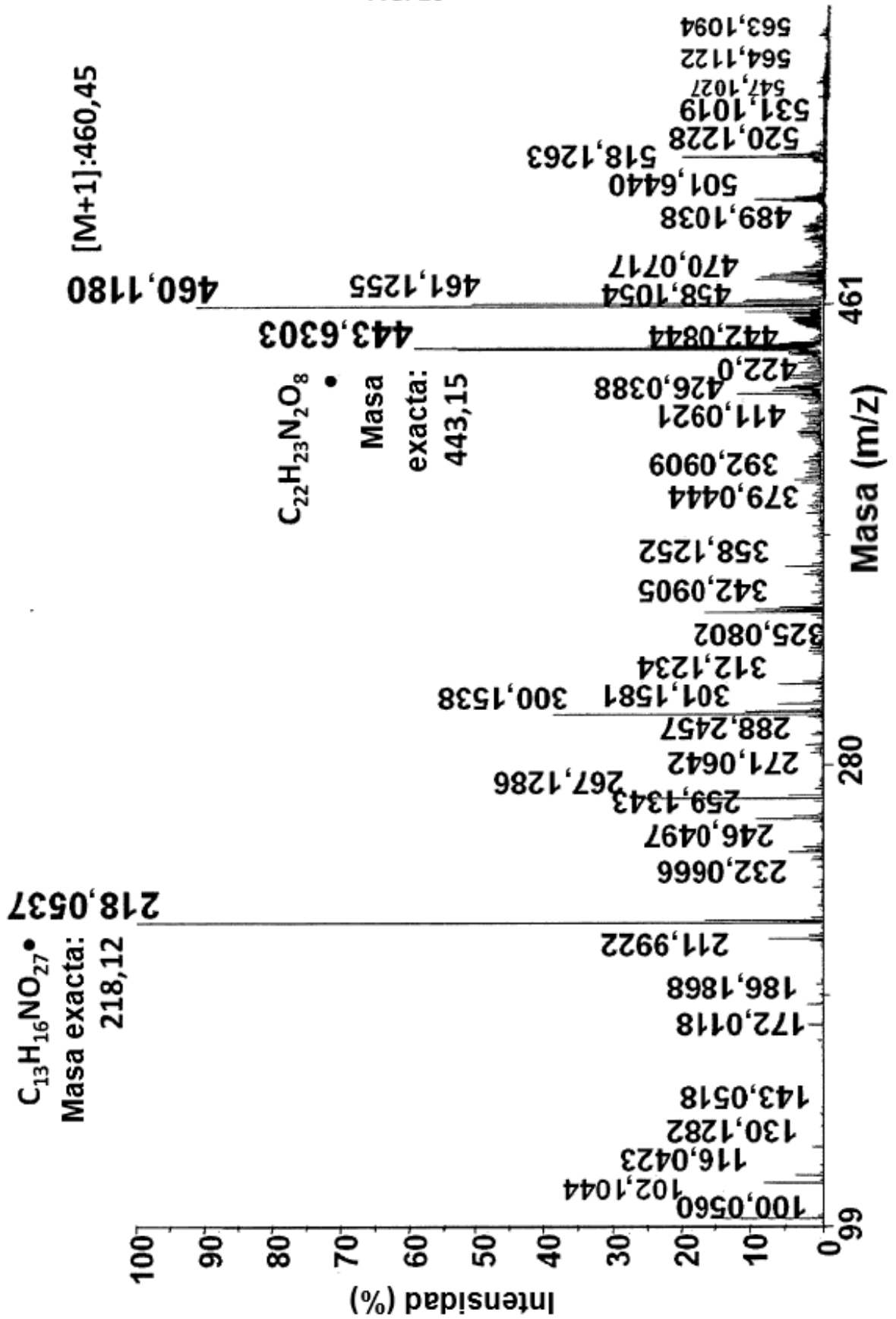


FIG. 11.

