

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 744**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00	(2006.01) C07H 21/02	(2006.01)
A61K 49/12	(2006.01) C07D 487/22	(2006.01)
A61K 47/59	(2007.01) A61P 35/00	(2006.01)
C08G 83/00	(2006.01) A61P 37/02	(2006.01)
A61K 41/00	(2006.01)	
A61K 49/08	(2006.01)	
A61K 51/06	(2006.01)	
C07D 403/10	(2006.01)	
C07D 403/14	(2006.01)	
C07D 405/12	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2011 PCT/EP2011/000425**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11095311**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2011 E 11701951 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2531221**

54 Título: **Macromoléculas multivalentes polianiónicas para el direccionamiento intracelular de proliferación y síntesis de proteínas**

30 Prioridad:

02.03.2010 EP 10002121
18.02.2010 EP 10001655
03.02.2010 EP 10001104

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:

NANOPET PHARMA GMBH (100.0%)
Robert-Koch-Platz 4
10115 Berlin, DE

72 Inventor/es:

LICHA, KAI;
SCHIRNER, MICHAEL;
WELKER, PIA;
HAAG, RAINER;
WEINHART, MARIE y
PAULUS, FLORIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 730 744 T3

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

DESCRIPCIÓN

Macromoléculas multivalentes polianiónicas para el direccionamiento intracelular de proliferación y síntesis de proteínas

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere generalmente a compuestos y/o formulaciones para el direccionamiento de moléculas intracelulares implicadas en la proliferación y síntesis de proteínas de células activadas usando macromoléculas multivalentes polianiónicas. En un aspecto particular, grupos sulfato múltiples unidos a poliol se dirigen de forma específica al citoplasma y núcleo de células proliferativas y activadas. La descripción comprende además nuevos compuestos macromoleculares polianiónicos y formulaciones. La invención se refiere a conjugados
10 como se define en las reivindicaciones, y a dichos conjugados para su uso en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada de cáncer, enfermedades autoinmunitarias y fibrosis.

Antecedentes de la invención y descripción de la técnica relacionada

Durante las últimas décadas se ha progresado mucho en mejorar la eficacia de fármacos de diagnóstico y terapéuticos. Las mejoras más importantes se han conseguido en enfermedades agudas. Actualmente, enfermedades agudas, tales
15 como enfermedades infecciosas, trombosis aguda o alteraciones agudas de la tensión arterial pueden tratarse con una alta eficacia. La mayoría de los tratamientos farmacológicos para enfermedades agudas no afectan gravemente los tejidos y órganos sanos. Debido al corto período de tratamiento farmacológico, los tejidos y órganos sanos pueden recuperarse suficientemente de efectos no deseados de los fármacos. A diferencia del tratamiento farmacológico de corta duración de enfermedades agudas que normalmente va acompañado de un período corto de exposición al fármaco, el tratamiento de enfermedades crónicas está asociado imprescindiblemente con una exposición de larga
20 duración del cuerpo humano a los fármacos aplicados. La exposición de larga duración del fármaco, sin embargo, con frecuencia daña tejidos y órganos sanos.

Durante las últimas décadas se siguieron dos estrategias diferentes para evitar efectos farmacológicos no deseados graves en tejidos y órganos sanos. Por un lado, la investigación en fármacos se centró en nuevas dianas farmacológicas que prometían una expresión específica para la enfermedad del mecanismo diana. Con respecto al descubrimiento de mecanismos de transducción de señales en células proliferativas y activadas, se han identificado numerosas nuevas dianas. Sin embargo, con pocas excepciones el ataque terapéutico de la mayoría de las dianas farmacológicas recientemente descubiertas no mejoro el resultado terapéutico. Por otro lado, se ha dedicado mucho
25 esfuerzo en mejorar la biodisponibilidad de fármacos terapéuticos clínicamente establecidos. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad, la investigación de fármacos se centró en la modificación química o formulaciones farmacéuticas de las moléculas efectoras terapéuticas o de diagnóstico.

En las últimas tres décadas se ha establecido bien el uso de conjugados efectores dirigidos a dianas. En particular, moléculas que pueden inducir efectos de diagnóstico o terapéuticos están ligadas a una molécula vehículo con propiedades de direccionamiento. Debido a la alta afinidad de unión de inmunoglobulinas, los anticuerpos de proteínas o fragmentos de anticuerpos se usan frecuentemente como moléculas vehículo para el suministro dirigido a dianas.
35 Con respecto al tratamiento de enfermedades neoplásicas, los anticuerpos pueden portar toxinas o agentes quimioterápicos para el tumor. Debido a la fuerte unión de los conjugados anticuerpo-efector a determinadas moléculas diana de tumores, se consigue una concentración significativamente mayor del efector en el entorno del tumor. Mientras tanto, los conjugados anticuerpo-efector han mostrado ser eficaces en una serie de tumores experimentales y clínicos. Otra ventaja de la administración dirigida a diana de moléculas efectoras es la reducción de efectos no deseados de la molécula efectora. En detalle, la mayoría de las moléculas de fármaco que no están ligadas al vehículo con propiedades de direccionamiento no alcanza el sitio de enfermedad y solo se aplican en el cuerpo humano con el fin de conseguir la necesaria concentración de fármaco en sangre. Por tanto, la mayor parte del fármaco es eliminada en la circulación sanguínea sin alcanzar el sitio de la enfermedad. Por ejemplo, tumores sólidos malignos que pueden
40 considerarse como una enfermedad crónica tienen un tamaño de 1 a 10 gramos en el momento del diagnóstico y tratamiento, por tanto, representan 0,01 a 0,001% del cuerpo humano. Esta relación ilustra que el tratamiento farmacológico puede optimizarse significativamente dirigiendo el fármaco aplicado a la enfermedad y, por tanto, permite una reducción de la dosis aplicada.

Sin embargo, a pesar de notable progreso en el tratamiento de enfermedades agudas, la mayoría de tratamientos no consiguen la curación para la enfermedad crónica. A diferencia de las enfermedades agudas, la mayoría de enfermedades crónicas pueden tratarse únicamente si pueden dirigirse de forma selectiva a una diana la transducción de señales relacionada con la enfermedad y la transcripción génica. A fin de conseguir este objetivo, los fármacos terapéuticos tienen que permear suficientemente la membrana celular y acumularse en el interior de la célula diana de la enfermedad. Debido a la expresión ubicua de las moléculas diana clave de la transcripción génica y síntesis de proteínas, los futuros fármacos terapéuticos tienen que demostrar absorción selectiva en el sitio de la enfermedad. La última característica de los futuros fármacos terapéuticos es de importancia crucial debido a que la unión a, y la inhibición de reguladores clave de la transcripción génica y síntesis de proteínas fuera del proceso de enfermedad puede dañar el cuerpo humano.
50
55

Resultados de investigaciones científicas proporcionaron evidencias de una función de más de 500 factores en la transcripción génica y síntesis de proteínas. Sin embargo, entre los diferentes factores, NF-kappaB y AP-1 son vitales y ya se han establecido como dianas terapéuticas (Letoha *et al.*, Mol. Pharmacol. 69: 2027, 2006; Sliva *et al.*, Curr Cancer Drug Targets. 4: 327, 2004). Estos dos reguladores de la transcripción génica desempeñan una función clave en la activación y proliferación de células y son la señal cadena abajo de diferentes cascadas de señalización. Tanto NF-kappaB como AP-1 están localizadas en el citoplasma y núcleo de las células. Con respecto al direccionamiento terapéutico de NF-kappaB y AP-1, los fármacos tienen que cumplir dos requisitos previos importantes. Primero, un fármaco terapéutico tiene que permear la membrana celular en cantidad suficiente y acumularse en el citoplasma. Segundo, el fármaco terapéutico tiene que discriminar entre células en órganos o tejidos sanos y células en el proceso de enfermedad. El último aspecto es de gran significación debido a que NF-kappaB y AP-1 son expresados en todas las células del cuerpo humano y una inhibición de estas dos dianas de enfermedad puede dañar significativamente funciones corporales sensibles.

NF-kappaB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas) es un complejo proteico que controla la transcripción de ADN. NF-kappaB se encuentra en casi todos los tipos de células animales y está implicado en respuestas celulares a estímulos tales como el estrés, citocinas, radicales libres, radiación ultravioleta, LDL oxidado y antígenos bacterianos o virales. NF-kappaB desempeña una función clave en la regulación de la respuesta inmunológica a la infección. Por el contrario, la regulación incorrecta de NF-kappaB se ha asociado con cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, choque séptico, infección vírica, y desarrollo inmunitario inapropiado. NF-kappaB también se ha implicado en procesos de plasticidad sináptica y de la memoria (Baud *et al.*, Nat Drug Discov. 8:33, 2009).

NF-kappaB es usado ampliamente por células como un regulador génico que controla la proliferación celular y la supervivencia celular. Como tal, muchos tipos diferentes de tumores humanos tienen valores de NF-kappaB mal regulados: es decir, NF-kappaB es constitutivamente activo. NF-kappaB activo activa la expresión de genes que mantienen la proliferación celular y protegen la célula de condiciones que, de otro modo, causarían la muerte de la misma por apoptosis. Defectos en NF-kappaB dan lugar a una mayor susceptibilidad a la apoptosis conduciendo a una mayor muerte celular. Debido a que NF-kappaB controla muchos genes implicados en la inflamación, no sorprende que NF-kappaB se encuentre que es crónicamente activo en muchas enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, septicemia, gastritis, asma, entre otras. Muchos productos naturales (incluyendo antioxidantes) que se han promovido por tener actividad anticancerígena y antiinflamatoria también han mostrado que inhiben NF-kappaB (Kaur *et al.*, Curr Cancer Drug Targets 7: 355, 2007).

La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor de transcripción que es una proteína heterodimérica compuesta de proteínas que pertenecen a las familias c-Fos, c-Jun, ATF y JDP. Esta regula la expresión génica en respuesta a una diversidad de estímulos incluyendo citocinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones bacterianas y víricas. AP-1 controla a su vez una serie de procesos celulares que incluyen diferenciación, proliferación y apoptosis (Vesely *et al.*, Mutat Res. 682: 7, 2009).

La activación de NF-kappaB y AP-1 tiene como resultado la transcripción de genes que codifican numerosas moléculas de señalización implicadas en el crecimiento tumoral, apoptosis, inflamación, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis. Citocinas como interleucina-1, interleucina-6, TNF-alfa o factores de crecimiento como TGF-beta (TGF-β) representan las señales cadena abajo más importantes de la activación de NF-kappaB y AP-1. En particular, el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) es una citocina altamente pleiotrópica que controla muchos aspectos de la función celular, incluyendo proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, adhesión, angiogénesis celular, control inmunitario y supervivencia y, por tanto, representa una diana importante para fármacos terapéuticos (Jakowlew, Cancer Metastasis Rev 2006; 25:435-57). TGF-beta es producido por muchos tipos de células, está siempre presente en el plasma (en su forma latente) y permea a todos los órganos, uniéndose a componentes de la matriz y creando una reserva de esta molécula inmunosupresora. De todos modos, se sobreproduce en muchas condiciones patológicas. Estas incluyen fibrosis pulmonar, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial renal, cirrosis, enfermedad de Crohn, cardiomiopatía, esclerodermia y enfermedad de injerto frente a huésped crónica (Prud'homme *et al.*, Lab Invest 2007; 87:1077-91). En enfermedad neoplásica, TGF-beta suprime la progresión de lesiones tempranas, pero más tarde este efecto se pierde y las células cancerígenas producen TGF-beta, que luego promueve metástasis. Esta citocina también contribuye a la formación del estroma tumoral, angiogénesis e inmunosupresión (Jakowlew, Cancer Metastasis Rev 2006; 25:435-57). A la vista de esto, se están estudiando varios enfoques para inhibir la actividad de TGF-beta, incluyendo anticuerpos neutralizadores, receptores solubles, fármacos antagonistas de receptor cinasa, y reactivos codificantes. Los beneficios de las nuevas terapias que se dirigen a TGF-beta están bajo intensa investigación (Prud'homme, Lab Invest 2007; 87:1077-91).

Para una intervención terapéutica se consideran todas las enfermedades autoinmunitarias cuando el proceso patológico está caracterizado por un defecto y alteración no regulada de componentes celulares y no celulares del sistema inmunitario tales como enfermedad celiaca, diabetes mellitus tipo 1 (IDDM), lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, síndrome de Churg-Strauss, esclerosis múltiple (EM), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Addison, anemia, espondilitis anquilosante, osteoartritis, síndrome de Behcet, aftas, fatiga crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de Crohn, enfermedad de Cushing, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, eccema, fibromialgia, pérdida de pelo, hepatitis, hipotiroidismo, liquen plano, enfermedad de Meniere, miastenia, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia,

septicemia, síndrome de Sjogren, envenenamiento solar, SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica) y uveítis (Masters *et al.*, Annu Rev Immunol 2009; 27:621-68).