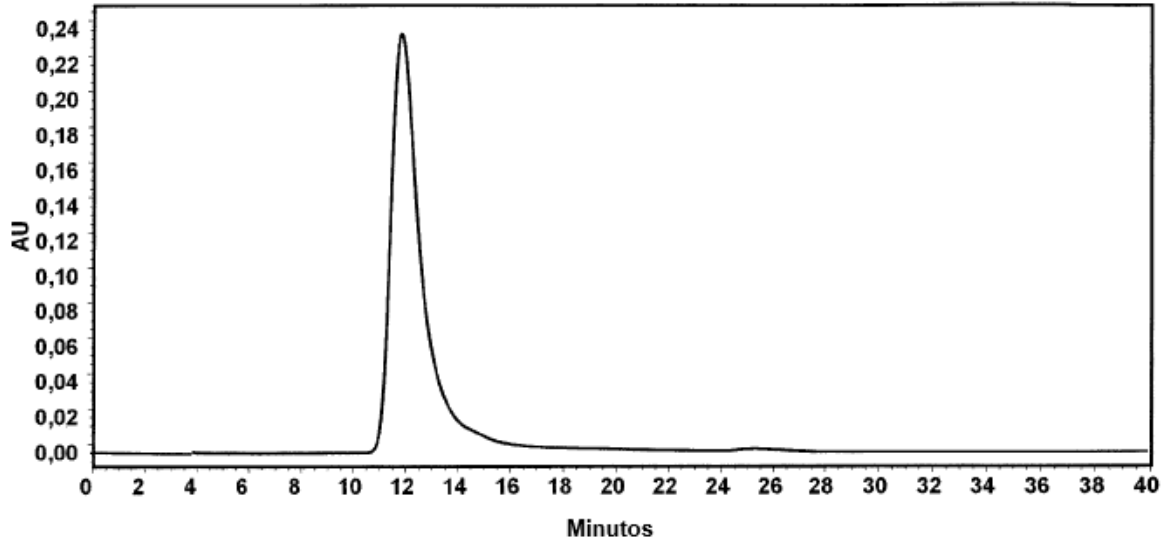
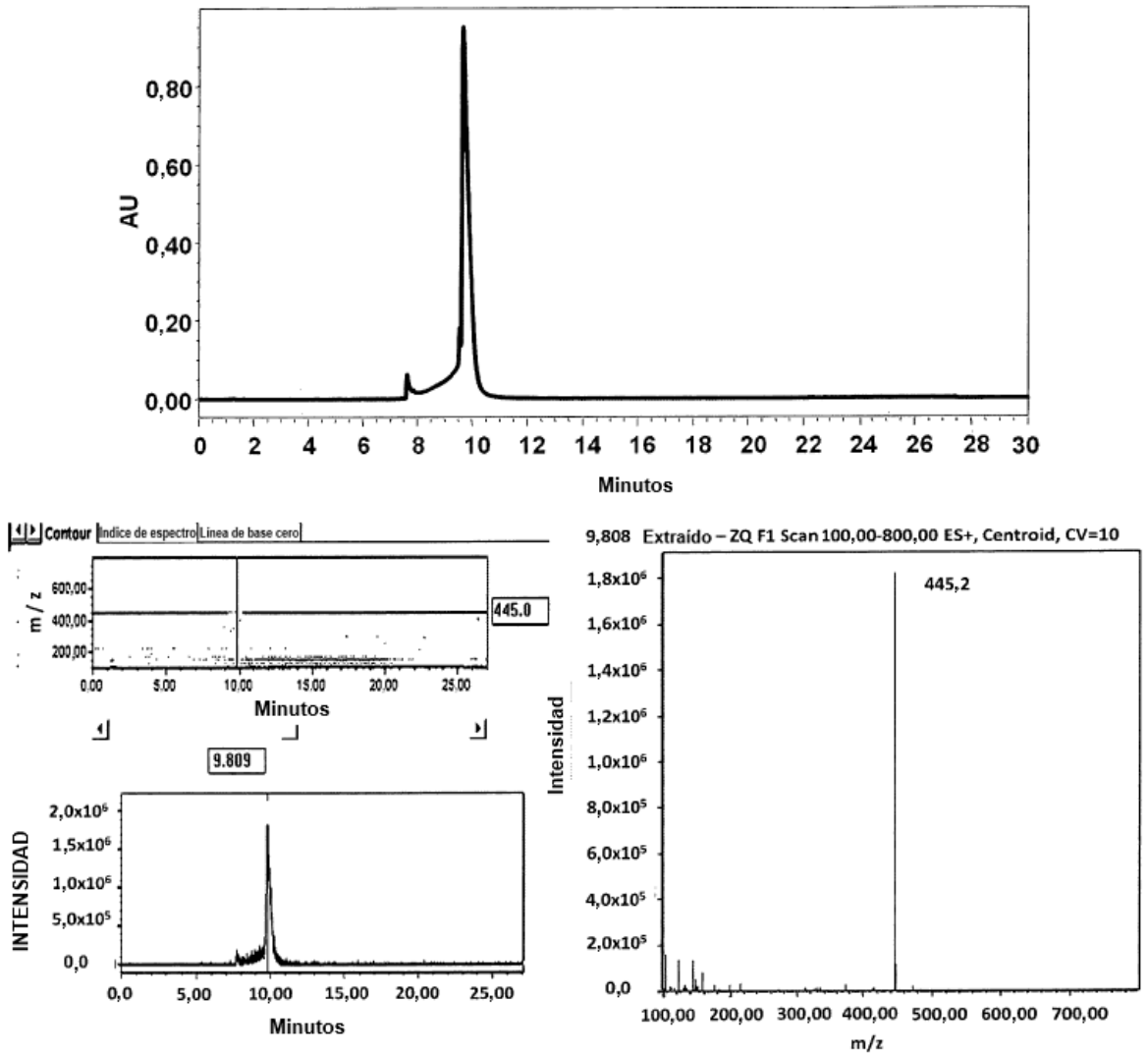
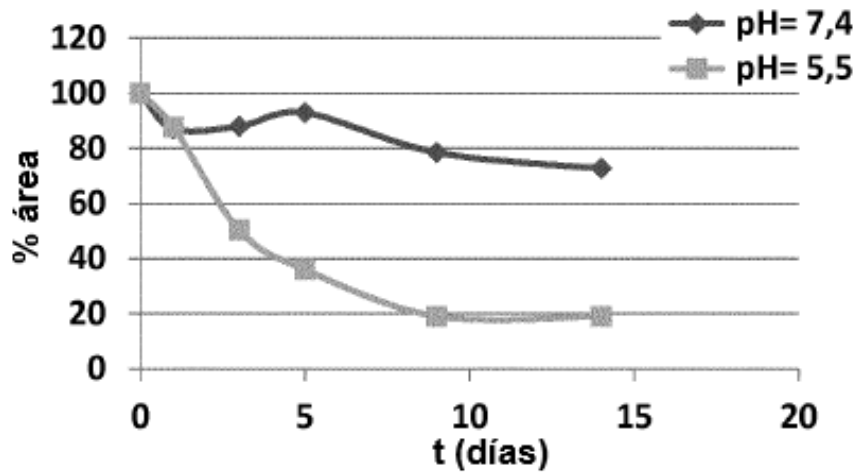
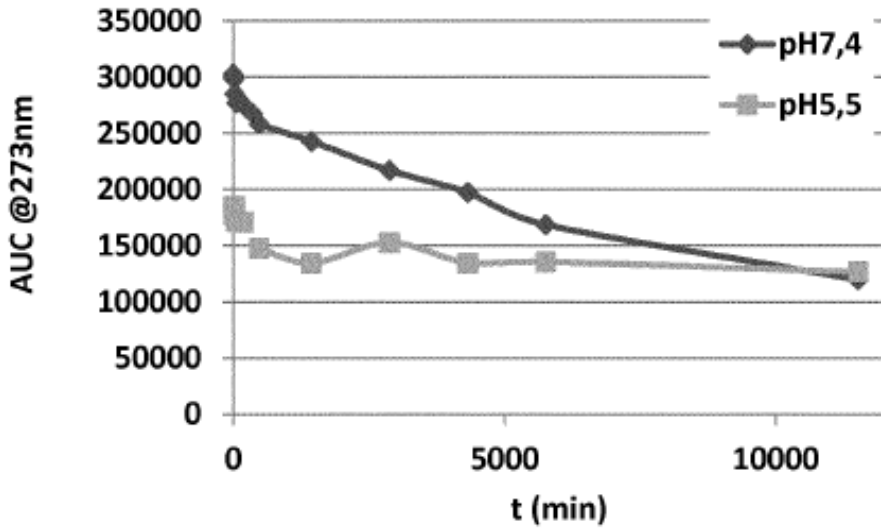


FIG. 12





PGA-CO-NH-Doxy



PGA-COO-Doxy

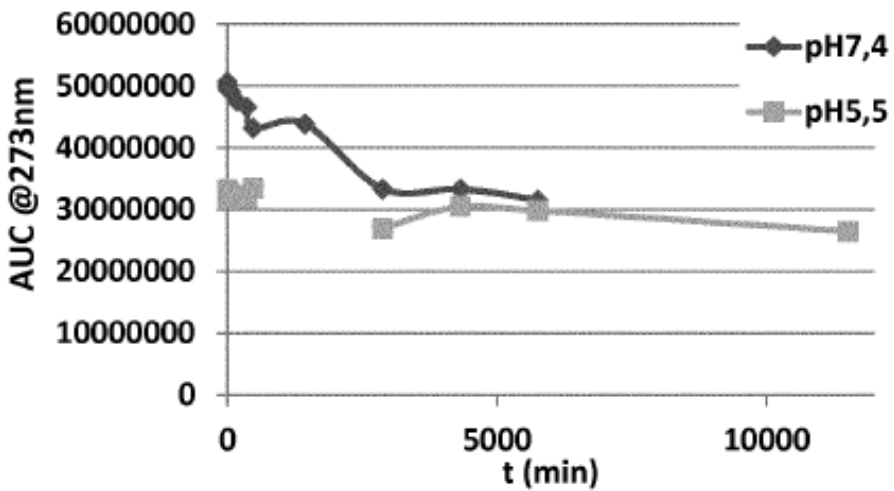
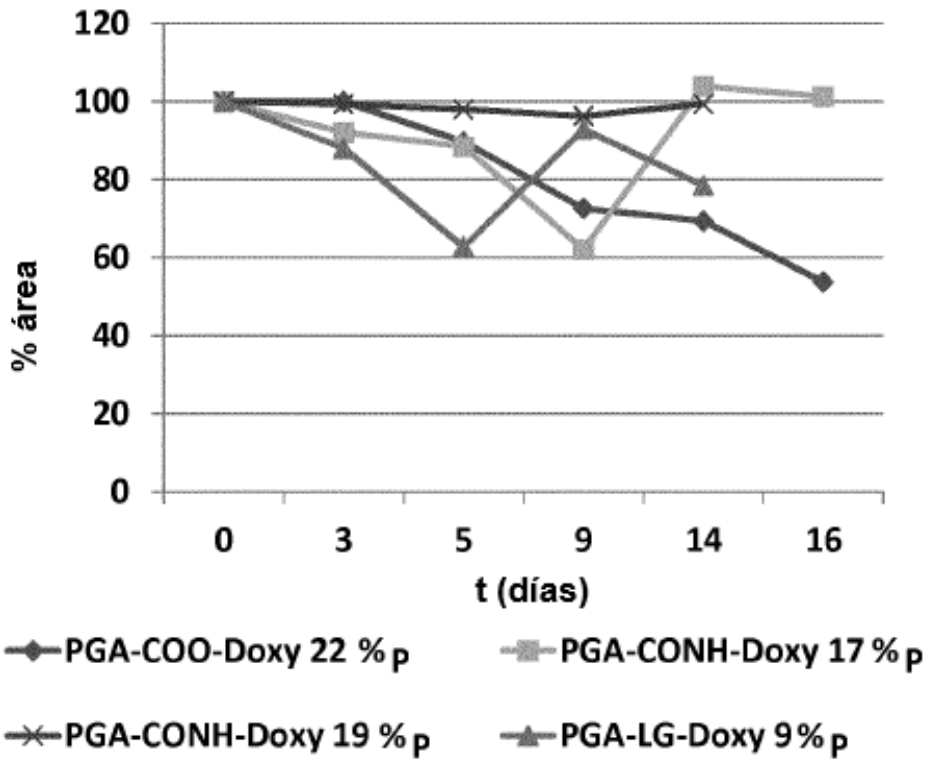


FIG. 14

(A)



(B)