En cánceres humanos, TGF-beta se produce por activación de NF-kappaB o API y promueve la tumorigénesis a través de la menor señalización de TGF-beta durante la tumorigénesis temprana y la mayor señalización de TGF-beta en la enfermedad progresiva avanzada. Hay evidencia de que TGF-beta regula la actividad del ciclo celular de células tumorales conduciendo a un control de la proliferación de células tumorales. Aunque el crecimiento de células normales y células tumorales diferenciadas es bloqueado por TGF-beta, se estimula el crecimiento de células tumorales no diferenciadas. La acción estimuladora de TGF-beta en células tumorales no diferenciadas se debe a una vía de señalización mutada. A pesar del efecto de TGF-beta sobre el crecimiento de células tumorales primarias, TGF-beta es uno de los reguladores más potentes de la metástasis tumoral a través de una estimulación de la extravasación de células tumorales. Un efecto sobre la angiogénesis tumoral es otro mecanismo de TGF-beta para estimular el crecimiento del tumor y la metástasis (Tian *et al.*, Future Oncol 2009; 5:259-71). Niveles elevados de TGF-beta se encontraron en una serie de tumores como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionado con SIDA, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, histiocitoma fibroso, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma de células T cutáneas, micosis fungoide, tumores embrionarios, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de células germinales, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (de hígado), linfoma de Hodgkin, tumores de células de los islotes, cáncer de riñón (renal), cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, mesotelioma, síndromes mielodisplásicos, cáncer nasofaríngeo, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, cáncer de recto, sarcoma, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de vagina (Jones *et al.*, Expert Opin Ther Targets 2009; 13:227-34).

Una función crítica para TGF-beta también fue corroborada en enfermedades del sistema cardiovascular. Muy similar al mecanismo de inducción de TGF-beta en tumores, un estímulo importante de la síntesis de TGF-beta en enfermedad cardiovascular es también la activación de NF-kappaB (Frangogiannis, Pharmacol Res 2008; 58:88). TGF-beta se ha implicado en muchos trastornos cardiovasculares tales como reperfusión por accidente cerebrovascular, isquemia, ataque cardíaco, miocarditis, insuficiencia miocárdica (Goumans *et al.*, Trends Cardiovasc 2008; 18:293-8). TGF-beta tiene importantes funciones en el desarrollo de la neointima y remodelado constructivo asociado con angioplastia. En aterosclerosis sus acciones aún tienen que ser totalmente elucidadas pero su capacidad para controlar el sistema inmunitario tiene profundos efectos sobre el desarrollo de lesiones, en particular influyendo en los tipos de lesiones que se desarrollan. TGF-beta también puede inducir arteriogénesis e influye profundamente en procesos angiogénicos, teniendo efectos tanto pro- como antiangiogénicos (Galinka *et al.*, Annu Rev Immunol 2009; 27:165-97). También es el mayor contribuyente al desarrollo de diversos trastornos fibróticos cardiovasculares incluyendo los de la vasculatura, corazón y riñón. TGF-beta también mostró que desempeñaba una función importante en el desarrollo y progresión de fibrosis. La fibrosis es la formación o desarrollo de tejido conectivo fibrótico en exceso en un órgano o tejido como proceso de reparación o reactivo, al contrario de la formación de tejido fibroso como un constituyente normal de un órgano o tejido. Son ejemplos la fibrosis quística del páncreas y pulmones, la fibrosis por inyección, que puede producirse como una complicación de inyecciones intramusculares, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, una complicación de la neumoconiosis de los trabajadores del carbón, fibrosis sistémica nefrogénica (Pohlers *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2009, 1792, 746-756).

Los fármacos terapéuticos anti-TGF-beta disponibles actualmente tienen varias desventajas. La desventaja significativa de fármacos establecidos para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria es su pequeña ventana terapéutica. Aplicaciones repetidas conducen normalmente a efectos adversos del fármaco y a graves daños a los órganos. Cardiotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatitis son efectos secundarios comunes de fármacos clínicamente disponibles para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria (Cohen, International Journal of Clinical Practice 2007; 1922-1930). En el entorno clínico, la mayoría de los fármacos establecidos se aplica intermitentemente para evitar una toxicidad irreversible. Sin embargo, pautas de tratamiento intermitentes aumentan el riesgo de progresión de la enfermedad. Por estas razones, existe una necesidad significativa de fármacos más eficientes y bien tolerados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con TGF-beta.

Es conocido que TGF-beta puede ser inhibido mediante diversos enfoques que conducen a una inhibición de la señalización del receptor. Sin embargo, estos enfoques se ven obstaculizados por una eficacia limitada y falta de tolerabilidad *in vivo*. Se ha descrito la síntesis de oligonucleótidos no codificantes para bloquear TGF-beta (Flanders, Clinical Medicine & Research 2003, 1, 13-20). Los oligonucleótidos no codificantes pueden reducir la síntesis de la proteína TGF-beta. Sin embargo, este enfoque no conduce con frecuencia a una inhibición completa de la síntesis de TGF-beta. Otra desventaja de los oligonucleótidos no codificantes es la baja cantidad de fármaco acumulado en el sitio de enfermedad. Los inhibidores de molécula pequeña (SMIs) del receptor de TGF-beta también son conocidos (Hjelmeland *et al.*, Mol Cancer Ther 2004; 3: 737-745). Estas moléculas están disponibles con frecuencia oralmente pero carecen de suficiente tolerabilidad y seguridad. Los efectos secundarios tóxicos de SMIs conocidos del receptor de TGF-beta son debidos a la falta de especificidad. El compuesto conocido no inhibe únicamente la señalización del receptor TGF-beta sino también muchos otros receptores con similitudes estructurales. También se conocen

anticuerpos que se unen a TGF-beta o bloquean la unión de TGF-beta a sus receptores. Estas moléculas muestran suficiente acumulación en el sitio de la enfermedad y bloquean la señalización durante un largo período de tiempo (Saunier *et al.*, Curr Cancer Drug Targets 2006; 6:565-78). Sin embargo, los anticuerpos tienen varias desventajas que limitan su aplicación terapéutica. En primer lugar, los anticuerpos que interfieren con TGF-beta pueden ejercer efectos secundarios debidos a la activación del sistema inmunitario por parte de los anticuerpos que tienen sitios de unión a componentes del sistema inmunitario. Esta activación del sistema inmunitario puede conducir a toxicidad del tratamiento. Otra desventaja puede ser la producción de anticuerpos neutralizadores. La aparición de anticuerpos neutralizadores se observa frecuentemente después de muchas aplicaciones. En caso de anticuerpos neutralizadores, se reduce la eficacia del tratamiento.

Debido a la limitación de los tratamientos conocidos, se requieren nuevos enfoques para tratar enfermedades relacionadas con NF-kappaB y AP-1 activados y síntesis elevada de TGF-beta. El objetivo final de un nuevo enfoque terapéutico es una alta eficacia y buena tolerabilidad. Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos y clases de compuestos que sean fáciles de sintetizar y que sean adecuados para el tratamiento de enfermedad asociada con activación de NF-kappaB o AP-1 y síntesis elevada de citocinas tales como TGF-beta. De acuerdo con la invención, se encontró sorprendentemente que las macromoléculas multivalentes polianiónicas representan una clase novedosa de moléculas terapéuticas que liberan de forma selectiva moléculas efectoras en el citoplasma y núcleos de células proliferativas y activadas.

El documento WO2008/015015 A2 describe sulfatos y sulfonatos de poliglicerol dendríticos y su uso para enfermedades inflamatorias.

El documento WO2009/112488 A2 describe conjugados de dendrón poliéter polioliol con moléculas efectoras para el direccionamiento biológico.

La invención propone el uso de macromoléculas polianiónicas basadas en el ensamblaje multivalente de una pluralidad de grupos sulfato en un vehículo macromolecular ramificado dendrítico para el suministro intracelular de moléculas efectoras para diagnóstico o terapéuticas. Más específicamente, la invención comprende el uso de polioles sulfatados con estructura hiperramificada a los cuales se unen covalentemente moléculas efectoras para diagnóstico o terapéuticas como fármacos para tratar enfermedades relacionadas con NF-kappaB y AP-1 activados y síntesis elevada de TGF-beta.

Compendio de la invención

La presente invención está caracterizada en las reivindicaciones adjuntas.

Es materia objeto de la presente invención:

- i) Conjugado de la fórmula $P(OSO_3^-M^+)_n(L-G-E)_m$, donde P es una macromolécula de polioliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato $OSO_3^-M^+$, siendo n un número > 10 , M es un contraion catiónico inorgánico u orgánico para el grupo sulfato aniónico, E es una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1 - 100, donde la macromolécula de polioliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
 - a. un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(RO-CH_2)_2CH-OR$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxilado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de polioliol $>60\%$ hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
 - b. la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-OSO_3^-H$ o $-OSO_3^-M^+$ con un número n de grupos $-OSO_3^-H$ o $-OSO_3^-M^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100%, y
 - c. el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
 - d. una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X\%$ de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
 - e. una molécula efectora de diagnóstico y/o terapéutica E, unida covalentemente a uno hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionada la molécula efectora de diagnóstico del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes para metales radiactivos o paramagnéticos, y estando seleccionadas las moléculas efectoras terapéuticas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.
- ii) Conjugado de la fórmula $P(OSO_3^-M^+)_n(L-G-E)_m$, donde P es una macromolécula de polioliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato $OSO_3^-M^+$, siendo n un número > 10 , M es un contraion

- 5 cationico inorganico u organico para el grupo sulfato anionico, E es una molécula efectora terapéutica, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1-100 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis y donde la macromolécula de poliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora terapéutica E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
- 10 a. un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(RO-CH_2)_2CH-OR$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxilado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol >60% hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
- 15 b. la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-OSO_3H$ o $-OSO_3M^+$ con un número n de grupos $-OSO_3H$ o $-OSO_3M^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100%, y
- c. el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
- d. una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X$ % de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora terapéutica adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
- e. una molécula efectora terapéutica E, unida covalentemente a una hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionadas las moléculas efectoras terapéuticas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.
- 20 iii) Conjugado de la fórmula $P(OSO_3M^+)_n(L-G-E)_m$, donde P es una macromolécula de poliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato OSO_3M^+ , siendo n un número > 10, M es un contraion cationico inorganico u organico para el grupo sulfato anionico, E es una molécula efectora de diagnóstico, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1-100 para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, y donde la macromolécula de poliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora de diagnóstico E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
- 25 a. un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(RO-CH_2)_2CH-OR$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxilado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol >60% hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
- 30 b. la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-OSO_3H$ o $-OSO_3M^+$ con un número n de grupos $-OSO_3H$ o $-OSO_3M^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100%, y
- c. el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
- 35 d. una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X$ % de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora de diagnóstico adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
- e. una molécula efectora de diagnóstico E, unida covalentemente a una hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionada la molécula efectora de diagnóstico del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes para metales radiactivos o paramagnéticos.
- 40 iv) Conjugado según los párrafos anteriores i) a iii) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis donde la molécula efectora E supone menos de 50% en peso del conjugado, y el conjugado tiene una solubilidad en agua de más de 100 mg/ml.
- 45 v) Conjugado según los párrafos anteriores i) a iv) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis por absorción intracelular en células activadas o células proliferativas y por inhibición de NF-kappaB y/o AP-1 y/o por inhibición de la síntesis de TGF-beta en dichas células.
- 50 vi) Conjugado según los párrafos anteriores i) a v) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, donde se llevan a cabo tratamientos múltiples con dosis de 1 mg/kg a 1000 mg/kg de dicho conjugado por administración.
- vii) Conjugado según los párrafos anteriores i) a vi) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis donde L es un grupo alquilo C_{1-20} lineal o ramificado donde uno o más grupos metileno no consecutivos pueden estar

reemplazados por un grupo seleccionado de O, S, NH, C(O)NH, C(O), SO₂, SO, arilo, eteno o etino, y donde G está seleccionado del grupo que consiste en -OH, -OSO₃H, -OSO₃⁻, -NH₂, -N₃, -COOH, -SH, -SO₃⁻, -C=C.