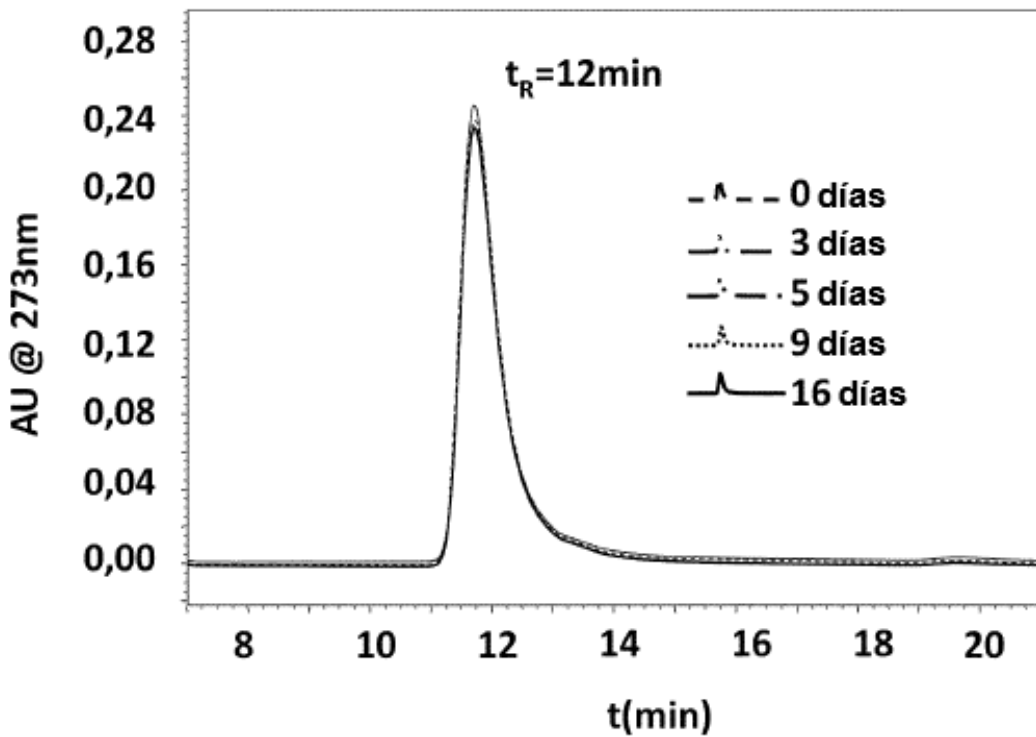
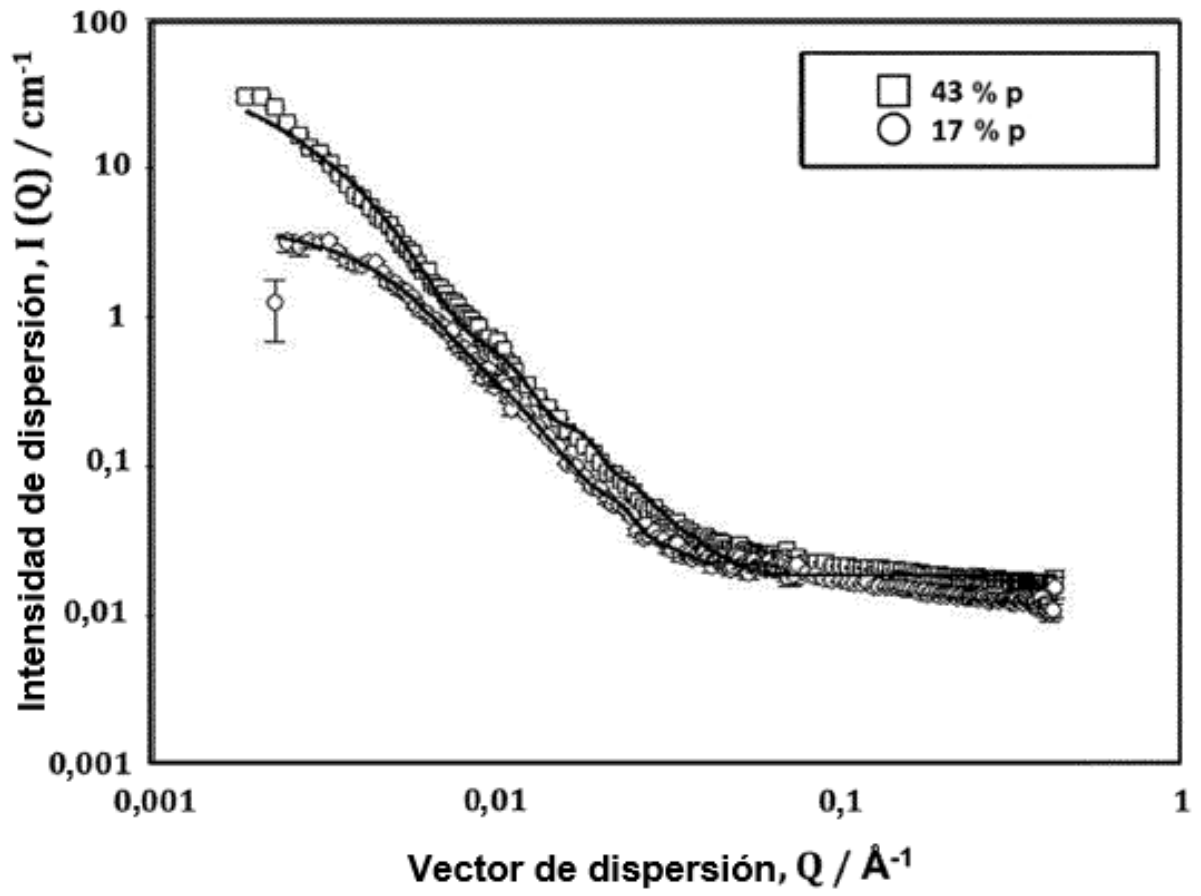


FIG. 15
(A)

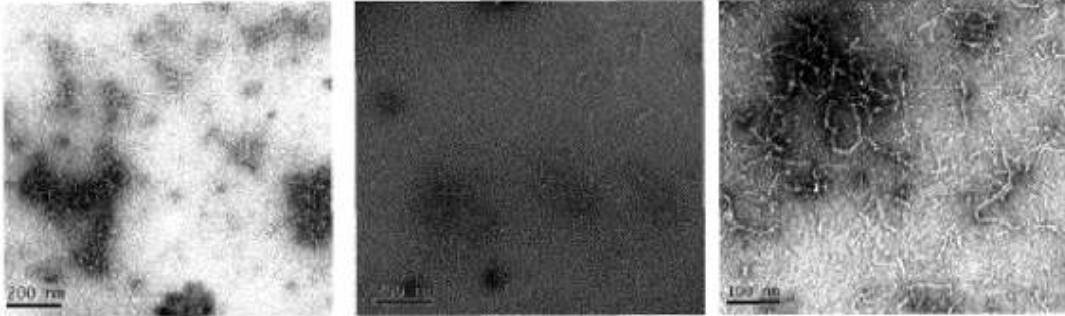


(B)

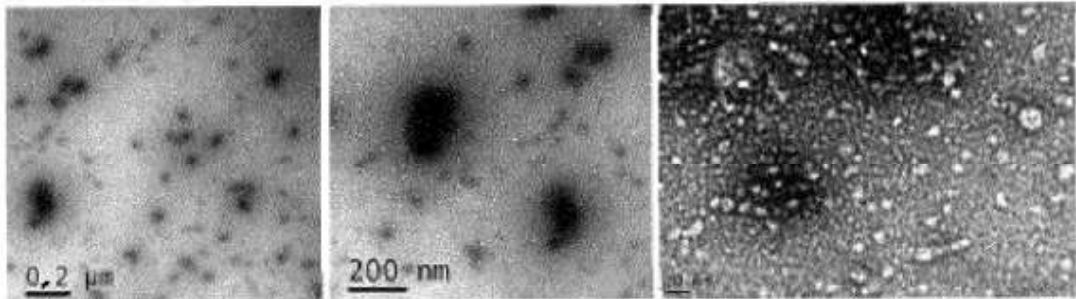
	% p	r/L
PGA-CONH-Doxy	17	40/400
		32/8,5
PGA-CONH-Doxy	43	36/95
		23/13,5

FIG. 16

Control t=0

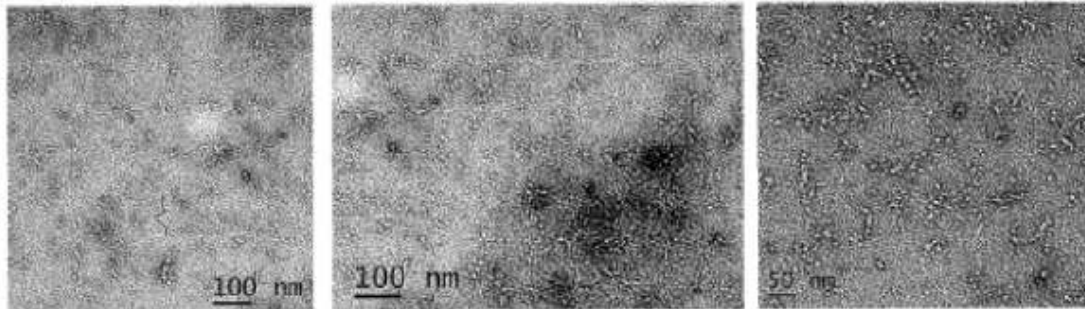


PGA-CONH-Doxy 15 % p



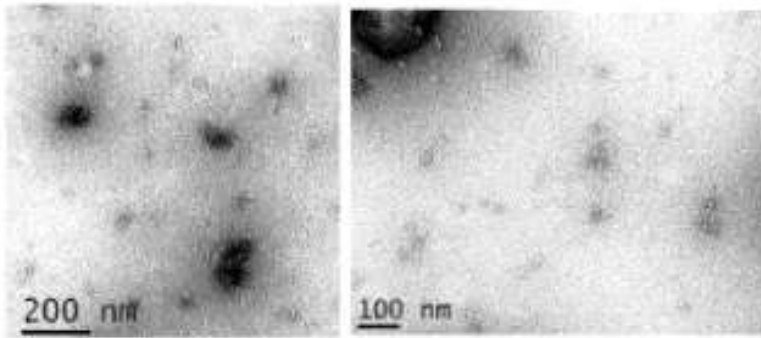
t=6d