- 5 viii) Un conjugado según el párrafo i) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis mediante el suministro de una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico E en células activadas o proliferativas de un sujeto.
- ix) Formulación sin agua de un conjugado que comprende un poliglicerol sulfatado según el párrafo i) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis.
- 10 x) Formulación sin agua según el párrafo ix) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, donde el método de tratamiento de dicha enfermedad es por absorción intracelular en células activadas o células proliferativas y por inhibición de NF-kappaB y/o AP-1 y/o por inhibición de la síntesis de TGF-beta en dichas células.
- 15 xi) Formulación sin agua según los párrafos ix) o x) para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, que comprende además un liofilizado que contiene sales tampón y/o al menos un crioprotector seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, manosa, trehalosa.

La formulación sin agua de la invención puede usarse para el tratamiento múltiple con dosis de 1 mg/kg a 1000 mg/kg por administración.

20 Breve descripción de las figuras

Figura 1 es una representación esquemática de una estructura química de ejemplo de un polisulfato polianiónico macromolecular con estructura principal de poliglicerol dendrítico. La molécula iniciadora es TMP. La fórmula representa la entidad estructural principal de un poliglicerol sulfatado hiperramificado dendrítico. La síntesis de varios derivados se describe en los Ejemplos 1 y 2.

25 **Figura 2** es una representación esquemática de una estructura química de ejemplo de un polisulfato polianiónico macromolecular con estructura principal dendrítica de poli(amidoamina) (Bioconjug. Chem. 20: 693, 2009). La sulfatación del dendrímero se realiza como para el poliglicerol. La fórmula representa un compuesto con una sulfatación promedio de 90%.

30 **Figura 3** es una representación esquemática de una estructura química de ejemplo de un polisulfato polianiónico macromolecular con estructura principal dendrítica de poliéster de Boltorn (Bioconjug. Chem. 14: 817, 2003). La sulfatación del dendrímero se realiza como para el poliglicerol. La fórmula representa un compuesto con una sulfatación promedio de 83%.

35 **Figura 4** representa poligliceroles sulfatados con enlazadores según el Ejemplo 2. Los ejemplos incluyen una representación esquemática de la estructura principal de poliglicerol macromolecular sulfatado (círculo) con una subunidad estructural representativa de glicerol sulfatado, y una subunidad a la que está unido el enlazador.

Figura 5 representa conjugados de poligliceroles sulfatados con moléculas efectoras de diagnóstico de la clase de colorantes de cianina según el Ejemplo 3. Los ejemplos incluyen una representación esquemática de la estructura principal de poliglicerol macromolecular sulfatado (círculo) con una subunidad estructural representativa de glicerol sulfatado, y una subunidad a la que está unido el enlazador.

40 **Figura 6** representa conjugados de poligliceroles sulfatados con moléculas efectoras de diagnóstico de la clase de quelantes para radiomarcado (radiodiagnóstico y radioterapia) según el Ejemplo 4 y complejos metálicos para IRM según el Ejemplo 5. Los ejemplos incluyen una representación esquemática de la estructura principal de poliglicerol macromolecular sulfatado (círculo) con una subunidad estructural representativa de glicerol sulfatado, y una subunidad a la que está unido el enlazador.

45 **Figura 7** representa conjugados de poliglicerol sulfatados con moléculas efectoras terapéuticas de la clase de fotosensibilizadores, citostáticos (clorambucilo y paclitaxel) y ARNip según el Ejemplo 6. Los ejemplos incluyen una representación esquemática de la estructura principal de poliglicerol macromolecular sulfatado (círculo) con una subunidad estructural representativa de glicerol sulfatado, y una subunidad a la que está unido el enlazador.

50 **Figura 8** ilustra la absorción celular de conjugados de triglicerol o poliglicerol fluorescentes (colorante ICC) de diferentes pesos moleculares por células de cáncer de pulmón humano A549 incubadas *in vitro* durante 1 hora en una tinción citoquímica (tinción nuclear con DAPI) (Ejemplo 7).

Figura 9 ilustra la absorción celular de conjugado de ICC-triglicerol y la macromolécula sulfatada heparina y poliglicerol sulfatado (Ejemplo 3c) por células de cáncer de pulmón humano A549 incubadas *in vitro* durante 4 horas en una tinción citoquímica (tinción nuclear con DAPI). Solo el poliglicerol sulfatado (SPG) se localiza en la célula (Ejemplo 8).

Figura 10 muestra por análisis de citometría de flujo (FACS) que los monocitos pueden absorber poliglicerol sulfatado (compuesto del Ejemplo 3c) en cantidades muy altas, mientras que los linfocitos solo absorben cantidades marginales (Ejemplo 9).

5 **Figura 11** demuestra que poligliceroles sulfatados inducen una inhibición estadísticamente significativa de la liberación de TGF-beta-1 de células CASKI. Las células se trataron durante 48 horas y se detectó TGF-beta-1 en sobrenadantes en cultivo por ELISA (Ejemplo 10).

10 **Figura 12** muestra que poligliceroles sulfatados (SPG), poligliceroles sulfatados con enlazadores (SPGL), y conjugados con moléculas efectoras se unen con alta afinidad al factor de transcripción intracelular NF-kappaB medido por SPR/Biacore. Las afinidades de unión aumentan con el aumento del grado de sulfatación y el peso molecular mostrado por valores decrecientes de CI_{50} . Los enlazadores y moléculas efectoras no obstaculizan la afinidad de unión (Ejemplo 11).

15 **Figura 13** subraya que el poliglicerol sulfatado induce una inhibición estadísticamente significativa y biológicamente relevante del crecimiento de células tumorales de pulmón A549 (Figura 13A) y la actividad metabólica (Figura 13B). Las células A549 se cultivaron durante 7 días con poliglicerol sulfatado y se detectaron el número de células y la actividad metabólica. Se muestran el número de células tumorales (A) y los resultados de la prueba MTT (B) después de 7 días de cultivo ($PM \pm DT$) (Ejemplo 12).

20 **Figura 14** muestra el curso temporal del volumen de tumor de ratones atímicos (modelo de cáncer de pulmón A549) tratados con poliglicerol sulfatado o PBS (control). El poliglicerol sulfatado (compuesto P3) en dosis diarias de 30 mg/kg de peso corporal inhibe el crecimiento del tumor indicando un fuerte efecto terapéutico después de 45 días de tratamiento (Ejemplo 13).

Figura 15 verifica el efecto de tratamientos subcutáneos diarios de ratas con artritis inducida por colágeno y controles sanos con poliglicerol sulfatado. La puntuación clínica, número de mastocitos e infiltrado inflamatorio en la membrana sinovial están influenciados por el tratamiento con poliglicerol sulfatado en dosis diarias de 30 mg/kg indicando un resultado terapéutico significativo (Ejemplo 14).

25 **Figura 16** representa imágenes de fluorescencia de ratas anestesiadas con artritis reumatoide inducida por colágeno con ayuno y alta ingesta de poliglicerol sulfatado conjugado con colorante de cianina (compuesto P26/E2, Ejemplo 3b) y contraste de fluorescencia en articulaciones artríticas (10 min) que se incrementa con la actividad de la enfermedad (bajo a alto con puntuación de 1 a 3). Las flechas indican articulaciones artríticas con mucho contraste fluorescente (Ejemplo 17).

30 **Figura 17** muestra una imagen PET de un poliglicerol sulfatado conjugado con DOTA radiomarcado con ^{64}Cu (compuesto P17/E13, Ejemplo 4a) en un modelo de ratón para inflamación cutánea (hipersensibilidad por contacto). Imagen de ratón anestesiado que muestra un alto contraste en el tejido de la oreja inflamado. La flecha indica el área inflamada (Ejemplo 18).

35 **Figura 18** demuestra que el poliglicerol sulfatado conjugado con paclitaxel (taxol) (compuesto del Ejemplo 6b) aumenta la inhibición del crecimiento celular y actividad metabólica de células tumorales de pulmón A549 comparado con paclitaxel (taxol) sin conjugación. Se muestran el número de células tumorales (Figura 18A) y los resultados de la prueba MTT (Figura 18B) después de 48 horas de cultivo ($PM \pm DT$, $n = 4$) (Ejemplo 19).

40 **Figura 19** muestra la producción de VEGF en líneas de células de cáncer de pulmón A549 después de incubación con poliglicerol sulfatado (SPG) conjugado con VEGF-ARNip (Ejemplo 6e) o VEGF-ARNip solo. La proteína VEGF se midió por ELISA en medio de cultivo celular acondicionado 48 horas. Cada barra es la media \pm DTM de tres determinaciones de tres experimentos independientes (Ejemplo 20).

Figura 20 representa estructuras químicas de ICG (Figura 20a), análogos de ICG según la invención (Figura 20b) y estructuras de derivados preferidos usados como moléculas efectoras de diagnóstico (Figura 20c-d).

45 **Figura 21** ilustra la disminución de fluorescencia de poliglicerol sulfatado conjugado con colorante de cianina (compuesto P17/E1, Ejemplo 3c) en NaCl al 0,9% debida a agregación.

Descripción detallada de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco para el tratamiento de enfermedad tumoral, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis que esté caracterizado por alta eficacia terapéutica y buena tolerabilidad. Los conjugados de acuerdo con la presente invención están adaptados para suministrar las moléculas efectoras en el cicloplasma y núcleo de células proliferativas y activadas para el diagnóstico o tratamiento de enfermedad tumoral, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, especialmente debido a su alta eficacia y buena tolerabilidad encontradas de forma sorprendente incluso después de la aplicación de altas dosis. Una vía celular estudiada sistemáticamente mediante la cual las células absorben moléculas (tales como macromoléculas) del exterior de la célula sumergiendo las mismas en su membrana celular. Es un mecanismo general aplicado a todas las células del cuerpo debido a que la mayoría de las sustancias y sustratos importantes para las mismas son grandes moléculas polares que no pueden

pasar a través de la membrana plasmática hidrófoba o la membrana celular. El proceso de endocitosis está presente tanto en células sanas como en células implicadas en el proceso de enfermedad (Liu *et al.*, PLOS Biology 2009; 7:1000204).

5 El mecanismo de endocitosis está particularmente involucrado cuando grandes moléculas de estructura macromolecular o entidades basadas en partículas (nanopartículas orgánicas o inorgánicas) alcanzan la membrana celular. Por tanto, el diseño de fármacos con propiedades de direccionamiento mejoradas se ha conseguido aplicando moléculas vehículo macromoleculares. En particular, se han sintetizado una amplia diversidad de entidades poliméricas o dendrímeros (Nori *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 57: 609, 2005, Haag *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 45: 1198, 2006). Las modificaciones químicas de macromoléculas con respecto a las propiedades de direccionamiento de las moléculas están bien establecidas. Hay una fuerte evidencia de que estructuras catiónicas colocadas en una macromolécula permiten a las macromoléculas cruzar la membrana celular mediante endocitosis. En este sentido, se usan macromoléculas catiónicas para el suministro intracelular de efectores de diagnóstico y terapéuticos (Paleos *et al.*, Curr Top Med Chem. 8: 1204, 2008). Sin embargo, las macromoléculas catiónicas son absorbidas por cada célula en el organismo humano de acuerdo con la capacidad general de cada célula para aplicar el mecanismo de endocitosis. Por tanto, el suministro del fármaco implica a los componentes y estructuras con elementos catiónicos (p. ej. WO2009142893). Esto provoca muchos efectos indeseados y toxicidad del tratamiento farmacológico, así como el depósito de los fármacos en compartimentos no deseados del cuerpo. Se identificó un péptido catiónico, Penetratina como inhibidor intracelular para NF-kappaB (Letoha *et al.* Mol. Pharmacol. 69: 2027, 2006).

20 Es bien conocido que la mayoría de las estructuras aniónicas no son absorbidas por células debido a la carga negativa de la membrana celular de una célula intacta que conduce a repulsión y prevención de la permeación en la membrana celular. Se han descrito con mucha extensión entidades macromoleculares que poseen un comportamiento polianiónico. Entre este grupo están compuestos de origen natural tales como proteoglicanos, superficies bicapa lipídicas, microtúbulos y polinucleótidos tales como ADN o ARN. Estos desempeñan una función central en la transcripción génica y la síntesis de proteínas. Otros compuestos son macromoléculas poliméricas artificiales o dendrímeros tales como poliaminoácidos, policarboxilatos y oligonucleótidos sintéticos. Debido a la carga negativa de la membrana celular de una célula intacta puede esperarse que la interacción electrostática de macromoléculas polianiónicas con la membrana celular pueda conducir a repulsión y prevención de la permeación en la membrana celular. Por tanto, es bien conocido que pueden usarse macromoléculas polianiónicas para suministrar moléculas efectoras en el citoplasma y núcleo de células proliferativas y activadas. De hecho, se han realizados muchos esfuerzos por liberar ARN o ARNip en el compartimento intracelular con la ayuda de moléculas vehículo catiónicas o particulares debido a que el ARN o ARNip solos administrados como efectores farmacológicos no son capaces de localizarse suficientemente en la célula (Jeong *et al.*, Bioconj. Chem. 20: 5, 2009).