PGA-CONH-Doxy 30 % p



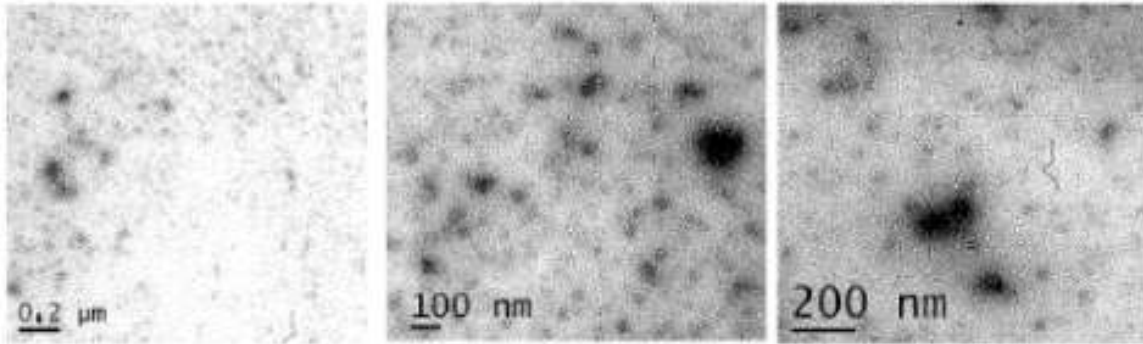
t=6d

PGA-CONH-Doxy 14 % p



t=6d

Doxiciclina



t=10d

FIG. 17

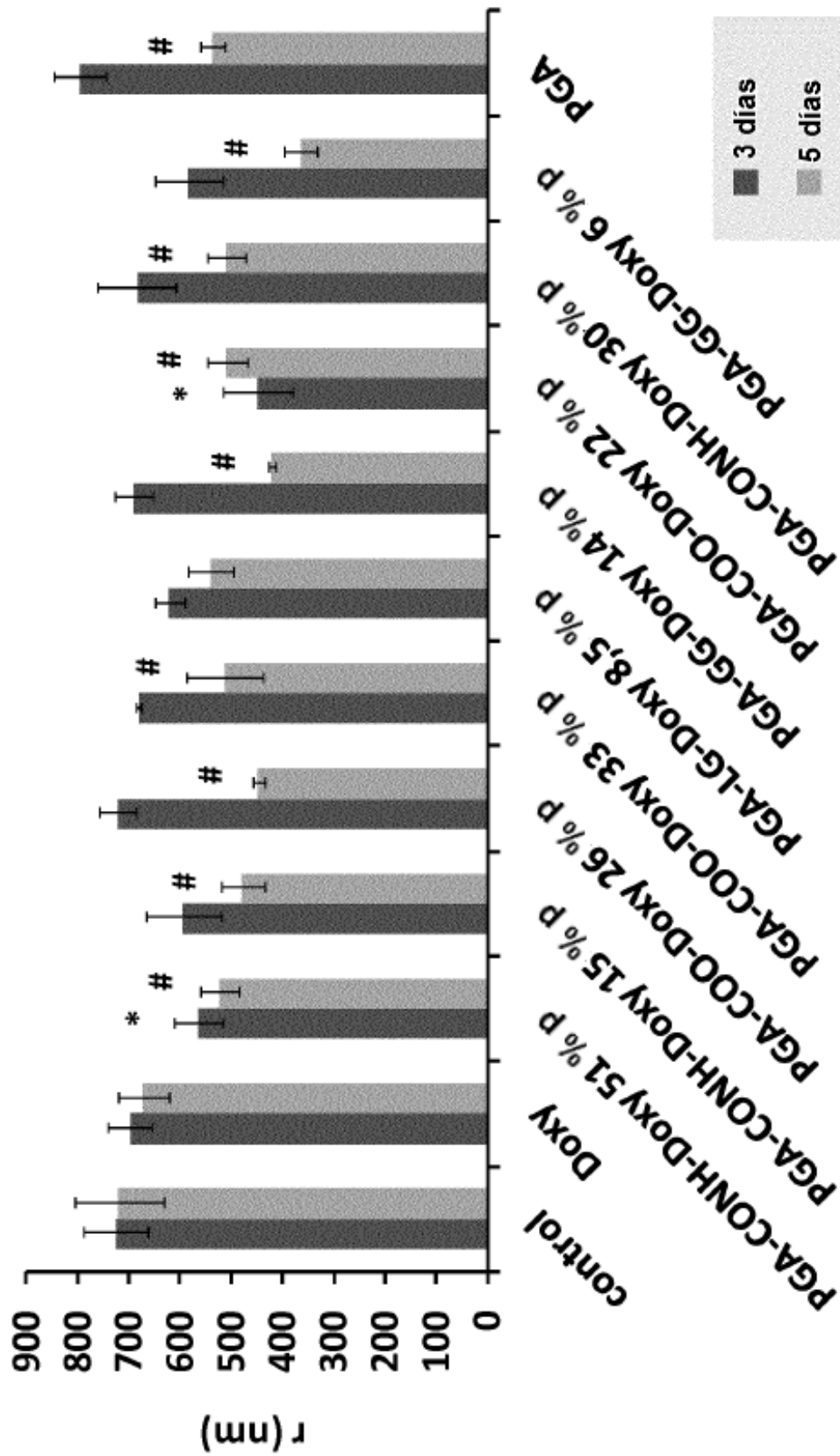