35 En principio, hay muchos compuestos macromoleculares conocidos que se han aplicado como vehículos para el suministro de fármacos. Estas macromoléculas pueden diferir en su tipo de estructura química de la estructura principal polimérica o dendrítica, la unión de cargas aniónicas de cabeza, el peso molecular y el grado de ramificación que varía desde estructuras totalmente lineales a hiperramificadas. La naturaleza química de la estructura principal polimérica puede derivarse de polimerización que conduce a distribuciones de peso molecular polidispersas, o sintetizadas racionalmente que producen dendrímeros de estructura y peso molecular definidos. Ejemplos bien estudiados son Poliamidoaminas (PAMAM), Polilisinas (PL), Polietilen iminas (PEI), las cuales se sintetizan todas como polímeros polidispersos de estructura lineal o ramificada, o como dendrímeros de estructura química definida. Es bien conocido por un experto en la técnica que el mecanismo generalmente subyacente de la absorción celular de entidades macromoleculares, tales como PAMAM, PEI, PL y otras, se basa en vías endocitóticas, como las descritas antes. Puede encontrarse más información sobre el suministro de fármacos macromoleculares en la siguiente bibliografía: Saovapakhiran *et al.*, Bioconj. Chem. 20: 693, 2009; Seib *et al.*, J. Contr. Release 117: 291, 2007, Nori *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 57: 609, 2005, Haag *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 45: 1198, 2006.

50 De forma sorprendente, se encontró que la macromolécula polianiónica dendrítica de la clase de compuestos de poliol sulfatado se localiza selectivamente en el interior de la célula por un mecanismo específico. El poliol del mismo peso molecular pero sin grupos sulfato no se localiza en células de cáncer de pulmón A549 humano. En particular, se marcaron poligliceroles dendríticos hiperramificados de diferentes pesos moleculares que varían de 5 kDa a 208 kDa, pero sin grupos sulfato, teniendo así solo grupos hidroxilo libres de la estructura principal poliol, con un colorante de carbocianina fluorescente (ICC) para medir comparativamente la absorción intracelular en células de cáncer de pulmón A549 humano. Los autores de la invención encontraron sorprendentemente que solo las macromoléculas con un peso molecular de 120 kDa y superiores son absorbidas por células de cáncer de pulmón A549 humano por endocitosis si estas no portan una pluralidad de grupos sulfato. Además, un poliglicerol dendrítico hiperramificado de un peso molecular de hasta 20 kDa y sin grupos sulfato no cruza la membrana celular por endocitosis (Ejemplo 7, Figura 2), mientras que un poliglicerol sulfatado de un peso molecular de hasta 20 kDa es localizado en las células. Esto muestra claramente la ventaja de poligliceroles dendríticos sulfatados en comparación con los no sulfatados puesto que los sulfatados son absorbidos intracelularmente.

60 Se encontró además que los sulfatos oligoméricos no muestran localización intracelular y no tienen una afinidad de unión razonable hacia NF-kappaB, cuando el número de grupos sulfato ensamblados como pluralidad en un vehículo macromolecular está por debajo de un cierto valor. Un dendrímero sulfatado ramificado basado en glicerol (1ª generación con 4 sulfatos, 2ª generación con 8 sulfatos, 3ª generación con 16 sulfatos) conjugado con colorante de

5 cianina mostró en todos los casos afinidades de unión a NF-kappaB de un valor de $Cl_{50} > 1000$ (Ejemplo 11 de la presente invención). Puede llegarse a la conclusión de que el ensamblado multivalente de una pluralidad de grupos sulfato sobre una estructura principal de vehículo polimérico o dendrítico es el factor facilitador clave que conduce a las propiedades sorprendentemente identificadas de localización celular y unión de factores de transcripción NF-kappaB y AP-1, y que es necesario un número mínimo de grupos sulfato. Por tanto, se prefieren poligliceroles sulfatados y conjugados de poliglicerol sulfatado que presenten un número superior a 10 grupos sulfato, más preferiblemente superior a 15 grupos sulfatos, incluso más preferiblemente superior a 20 grupos sulfatos, y lo más preferiblemente superior a 25 grupos sulfatos.

10 Por tanto, es una propiedad novedosa e inventiva que la carga aniónica es capaz de actuar como vehículo específico en el interior de las células y la función efectora para el direccionamiento intracelular de proliferación y síntesis de proteínas cuando la carga aniónica está ensamblada como una pluralidad macromolecular. Más específicamente, el grupo sulfato aniónico está unido covalentemente a una molécula vehículo macromolecular conduciendo a las propiedades sorprendentemente identificadas antes descritas de localización celular y unión de factores de transcripción NF-kappaB y AP-1 e inhibición de la síntesis de TGF-beta. De acuerdo con la presente invención, se encontró que poligliceroles sulfatados con un tamaño molecular por debajo de la propiedad de una macromolécula para ser localizada en el interior de la célula a través del proceso de endocitosis (como se muestra para poliglicerol sin grupos sulfato, que requiere un peso molecular mucho más alto para localizarse en la célula; véase antes) eran transportados específicamente por un mecanismo específico al interior de la célula sin implicar endocitosis. En detalle, los estudios sobre el mecanismo de transporte usando poliglicerol sulfatado de peso molecular inferior a 20 kPa proporcionaron evidencias de una bomba de entrada para macromoléculas aniónicas orgánicas que era desconocida hasta ahora. La bomba de entrada está específicamente presente en células proliferativas y activadas.

15 Polímeros o dendrímeros que emplean carácter polianiónico en el intervalo de pH fisiológico pueden ser sulfonatos, sulfatos, fosfonatos, fosfatos, carboxilatos. La introducción sintética de estos grupos en macromoléculas es versátil; una vía razonable es convertir grupos hidroxilo de un poliol en sulfatos proporcionando polisulfatos. Las condiciones de reacción determinan el grado de conversión (ver detalles más abajo). Los poligliceroles sulfatados se describieron primero como una nueva clase de macromoléculas polianiónicas por Türk *et al.* (Bioconjugate Chemistry 15, 2003, 162-167). El documento WO 2008/015015 describe diferentes sustancias encontradas para inhibir la coagulación. De esta publicación de la técnica anterior, no hay sugerencia para la localización intracelular y unión selectiva a NF-kappaB y AP-1, y la inhibición de la liberación de TGF-beta.

20 Los dendrímeros polianiónicos basados en Poliamidoamina (PAMAM) o estructura principal de polilisina acoplada a naftaleno disulfonado se conocen como fármacos candidatos microbicidas para la prevención de VIH (McCarthy *et al.*, Molecular Pharmaceutics 2005, 2, 312-318; Witvrouw *et al.*, Molecular Pharmacol. 2000, 58, 1100-1108). Los compuestos se dirigen a receptores diana en las membranas celulares de partículas víricas. No puede inferirse de estos datos que las dianas intracelulares pueden ser alcanzadas en líneas de células humanas. A una concentración de 2500 veces superior a la concentración de la DE_{50} , se observó permeación celular, que indica un mecanismo no específico de infiltración celular.

25 Además, se encontró sorprendentemente que polioles polianiónicos son adecuados para liberar moléculas efectoras de diagnóstico y terapéuticas en la célula diana y así sirven como vehículo de fármacos terapéuticos. El documento WO93018793 describe la preparación de conjugados de fármacos polianiónicos para el suministro en células endoteliales. Los ejemplos expuestos en el documento WO93018793 se refieren a la preparación de conjugados de fármacos de heparina para el uso de un suministro dirigido a diana de células endoteliales.

30 Se proporcionan evidencias de que los conjugados de fármacos de heparina se unen sobre la membrana de células endoteliales. No se proporciona información de que los conjugados de fármacos de heparina sean adecuados para liberar fármacos en el citoplasma de células endoteliales. En línea con el documento WO93018793 los autores de la invención encontraron que la heparina no cruza la membrana celular en concentración relevante y no libera efectores diagnósticos en la célula. La heparina tiene un peso molecular en el intervalo de 7 kDa a 30 kDa que es inferior al tamaño necesario para la absorción intracelular endocitótica. Además, los resultados experimentales de la presente invención confirman de este modo la incapacidad de la heparina para localizarse en el interior de la célula (Ejemplo 8 de la presente invención).

35 Más específicamente, efectores terapéuticos con respecto a la presente invención son moléculas que pueden inducir directa o indirectamente efectos inhibidores o tóxicos sobre la célula diana. Efectores terapéuticos que se unen a una determinada diana intracelular que es indispensable para la proliferación y activación representan un efector directo. Los inventores encontraron sorprendentemente que polioles polianiónicos de la clase de poligliceroles sulfatados exhiben una acumulación fuerte y de larga duración en el interior de la célula debido a la fuerte unión a NF-kappaB y AP-1 (Ejemplo 8). En cambio, polioles sin grupos sulfato se eliminan rápidamente del citoplasma de la célula después de interrumpirse la incubación (Ejemplo 7). En resumen, los inventores encontraron de forma sorprendente que polioles polianiónicos se unen con alta afinidad a moléculas diana intracelulares previniendo de este modo la eliminación rápida. Esta propiedad encontrada sorprendentemente demuestra que una pluralidad de grupos sulfato unidos a una estructura principal vehículo basada en poliol exhibe un efecto terapéutico directo, por ello los grupos sulfato son efectores directos de acuerdo con la invención. Los inventores demostraron que estos efectores contra NF-kappaB inhiben de forma muy eficaz la síntesis de TGF-beta (Ejemplo 10). Puesto que TGF-beta es un mediador

importante en enfermedad autoinmunitaria, septicemia, SIRS, fibrosis, cáncer y enfermedad cardiovascular, puede observarse un efecto terapéutico final.

Basándose en las propiedades identificadas y descritas antes, se encontró que polioles sulfatados están adaptadas de forma óptima para suministro de moléculas efectoras diagnósticas y terapéuticas adicionales en la célula. Estos efectos indirectos con respecto a la presente invención son moléculas que pueden inducir efectos inhibidores o tóxicos adicionales a la célula diana independientes de la inhibición de la actividad de NF-kappaB y AP-1. Una propiedad particular de polioles polianiónicos es, por tanto, liberar efectores terapéuticos y de diagnóstico en la célula que muestra una acumulación y absorción en las células, que es de mayor duración que las respectivas moléculas terapéuticas y de diagnóstico solas. Las moléculas terapéuticas y de diagnóstico están conjugadas covalentemente con el poliol sulfatado de la clase de políglicerol proporcionando así un conjugado entre políglicerol sulfatado y efector terapéutico y de diagnóstico.

A la vista de los hallazgos expuestos antes, la descripción comprende el uso de los conjugados citados antes y/o reivindicados para el direccionamiento de moléculas intracelulares implicadas en la proliferación y síntesis de proteínas de células activadas. En un aspecto particular, varios grupos sulfato unidos a un poliol se dirigen específicamente al citoplasma y núcleo de células proliferativas y activadas. Se encontró que el direccionamiento era fundamentalmente diferente al mecanismo de absorción celular conocido de endocitosis y a la absorción de macromoléculas conocidas que se produce en cada tipo de célula. La invención demuestra que los conjugados citados antes y/o reivindicados son efectivos a pesos moleculares por debajo de las vías de endocitosis y son selectivos para las células activadas y proliferativas (Ejemplo 8 y Ejemplo 9).

Un experto en la técnica entiende una célula activada como una célula con actividad metabólica aumentada. Células activadas pueden caracterizarse por el ensayo MTT. Además, la activación celular puede demostrarse por detección de diferentes citocinas inflamatorias en los sobrenadantes de diferentes tipos de células tales como células mononucleares de sangre periférica aisladas o células de líneas hematopoyéticas. De acuerdo con la invención, células activadas comprenden por tanto células del sistema inmunitario o células tumorales. Las células del sistema inmunitario pueden ser, por ejemplo, monocitos, macrófagos o linfocitos.

Basándose en los hallazgos descritos antes, la descripción comprende el uso de los conjugados citados antes y/o reivindicados de la fórmula general:

$P(OSO_3^-M^+)_n(L-G-E)_m$ con P = macromolécula de poliol, donde un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato $OSO_3^-M^+$, siendo el número de grupos sulfato preferiblemente $n > 10$, M = contraión inorgánico u orgánico catiónico para el grupo sulfato aniónico, E = molécula efectora terapéutica o de diagnóstico, L = enlazador o separador entre P y E, G = grupo reactivo para la unión entre L y E, $m = 1 - 100$.