FIG. 18

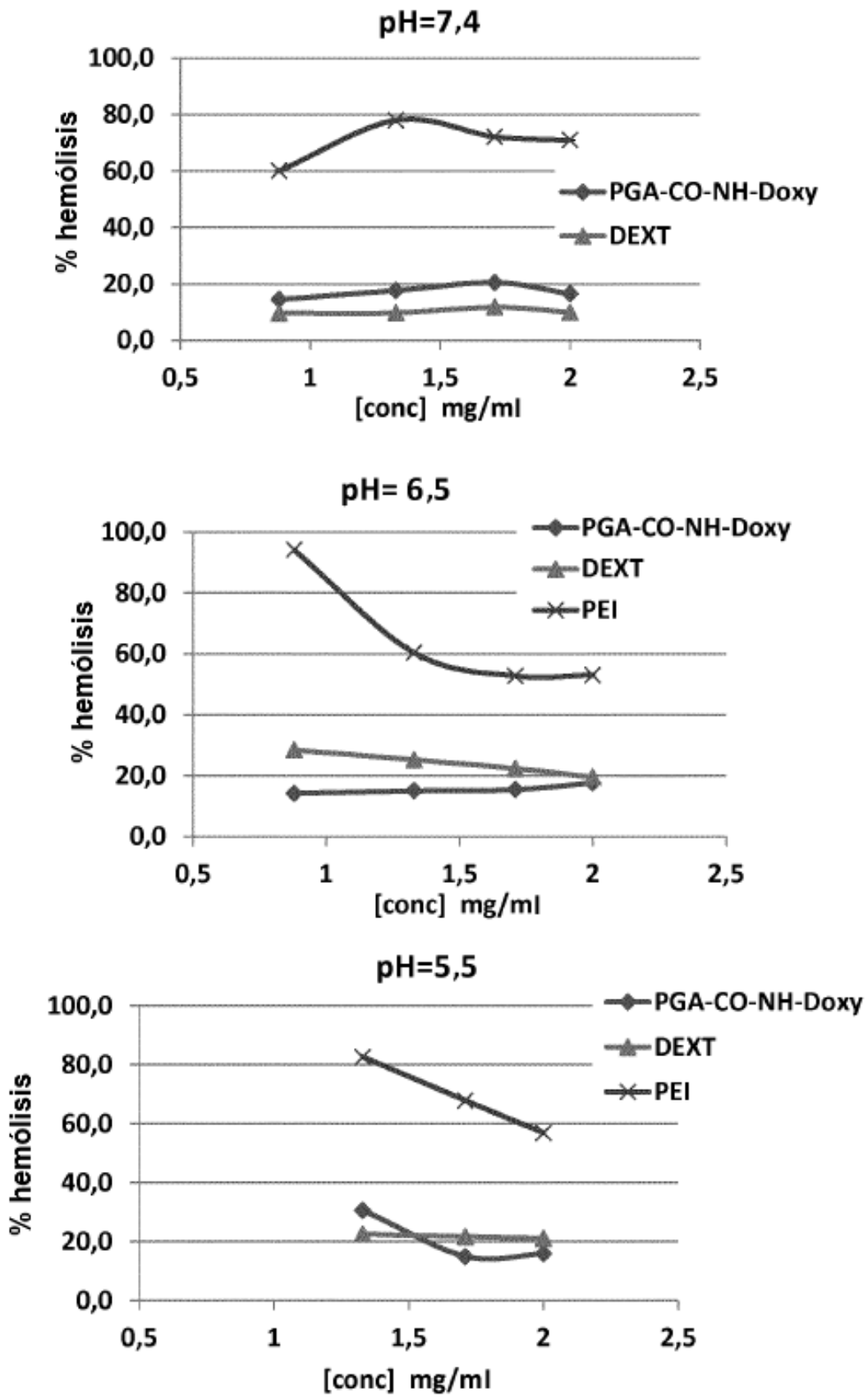


FIG. 19

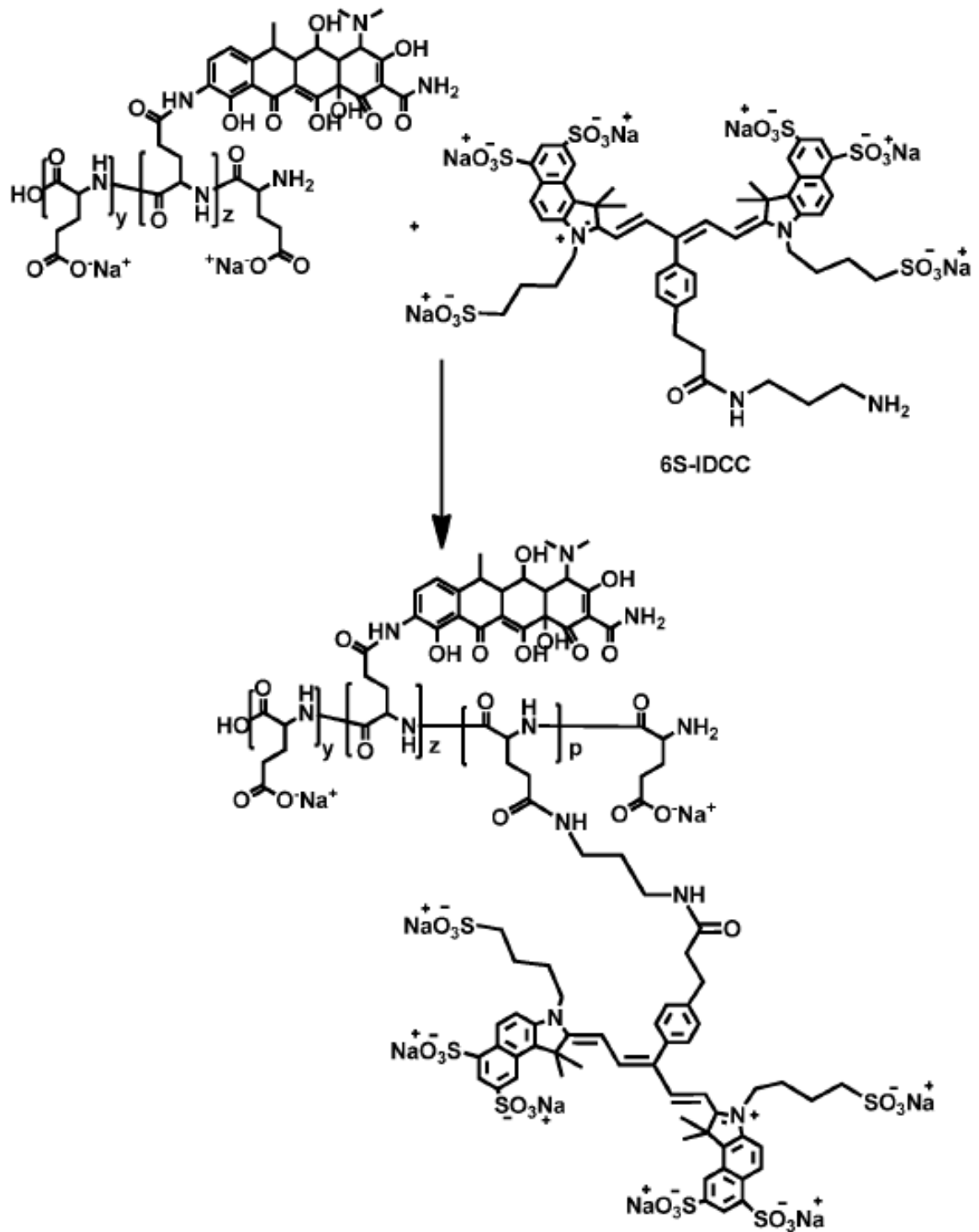


FIG. 20