En una forma de realización más preferida, la descripción comprende el uso de los conjugados citados antes y/o reivindicados de la fórmula general $P(OSO_3^-M^+)_n(L-G-E)_m$ con P = políglicerol donde un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato $OSO_3^-M^+$, siendo el número de grupos sulfato preferiblemente $n > 10$, M = contraión inorgánico u orgánico catiónico para el grupo sulfato aniónico, E = molécula efectora terapéutica o de diagnóstico, L = enlazador o separador entre P y E, G = grupo reactivo para la unión entre L y E, $m = 1 - 100$.

Los polioles polianiónicos usados en los conjugados y formulaciones de la invención con moléculas efectoras terapéuticas o de diagnóstico unidas covalentemente son nuevos y no se han descrito antes.

El número posible de grupos sulfato n depende del peso molecular de la macromolécula. Como una forma de realización particular, la macromolécula de poliol se basa en políglicerol que consiste en unidades repetidas de unidades glicerol para las cuales cada unidad permite un grupo OH en la macromolécula. Por ejemplo, un núcleo de políglicerol de 10000 g/mol permite 135 grupos OH, un núcleo de políglicerol de 2000 g/mol permite 27 grupos OH calculados para una molécula monodispersa teórica (véase la posterior explicación más adelante).

En una descripción más detallada de la forma de realización, los conjugados de acuerdo con la invención comprenden polígliceroles sulfatados que comprenden

- un políglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(RO-CH_2)_2CH-OR$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxilado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol >60% hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
- la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-OSO_3^-M^+$ o $-OSO_3^-M^+$ con un número n de grupos $-OSO_3^-M^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100%, y
- el peso molecular promedio resultante del políglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
- una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de 100 - X % de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico adicional, donde X es el grado de sulfatación, y

- e. una molécula efectora de diagnóstico y/o terapéutica E, unida covalentemente a uno hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionada la molécula efectora de diagnóstico del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes para metales radiactivos o paramagnéticos, y estando seleccionadas las moléculas efectoras terapéuticas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.

“Grado de ramificación” de acuerdo con la invención significa el grado de ramificación obtenido por la reacción de ambos grupos OH disponibles de una unidad glicerol con dos moléculas de monómero adicionales durante el proceso de polimerización (glicidilo en caso de polimerización aniónica). Un grado de ramificación de 0 describe un políglicerol totalmente lineal, sin unidades glicerol unidas a ambos grupos OH de una unidad glicerol. Un grado de ramificación de 67% (2/3) es el máximo teóricamente alcanzable para polígliceroles altamente ramificados y significa que todos los grupos OH de una unidad glicerol han reaccionado con dos unidades de glicerol adicionales. De acuerdo con la presente descripción se usan núcleos de políglicerol poliméricos con una ramificación de 20 a 67%. Preferiblemente se usan estructuras altamente ramificadas, preferiblemente con un grado de ramificación de 30 a 67%, más preferiblemente 50 a 67%, particularmente preferiblemente con un grado de ramificación superior al 60%. De acuerdo con la invención, el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de polioli es > 60% a 67%. El núcleo del políglicerol polimérico se produce usando una molécula iniciadora (multi)funcional o iniciadora, respectivamente, durante la polimerización de apertura del anillo de glicidol. La molécula iniciadora o iniciador, respectivamente, es un compuesto polihidroxilado, que tiene 1 a 1000, preferiblemente 1 a 100 y más preferiblemente 1 a 10, lo más preferiblemente 1 a 4 grupos OH. La molécula iniciadora tiene la fórmula genérica R-(OH)_x, donde R puede ser cualquier molécula, que es estable en condiciones de la polimerización aniónica y, x es 1 a 1000; preferiblemente 1 a 100 y más preferiblemente 1 a 10, lo más preferiblemente 1 a 4. Preferiblemente los iniciadores usados son iniciadores tris- o tetrafuncionales, tales como 1,1,1-trihidroximetilpropano (TMP) o 1,1,1-trihidroximetiletano (TME) como iniciador trifuncional preferido o pentaeritrol (PE) como iniciador tetrafuncional preferido. La molécula iniciadora o el iniciador, respectivamente, pueden llevar grupos funcionales adicionales, tales como particularmente grupos SH, grupos NH₂. La molécula iniciadora puede contener grupos OH y/u otras funcionalidades (como SH, NH₂ derivatizado con grupos protectores adecuados). Otra molécula iniciadora puede ser un políglicerol polimérico pequeño con más de 3, preferiblemente más de 10, más preferiblemente más de 20 grupos OH. Otros iniciadores, heterofuncionalidades y grupos protectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

El término “núcleo de políglicerol” de acuerdo con la presente invención describe las moléculas poliméricas que consisten en unidades repetidas de glicerol con la fórmula (RO-CH₂)₂CH-OR generada por el proceso de polimerización en una molécula iniciadora multifuncional. Por ello, el núcleo incluye solo grupos hidroxilo libres y los elementos C, H, O. El peso molecular del núcleo puede determinarse por ejemplo, por espectroscopía de masas (MALDI). El núcleo se somete a posteriores derivatizaciones o funcionalizaciones conduciendo a los compuestos de la invención. Estas funcionalizaciones incluyen la sulfatación usando reaccionantes adecuados conocidos por los expertos en la técnica, o incluyen la unión covalente de moléculas de enlazador. Preferiblemente se usa como agente de sulfatación un complejo de SO₃ y piridina. Este reaccionante convierte un grupo -OH en un grupo -OSO₃H o -OSO₃⁻M⁺. Dicho reaccionante de sulfatación se usa preferiblemente en una concentración que corresponde al grado de sulfatación deseado. Esto significa que el reaccionante de sulfatación se usa en una concentración equimolar o de mayores equivalentes molares relativa a los grupos OH del núcleo de políglicerol polimérico a convertir. La funcionalización resultante, es decir, la sulfatación, puede ajustarse así mediante la relación de SO₃ a los grupos OH del políglicerol.

“Grado de sulfatación” de acuerdo con la presente invención significa el porcentaje de grupos OH funcionalizados (sulfatados) de las unidades de glicerol del núcleo de políglicerol polimérico respecto al número de grupos OH totales. La funcionalización se produce bien por la sustitución de uno o más grupos OH de las unidades glicerol con grupos -OSO₃H o -OSO₃⁻M⁺ o de la unión de un espaciador oligomérico que tiene grupos -OSO₃H o -OSO₃⁻M⁺ en uno o más grupos OH de las unidades glicerol.

El contraion catiónico M⁺ está seleccionado del grupo de metales alcalinos inorgánicos sodio, potasio, litio, calcio, o de compuestos catiónicos orgánicos meglumina, lisina, glicina, o mezclas de los mismos. Se prefiere sodio que conduce a grupos -SO₃⁻Na⁺.

Para polioles, en particular polígliceroles, la presente invención proporciona datos relativos a que el parámetro de peso molecular del polímero así como el grado de sulfatación de los grupos hidroxilo es importante para mejorar la afinidad de unión a dianas intracelulares. De forma sorprendente, se encontró que tanto el aumento del grado de sulfatación como el aumento del peso molecular incrementan la afinidad de unión a NF-kappaB. Este aumento no era esperado y es un fuerte indicador de una nueva propiedad de la molécula. Polígliceroles sulfatados preferidos son por tanto polígliceroles de pesos moleculares del núcleo superior a 3000 g/mol, más preferiblemente superior a 6000 g/mol, incluso más preferiblemente superior a 10000 g/mol. El grado preferido de sulfatación es superior a 38%, más preferiblemente superior a 50%, incluso más preferiblemente superior a 76%, lo más preferido superior a 86% e incluso lo más preferido superior a 90%. Los valores preferidos y el grado máximo alcanzable de 100% se sobreentiende que está basado en un error típico general de medida por análisis elemental del azufre a ± 5%.

Dependiendo de la elección del iniciador y las condiciones de polimerización el núcleo de políglicerol polimérico alcanza un grado de ramificación y un peso molecular medio ajustable arbitrariamente, que no es un peso molecular

definido sino una distribución que abarca un intervalo de peso molecular. Esto se denomina polidispersidad y puede describirse por el índice de polidispersidad (PDI). El PDI se define como M_w/M_n , siendo M_w el peso molecular promedio en peso, y siendo M_n el peso molecular promedio en número. Índices de polidispersidad preferidos de los poligliceroles altamente sulfatados están por debajo de 2,3, más preferiblemente por debajo de 1,8, lo más preferido por debajo de 1,5. Los pesos moleculares promedio usados para la descripción de los núcleos de poliglicerol son la masa molecular promedio en número M_n .

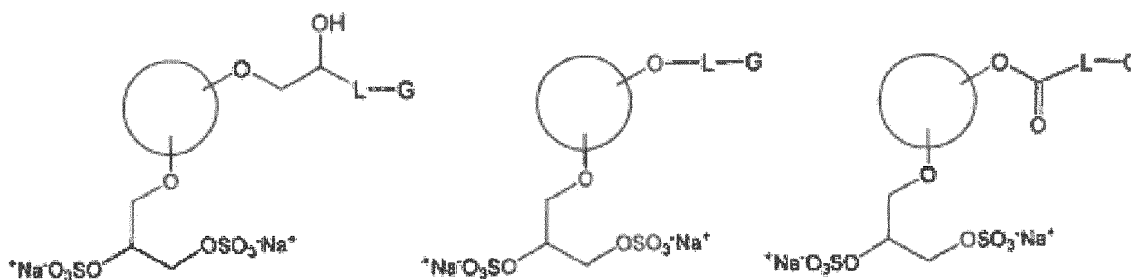
Las reacciones de sulfatación son conocidas para los expertos en la técnica como se ha descrito antes. La sulfatación se consigue preferiblemente usando complejos de trióxido de azufre (piridinio- SO_3 , trimetilamina- SO_3 , trietilamina- SO_3 , dimetilformamida- SO_3). La sulfatación se lleva a cabo sobre el poliglicerol aislado, o seguidamente después de la polimerización en una etapa añadiendo el reaccionante de sulfatación directamente en el reactor de polimerización. Este procedimiento en una etapa para obtener el poliglicerol sulfatado de acuerdo con la invención es novedoso y no se ha descrito antes. El grado de sulfatación se mejoró respecto al estado de la técnica modificando las condiciones de sulfatación. Un exceso de 1,2 veces del reaccionante de sulfatación combinado con una temperatura de reacción mantenida superior a 80°C , preferiblemente superior a 90°C durante un tiempo de reacción de al menos 18 horas, es adecuada para obtener grados de sulfatación superiores a 85%. De forma sorprendente, no se detectaron productos de descomposición y subproductos.

Se encontró sorprendentemente, que unidades de enlazador adicionales unidas a la macromolécula, demostraron para el poliglicerol sulfatado, que no obstaculizan el modo de acción de la invención y el uso de los compuestos. En el Ejemplo 11 se muestra que la modificación con enlazador conduce a afinidad de unión a NF-kappaB a un valor de Cl_{50} idéntico comparado con el poliglicerol sulfatado sin enlazador. Usando el enfoque de síntesis de modificación con enlazador seguido de la sulfatación y la etapa de desprotección para proporcionar derivados con grupos funcionales reactivos, se encontró que es posible una conjugación covalente eficiente para moléculas de diagnóstico y/o terapéuticas. El documento WO2008/015015 reivindica sulfatos de poliglicerol con moléculas señalizadoras, sin embargo, no aporta información detallada de síntesis para obtener tales conjugados mediante una modificación con enlazador razonable y no ejemplifica dichos conjugados.

El documento WO2008/015015 no proporciona detalles químicos sobre moléculas señalizadoras y soluciones técnicas sobre cómo aplicarlas. Además, el tipo de química sintética que justifica el término usado "cargado" o "unido" se no se proporciona y no está claro.

La unidad enlazadora L es un alquilo que tiene un grupo funcional unido a al menos uno de los grupos OH, siendo el grupo funcional G potencialmente capaz de conjugarse con una molécula efectora E terapéutica o de diagnóstico adicional. De acuerdo con la invención, el enlazador está unido a al menos un grupo OH formando de este modo una unión éter, carboxil éster, sulfonil éster, carbamato, tiocarbamato, urea, tiourea, triazol. Los sulfatos de poliglicerol con enlazadores adicionales de acuerdo con la invención son novedosos y no se han descrito antes.

Se prefieren los poligliceroles sulfatados de la fórmula (I), (II) o (III),



Fórmula I

Fórmula II

Fórmula III

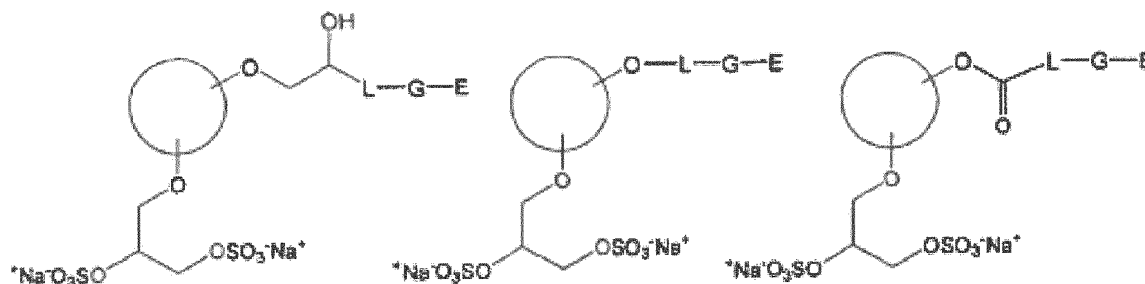
donde L es un grupo alquilo C_{1-20} lineal o ramificado en el que uno o más (preferiblemente uno a tres) grupos metileno no consecutivos pueden estar reemplazados por un grupo seleccionado del grupo que comprende O, S, NH, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, $\text{C}(\text{O})$, SO_2 , SO, arilo, eteno o etino, y donde G está seleccionado del grupo que comprende -OH, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3\text{Na}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{C}\equiv\text{C}$, donde -OH, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$ puede ser o quedar funcionalizado con grupos conocidos por un experto.

La fórmula ilustra la estructura química de una unidad enlazadora para la simplificación y muestra el poliglicerol sulfatado como bosquejo (círculo) con dos grupos sulfato en la subunidad glicerol dibujado a modo de ejemplo. Se sobrentiende que derivadas del respectivo grado de sulfatación, otras subunidades glicerol pueden portar grupos hidroxilo libres además de los grupos sulfatados. De acuerdo con la invención las unidades enlazadoras pueden estar unidas a al menos un grupo OH hasta un máximo de $100\text{-X}\%$ de los grupos OH, donde X es el grado de sulfatación.

Los poligliceroles sulfatados modificados con enlazador pueden aplicarse para unir covalentemente moléculas efectoras de diagnóstico y/o terapéuticas al polímero y transportar las moléculas efectoras al sitio diana. De acuerdo con la invención estas moléculas efectoras son efectores indirectos, mientras que la pluralidad de sulfatos son efectores directos, como se ha descrito antes. Se mostró que la conjugación con moléculas efectoras de diagnóstico conduce a una acumulación en los tejidos diana demostrando una absorción específica de la diana. En el Ejemplo 8 y 9 se muestra que el poliglicerol sulfatado con una molécula efectora de diagnóstico de la clase de colorantes de cianina fluorescentes conduce a un transporte y unión mejorados del colorante en la célula comparados con el colorante de bajo peso molecular conjugado solo con una unidad de triglicerol (ICC-triglicerol). Así, poligliceroles sulfatados modificados con enlazador son una clase de compuestos de la invención sorprendentemente identificados, que proporcionan eficacia terapéutica indirecta basándose en la capacidad para unir covalentemente moléculas efectoras de diagnóstico y/o terapéuticas al polímero. La síntesis de conjugados de diagnóstico se describe con detalle en los Ejemplos 2 - 5.

Además, pueden usarse compuestos terapéuticos macromoleculares para el suministro específico para una diana de moléculas que presentan efectos terapéuticos indirectos de acuerdo con la invención. El estado de la técnica describe diversos conjugados basados en macromoléculas (Nori *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 609, 2005, Haag *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 1198, 2006). Se conocen en la bibliografía macromoléculas que portan una pluralidad de sulfatos junto con moléculas efectoras terapéuticas, especialmente poligliceroles sulfatados que portan tales moléculas efectoras. Los Ejemplos 6 y 17 demuestran que la unión covalente a moléculas efectoras terapéuticas de la clase de citostáticos y ARNip inducen efectos terapéuticos mejorados a través del modo de acción de absorción intracelular, y unión a factores de transcripción NF-kappaB y AP-1, e inhibición de la síntesis de TGF-beta.

Se prefieren derivados con unidades enlazadoras L que emplean una funcionalización de heteroátomo G que reacciona covalentemente con moléculas efectoras de diagnóstico y/o terapéuticas E, ilustradas por la fórmula (IV), (V) o (VI),



Fórmula IV

Fórmula V

Fórmula VI

El grado de ramificación, grado de sulfatación y unidad enlazadora se describen antes y se usan aquí en este sentido. La ilustración de poliglicerol sulfatado como círculo se ha descrito antes.

De acuerdo con la invención, las moléculas efectoras de diagnóstico están seleccionadas del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes con metales radiactivos o paramagnéticos, y las moléculas efectoras terapéuticas están seleccionadas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.

Como molécula efectora con función diagnóstica (E) seleccionada del grupo de colorantes fluorescentes, las moléculas comprenden un colorante fluorescente con una emisión de fluorescencia en el rango del espectro UV/visible (400-800 nm) o infrarrojo cercano (700-1000 nm). Preferiblemente, la molécula efectora óptica con función diagnóstica está seleccionada del grupo que comprende NBD, fluoresceínas, rodaminas, colorantes de perileno, colorantes de croconio, colorantes de esquarilio, colorantes de polimetina, colorantes de indocarbocianina, colorantes de indodicarbocianina, colorantes de indotricarbocianina, colorantes de merocianina, colorantes de ftalocianinas, colorantes de naftalocianinas, colorantes de trifenilmetina, colorantes de croconio, colorantes de esquarilio, colorantes de benzofenoxazina, colorantes de benzofenotiazina y derivados de los mismos. Más preferiblemente, la molécula efectora óptica con función diagnóstica está seleccionada del grupo que comprende colorantes de polimetina, colorantes de indocarbocianina, colorantes de indodicarbocianina, colorantes de indotricarbocianina, colorantes de merocianina, ftalocianinas, naftalocianinas, colorantes de trifenilmetina, colorantes de croconio, colorantes de esquarilio y derivados de los mismos. Incluso más preferiblemente, la molécula efectora óptica con función diagnóstica está seleccionada del grupo que comprende colorantes de indocarbocianina, indodicarbocianina, indotricarbocianina y derivados de los mismos. Ejemplos son colorantes Cy7, Cy5.5, Cy3, AlexaFluor, verde de indocianina (ICG). Ejemplos de rutas de síntesis que conducen a moléculas efectoras ópticas con función diagnóstica que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están publicadas en "Topics in Applied Chemistry: Infrared absorbing dyes" Ed. M. Matsuoka, Plenum, N.Y. 1990, "Topics in Applied Chemistry: The Chemistry and Application of Dyes", Waring *et al.*, Plenum, N.Y., 1990, *J. Org. Chem.* 60: 2391-2395 (1995), Lipowska *et al.* *Heterocyclic Comm.* 1 : 427-430 (1995),

Fabian *et al.* Chem. Rev. 92: 1197 (1992), documento WO 96/23525, Strekowska *et al.* J. Org. Chem. 57: 4578-4580 (1992), Bioconjugate Chem. 16: 1275-128 (2005), Lee *et al.*, J. Org. Chem. 73: 723 (2008).

Lo más preferiblemente, la molécula efectora óptica con función diagnóstica es un colorante fluorescente que comprende los elementos estructurales de verde de indocianina (ICG) y derivados de los mismos, de acuerdo con la Figura 20. Por ello, los derivados de ICG se describen estructuralmente preferiblemente por

a) reemplazo opcional de una o dos cadenas sulfobutilo en el nitrógeno indol por -alquil C₁₋₆-R², donde R² es -OH, -COOH, -OSO₃H, -OSO₃Na, -NH₂, -N₃, -COOH, -SH, o -C≡C, y/o

b) reemplazo de la cadena polimetina por una cadena polimetina sustituida con un residuo R³ en el átomo de carbono central, con lo cual los dos átomos de carbono adyacentes pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros junto con los tres átomos de carbono de la cadena polimetina, con lo cual R³ está seleccionado del grupo que comprende -alquil C₁₋₆-R², -S-alquil C₁₋₆-R², -O-alquil C₁₋₆-R², -fenil-alquil C₂₋₆-R², -fenil-R², -S-fenil-alquil C₁₋₆-R², -S-fenil-R², -O-fenil-alquil C₁₋₆-R², -O-fenil-R², -fenil-NH-alquil C₁₋₆-R², -fenil-NHR², -S-fenil-NH-alquil C₁₋₆-R², -S-fenil-NHR², -O-fenil-NH-alquil C₁₋₆-R², -O-fenil-NHR², con lo cual R² es como se describe antes y con lo cual 1-2 átomos de carbono del alquilo C₁₋₆ pueden estar reemplazados por un grupo carbonilo, y/o

c) sustitución de los anillos benzoindol exteriores con uno o más grupos R⁴ seleccionados independientemente de -SO₃Na⁺, -COOH o -OH.

Es más preferido que la cadena de polimetina tenga un residuo R³ como se describe antes en el átomo de carbono central, R⁴ es H o representa uno o dos grupos -SO₃Na⁺, donde R² es -COOH o -SO₃Na⁺, y donde los dos átomos de carbono adyacentes pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros junto con los tres átomos de carbono de la cadena de polimetina (Figura 20b).

Un derivado más preferido de ICG se define de acuerdo con la Figura 20c con un residuo R³ que es -S-CH₂-CH₂-COOH, -fenil-COOH, -fenil-CH₂-COOH, -fenil-CH₂CH₂-COOH, -fenil-CH₂CH₂CH₂-COOH, -fenil-NH₂, -fenil-NH(CO)-CH₂CH₂-COOH, -fenil-NH(CO)-CH₂CH₂CH₂-COOH donde la sustitución en el fenilo es en posición para. Una forma de realización adicional representa un derivado con cadena pentametina que porta el residuo R³ en el carbono central (Figura 17d).

El derivado más preferido de ICG representa un derivado que comprende 6 grupos sulfonato junto con un enlazador reactivo de acuerdo con la Figura 20c-d, proporcionando así el mayor carácter hidrófilo basado en grupos sulfonato. Se mostró que el marcado de anticuerpos IgG y Fab fue posible en relaciones de marcado >3 sin afectar la funcionalidad del anticuerpo y sin conducir a precipitación del conjugado. A diferencia de estos resultados, los conjugados con derivados de ICG que comprenden 4 o menos grupos sulfonato son menos estables en solución, conduciendo a precipitación y pérdida de función de los conjugados. Los colorantes de cianina de la invención se usan como efectores conjugados covalentemente con poliglicerol sulfatado de acuerdo con la invención (Ejemplo 3, Figura 5).

En otra forma de realización más al menos una de las moléculas efectoras (E) es un complejo radiomarcado que comprende un radionúclido y una estructura quelante seleccionada de quelatos de tetraazaciclododecano y ácido aminocarboxílicos macrocíclicos o de cadena abierta. Preferiblemente, el complejo radiomarcado comprende un agente quelante seleccionado del grupo que comprende ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''-triacético (DO3A), ácido 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano-N,N',N''-triacético (OTTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido trans(1,2)-ciclohexanodietilentiaramina-pentaacético (CDTPA), ácido N,N,N',N'',N'''-dietilentiaramina-pentaacético (DTPA), ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), ácido N-(2-hidroxi)etilendiamina triacético, ácido nitrilotriacético (NTA), N,N-di(2-hidroxi)etilglicina y derivados de los mismos y un radionúclido seleccionado de ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Ga, ⁵¹Cr, ^{177m}Sn, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁷Tm, ⁹⁷Ru, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁹Au, ²⁰³Pb, ¹⁴¹Ce, ⁸⁶Y, ^{94m}Tc, ^{110m}In, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu. Más preferiblemente, el complejo radiomarcado está seleccionado del grupo que comprende ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''-triacético (DO3A), ácido N,N,N',N'',N'''-dietilentiaramina-pentaacético (DTPA) y un radionúclido seleccionado de ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁶⁴Cu. Incluso más preferiblemente, el complejo radiomarcado está seleccionado del grupo que comprende ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) con un ácido acético modificado a una amida usando una estructura reactiva para conjugación covalente con G (Formula I - III), ácido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano-N,N',N''-triacético (DO3A) con un nitrógeno que porta un resto hidroxietilo sustituido con una estructura reactiva para conjugación covalente con G (Formula I - III), y un radionúclido seleccionado de ¹¹¹In, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁶⁴Cu. Se sobreentiende que los radioisótopos pueden impartir función diagnóstica así como función terapéutica, cuando se selecciona un radioisótopo con radioemisión terapéuticamente activa, tal como radionúclidos que emiten radiación β. La química de complejación es básicamente idéntica y no depende del tipo de radioemisión. En la presente invención, se prefieren radioisótopos que emiten radiación β, preferiblemente, ⁹⁰Y. El radiomarcado para técnicas de imagen y radioterapia es conocido por los expertos; véase también en: Liu *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 60: 1347, 2008; Zwanziger *et al.*, Curr Pharm Des. 14: 2385, 2008; Maecke, Ernst Schering Res Found Workshop. 49: 43, 2005.