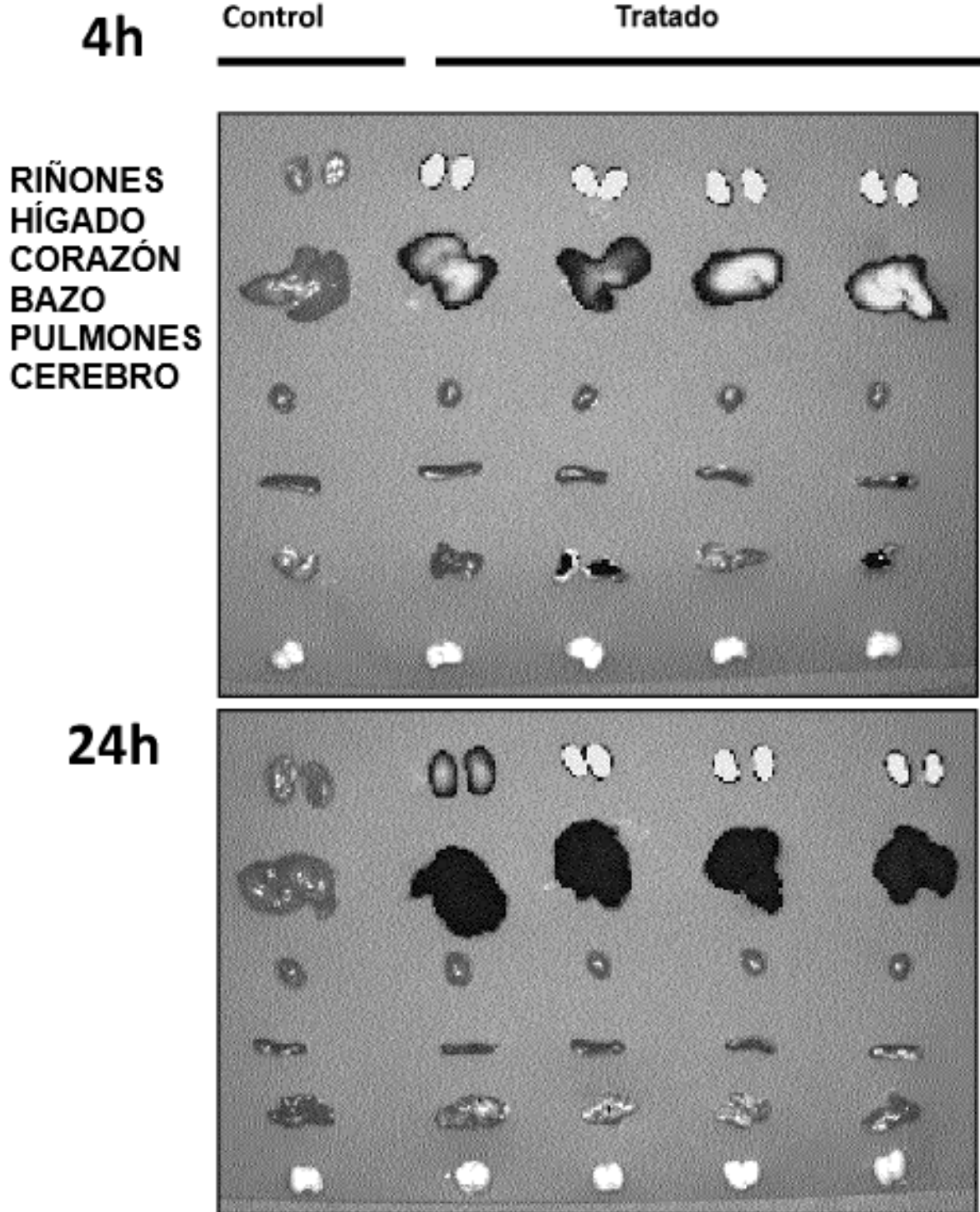


FIG. 21

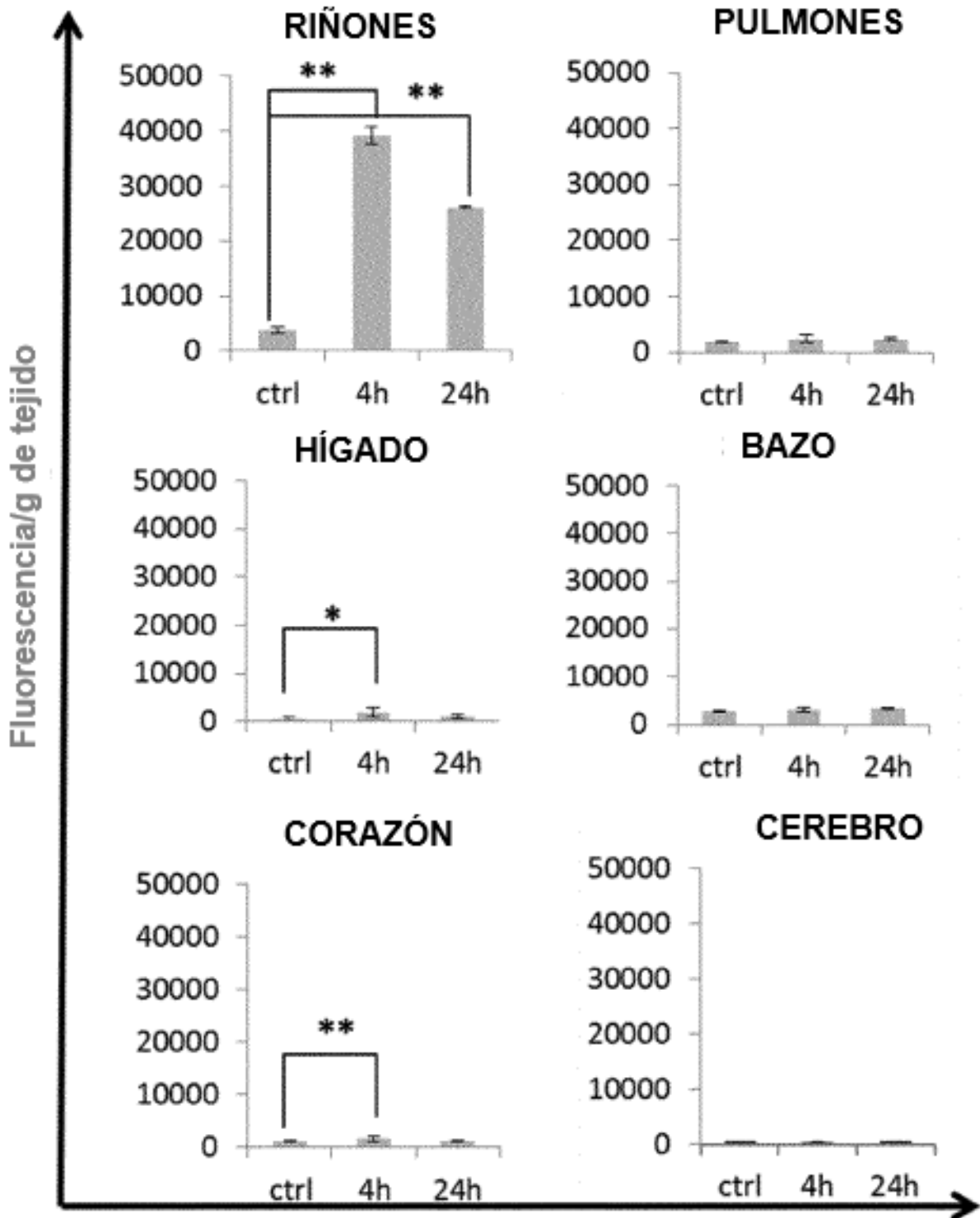


FIG. 22

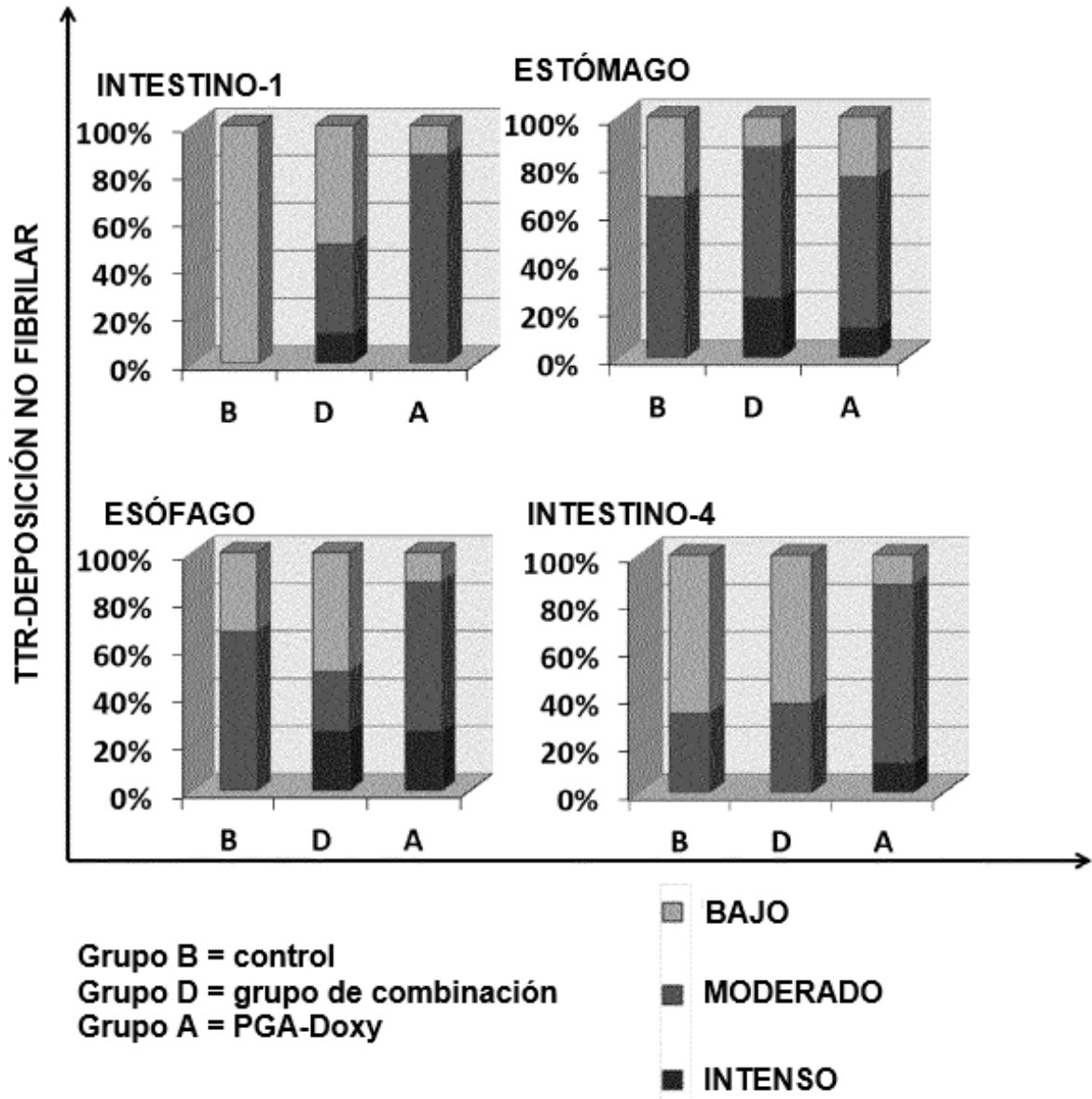


FIG. 23