Aún en otra forma de realización, al menos una de las moléculas efectoras (E) es un complejo que comprende un metal paramagnético y una estructura complejante seleccionada de quelatos de tetraazaciclododecano y ácidos aminocarboxílicos macrocíclicos o de cadena abierta (Kobayashi *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol.* 5: 539, 2004). La invención describe la capacidad de acoplar hasta 5 complejos de gadolinio a un poliglicerol sulfatado modificado con azida (Ejemplo 5). Tales conjugados de la invención se usan como agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética (IRM), debido al elevado suministro intracelular de Gadolinio en células activadas. Así, el metal paramagnético es preferiblemente Gadolinio (Gd^{3+}), y la estructura complejante está seleccionada del grupo que comprende ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) con un ácido acético modificado a una amida usando una estructura reactiva para conjugación covalente con G (Fórmula I - III), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''-triacético (DO3A) con un nitrógeno que porta un resto hidroxietilo sustituido con una estructura reactiva para conjugación covalente con G (Fórmula I - III).

Aún en otra forma de realización preferida la molécula efectora (E) es una molécula efectora con función terapéutica, que comprende un fotosensibilizador con eficacia fototerapéutica después de excitación en el rango del espectro UV/visible (400-800 nm) o infrarrojo cercano (700-1000 nm) (Ejemplo 6a). Más preferiblemente, el fotosensibilizador está seleccionado del grupo que comprende tetrapirroles, porfirinas, safirinas, clorinas, tetrafenilporfirinas, tetrafenilclorinas, bacterioclorinas, tetrafenilbacterioclorinas, feoforbidas, bacteriofeoforbidas, pirofeoforbidas, bacteriopirofeoforbidas, purpurinimidas, bacteriopurpurinimidas, benzoporfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas y derivados de los mismos. Incluso más preferiblemente, el fotosensibilizador está seleccionado del grupo que comprende feoforbida a, pirofeoforbida a, 3-acetilfeoforbida a, 3-acetilpirofeoforbida a, purpurin-18-N-alquilamida, purpurin-18-N-hidroxilimida, 3-acetilpurpurin-18-N-alquilimida, 3-acetilpurpurin-18-N-hidroxilimida, clorina e6, Sn-clorina e6, m-tetrahidroxifenilclorina (m-THLC) y derivado de benzoporfirina, derivado de benzoporfirina monoácido (BPD-MA, verteporfina). Aún incluso más preferiblemente, el fotosensibilizador está seleccionado del grupo que comprende feoforbida a, pirofeoforbida a, 3-acetilfeoforbida a, 3-acetilpirofeoforbida a, purpurin-18-N-alquilamida, purpurin-18-N-hidroxilimida, 3-acetilpurpurin-18-N-alquilamida, 3-acetilpurpurin-18-N-hidroxilimida y clorina e6, derivado de benzoporfirina, derivado de benzoporfirina monoácido (BPD-MA, verteporfina). Lo más preferiblemente, el fotosensibilizador está seleccionado del grupo que comprende feoforbida a, pirofeoforbida a, purpurin-18-N-alquilamida, purpurin-18-N-hidroxilimida y clorina e6, verteporfina.

Ejemplos de rutas de síntesis que conducen a fotosensibilizadores que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están publicados en los documentos WO 2003/028628, US 2005/0020559, Zheng G *et al.*, *J Med Chem* 2001, 44, 1540-1559; Li G *et al.*, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5349-5359; Lunardi CN *et al.*, *Curr Org Chem* 2005, 9, 813-821; Chen Y *et al.*, *Curr Org Chem* 2004, 8, 1105-1134.

Aun en otra forma de realización preferida opcionalmente al menos una de las moléculas efectoras (E) es una molécula efectora terapéutica de la clase de agentes antineoplásicos tales como agentes antineoplásicos alquilantes y similares a alquilantes, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, melfalan, clorambucilo, alquilsulfonato, busulfán, treosulfán, carmustina, lomustina, nimustina, estramustina, estreptozotocina, procarbazona, dacarbazina, temozolomid, tiotepa, o una molécula efectora terapéutica de la clase de antimetabolitos tales como análogos de purina (6-tioguanina, pentostatina, azatioprina, 6-mercaptopurina, fludarabina, cladribina) o análogos de pirimidina (gemcitabina, 5-fluoracilo) o antifolatos (metotrexato), alcaloides y terpenoides de origen vegetal tales como alcaloides de la vinka (vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina), disorazoles y derivados (disorazol A1, A2, E1, Z), podofilotoxina tal como etopósido y tenipósido, taxanos (docetaxel, paclitaxel), inhibidores de topoisomerasa tales como derivados de camptotecina irinotecán y topotecán, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido, antibióticos antitumorales tales como dactinomicina, doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, bleomicina, mitomicina.

Otra clase de moléculas efectoras terapéuticas son toxinas tales como abrina, toxina alfa, toxina de la difteria, exotoxina, gelonina, proteína antiviral de hierba carmín, ricina, saponina y exotoxina de pseudomonas.

Otra clase de moléculas efectoras terapéuticas son ARN interferente pequeño (ARNip), por ejemplo, VEGF o EGF ARNip. ARNip está preferiblemente conjugado con el enlazador de poliglicerol a través de uniones escindibles, tales como uniones disulfuro (Ejemplo 6e y Ejemplo 20).

Se prefieren las moléculas efectoras terapéuticas paclitaxel y clorambucilo, sus derivados con grupos funcionales adecuados para la formación de uniones covalentes con la macromolécula. Usados de acuerdo con la invención para la síntesis de conjugados son sus derivados precursores que portan grupos reactivos para la conjugación covalente. Grupos preferidos son propargilo, ácido carboxílico, ácido carboxílico-NHS-éster, isotiocianato, maleimida, piridinio-sulfato. Los más preferidos son paclitaxel-succinato-NHS-éster (Fórmula E28 en Tabla 1, Thierry *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 127 : 1626, 2005) y clorambucilo-NHS-éster (Fórmula E25, documento WO96/022303), paclitaxel-succinato-propargilamida (Fórmula E27), clorambucilo-propargilamida (Fórmula E24).

Por ello, de acuerdo con la invención, la molécula efectora (E) está unida al grupo funcional (G) de al menos un enlazador del derivado de poliglicerol sulfatado formando de este modo una unión éter, tioéter, éster carboxílico, sulfoniléster, amida, amina, carbamato, tiocarbamato, urea, tiourea, hidrazona, imina, disulfuro, triazol o vinilo.

Un aspecto particular de la descripción es un compuesto de acuerdo con la fórmula $P(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n(\text{L-G})_m$ donde L es -O-, m es un número > 1, y G representa SO_3^-M^+ , dando así un grupo sulfato. Como se ha descrito antes, los grupos sulfato son una función efectora directa cuando están ensamblados en una pluralidad que permite el efecto de absorberse en células activadas y proliferativas. M es preferiblemente sodio.

5 De acuerdo con la invención, la macromolécula es capaz de transportar las moléculas efectoras unidas covalentemente, como se ha descrito antes, al interior de células activadas y proliferativas. En los ejemplos de la presente invención se muestra que el tipo de molécula efectora puede elegirse sin obstaculizar la eficacia biológica del poliglicerol sulfatado. Es una forma de realización de la invención que el poliglicerol sulfatado esté conjugado con 1 a 100 moléculas efectoras. Sin embargo, el peso molecular total de las moléculas efectoras no supera el peso molecular promedio del poliglicerol sulfatado. Así, en una forma de realización preferida tiene 1-10 moléculas efectoras conjugadas, más preferiblemente 1-5 moléculas efectoras. La relación resultante del peso molecular promedio de poliglicerol sulfatado a peso molecular total de todas las moléculas efectoras acopladas al poliglicerol sulfatado es preferiblemente 3, más preferiblemente 5, incluso más preferiblemente 10.

15 La solubilidad del poliglicerol sulfatado en solución acuosa es alta a > 200 mg/ml. Moléculas efectoras lipófilas, que no son solubles en medio acuoso, se llevan a solución mediante conjugación con el poliglicerol sulfatado. Sorprendentemente, el conjugado con paclitaxel (Ejemplo 6b) exhibe solubilidad en agua > 100 mg/ml. La solubilidad total resultante de conjugados efectoras en agua o en tampones acuosos (intervalo de pH 6,0 a 8,5) es por tanto preferiblemente > 50 mg/ml, y más preferiblemente > 100 mg/ml.

20 Macromoléculas con el ensamblaje de una pluralidad de grupos sulfato, mostrado para poligliceroles sulfatados, se unen al factor de transcripción intracelular NF-kappaB en valores de CI_{50} menores de 10 nM (Ejemplo 11) e inhiben la liberación de TGF- β (Ejemplo 10). Por consiguiente, una forma de realización preferida de la invención son poligliceroles sulfatados así como poligliceroles como conjugados con unión de NF-kappaB es mejor que una CI_{50} de 50 nM, más preferiblemente mejor que 20 nM, lo más preferiblemente mejor que 10 nM en el ensayo de unión descrito en el Ejemplo 11.

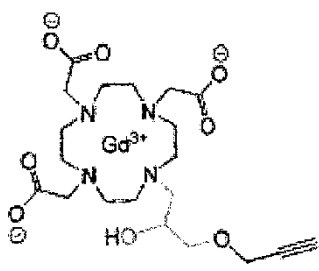
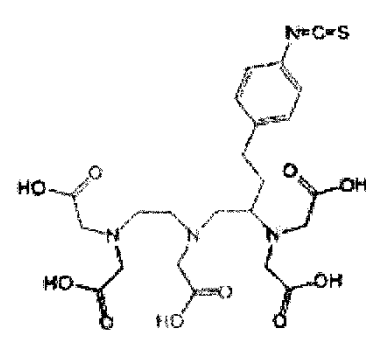
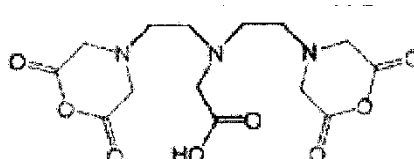
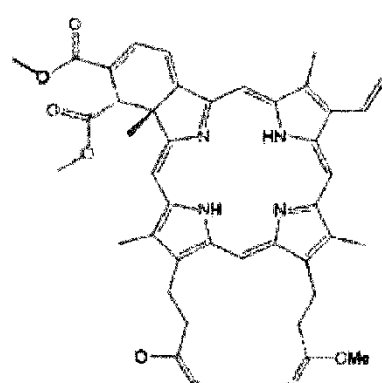
25 Ejemplos preferidos para moléculas efectoras reactivas como precursores para conjugación covalente con macromoléculas, en particular Grupo G (Fórmula I -III) se representan en la Tabla 1:

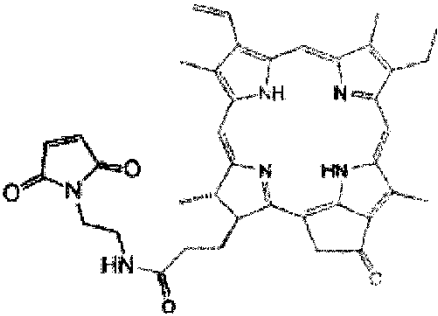
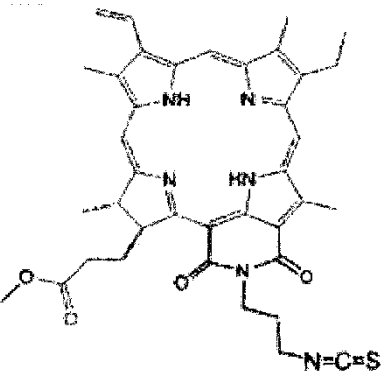
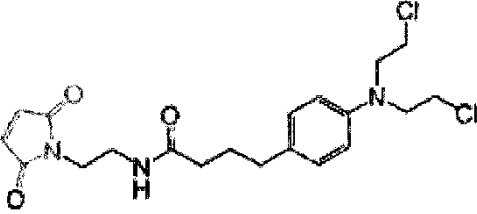
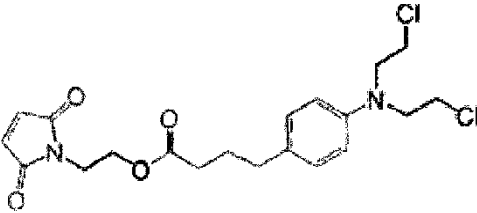
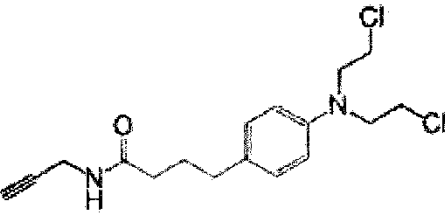
E1	
E2	

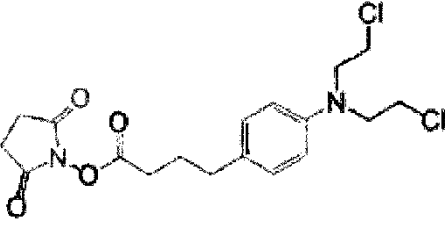
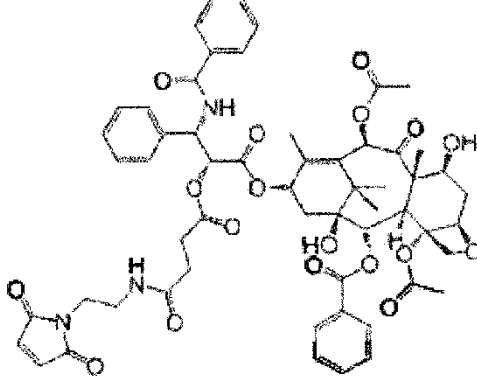
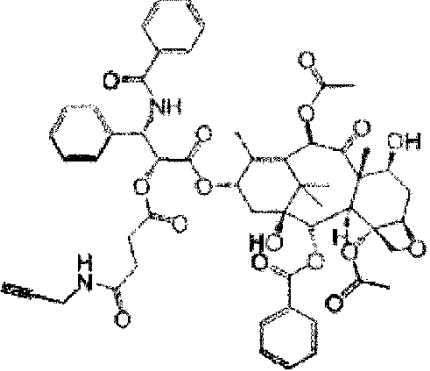
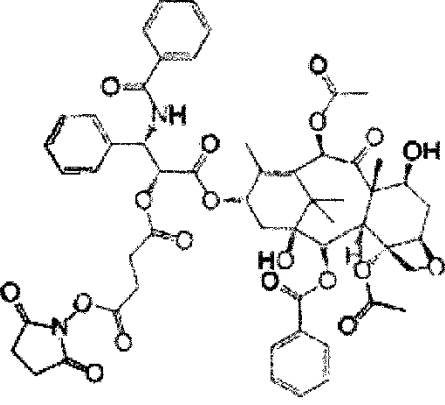
<p>E3</p>	
<p>E4</p>	
<p>E5</p>	
<p>E6</p>	

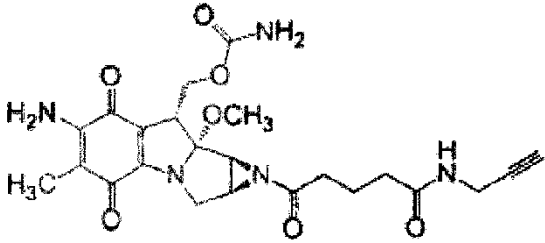
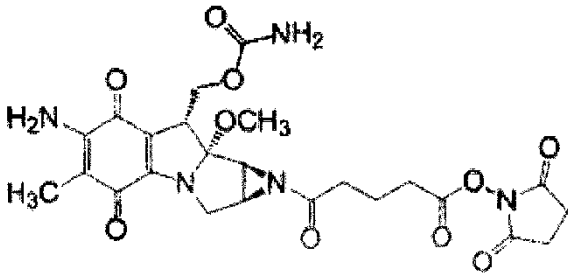
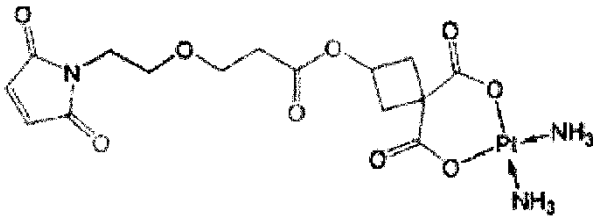
<p>E7</p>	
<p>E8</p>	
<p>E9</p>	
<p>E10</p>	

<p>E11</p>	
<p>E12</p>	
<p>E13</p>	
<p>E14</p>	
<p>E15</p>	

<p>E16</p>	
<p>E17</p>	
<p>E18</p>	
<p>E19</p>	

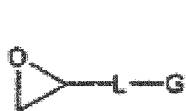
<p>E20</p>	
<p>E21</p>	
<p>E22</p>	
<p>E23</p>	
<p>E24</p>	

<p>E25</p>	
<p>E26</p>	
<p>E27</p>	
<p>E28</p>	

E29	
E30	
E31	
E32	ARNip con enlazador 3'-amino
E33	ARNip con enlazador 3'-piridildisulfuro

La síntesis de poliglicerolos sulfatados es conocida por los expertos en la técnica como se ha descrito antes. La síntesis de derivados enlazadores comprende una o más etapas de síntesis adicionales. Generalmente, los enlazadores se unen covalentemente al núcleo de poliglicerol por reacción con uno o más grupos OH del poliglicerol. La reacción con los grupos OH se lleva a cabo *in situ* durante la reacción de polimerización añadiendo un precursor enlazador electrófilo apropiado a una solución de reacción en una cantidad de 1-50% mol de los monómeros de glicidol. La reacción con los grupos OH se realiza adicionalmente usando un material de poliglicerol aislado, que se desprotona con una base apropiada seguido de adición de un precursor enlazador electrófilo apropiado a la solución de reacción en una cantidad de 1-50% mol de los monómeros de glicidol. Ejemplos de bases apropiadas son hidruro de sodio, metilato de sodio, carbonato de sodio, t-butilato de sodio. La sulfatación se consigue preferiblemente usando complejos de trióxido de azufre (piridinio-SO₃, trimetilamina-SO₃, trietilamina-SO₃, dimetilformamida-SO₃). La sulfatación se lleva a cabo bien en poliglicerol aislado o derivados de poliglicerol-enlazador, o a continuación después de la polimerización en una etapa añadiendo el agente de sulfatación directamente al reactor de polimerización.

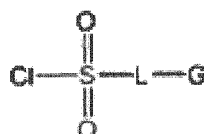
Materiales precursores enlazadores electrófilos adecuados son los de las fórmulas generales (VII) - (XI),



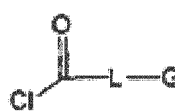
Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX



Fórmula X



Fórmula XI

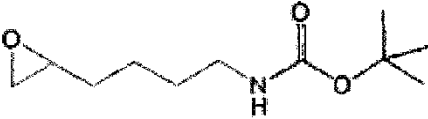
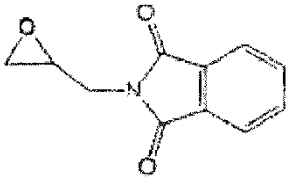
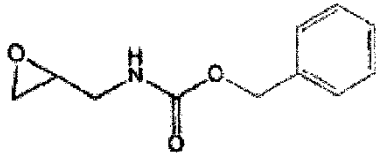
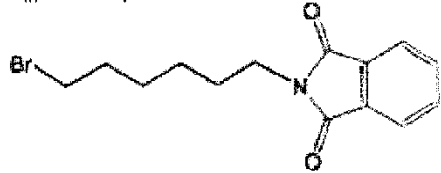
5 donde L es un grupo alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado en el que uno o más (preferiblemente uno a cuatro) grupos metileno no consecutivos pueden estar reemplazados por un grupo seleccionado del grupo que comprende O, S, NH, C(O)NH, C(NH₂⁺)NH, SO₂, SO, arilo eteno o etino, y donde G está seleccionado del grupo que comprende -OH, -OSO₃H, -OSO₃Na, -NH₂, -N₃, -COOH, -SH, -SO₃, -C≡C, estando -OH, -NH₂, -SH, -COOH opcionalmente funcionalizado con grupos protectores conocidos por el experto, y donde Y representa un grupo lábil de una reacción de sustitución nucleófila, tal como Cl, Br, I, tosilato, mesilato, triflato o nosilato, y donde Z representa un grupo lábil seleccionado de Cl, N-hidroxisuccinimidilo, imidazoilo, p-nitrofenilo.


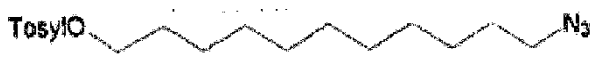
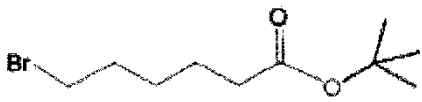

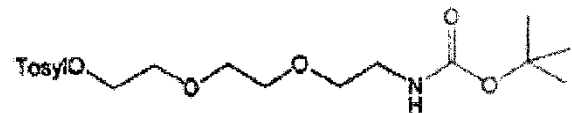
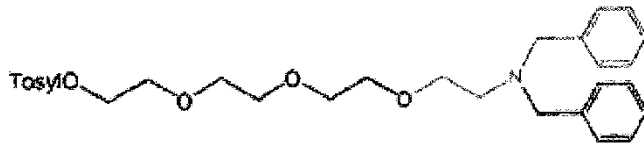
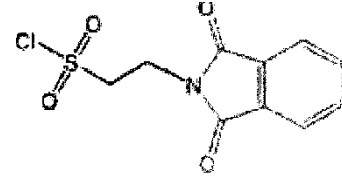
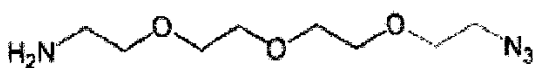
10 Materiales precursores enlazadores electrófilos preferidos son los de fórmula VII, donde L es un grupo alquilo C₁₋₂₀ lineal en el que uno o más (preferiblemente uno a cuatro) grupos metileno no consecutivos pueden estar reemplazados por un grupo O que aporta unidades -CH₂CH₂O- y/o C(O)NH, C(NH₂⁺)NH, C(O), y donde G está seleccionado del grupo que comprende -NH₂, -N₃, -COOH, -SH donde estos grupos están opcionalmente funcionalizados con grupos protectores conocidos por el experto. Estructuras ejemplo de acuerdo con la invención están representadas en las Figuras 4. Se sobreentiende que el enlace covalente de un compuesto de fórmula VII representa la adición de un resto 3-carbono glicerol donde un grupo hidroxilo está reemplazado por la subunidad L-G. Esto da lugar a un poliglicerol donde el enlazador añade un grupo hidroxilo libre adicional a la estructura principal general del polímero cuando reacciona con un grupo hidroxilo mediante apertura del resto reactivo del epóxido. El grupo hidroxilo libre resultante del epóxido abierto se someterá conforme a esto a sulfatación (véase la Figura 4, primera entrada).

15 Precursores enlazadores reactivos preferidos son N-2,3-epoxipropilftalimida, N-Boc-2,3-epoxipropilamina, N-Cbz-2,3-epoxipropilamina.

20 Un enlazador particularmente preferido se obtiene haciendo reaccionar un grupo amino con iminotiolano (reactivo de Traut) proporcionando una unidad enlazadora de -NH-C(NH₂⁺)-CH₂CH₂CH₂SH.

Estructuras químicas de compuestos precursores enlazadores se representan en la Tabla 2:

LP1	
LP2	
LP3	
LP4	

LP5	
LP6	
LP7	
LP8	
LP9	
LP10	
LP11	
LP12	

Los conjugados de acuerdo con la invención pueden proporcionarse, por ejemplo, cuando se usan como medicamentos, en forma de composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los conjugados de la presente invención así como vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 5 Preferiblemente, estas composiciones farmacéuticas tienen una forma de monodosis, tales como comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, granulados, soluciones o suspensiones parenterales estériles. Otras formas de dosificación son conocidas por el experto en la técnica. Otra forma de realización es una formulación sólida de los compuestos de acuerdo con la invención junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos. El vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable puede tener una amplia gama de formas dependiendo de la vía deseada de

aplicación (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal). Vehículos y excipientes adecuados son conocidos en la técnica y pueden seleccionarse por un experto en la técnica. El vehículo incluye excipientes farmacéuticos inertes, como agentes aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes, agentes aromatizantes, edulcorantes, agentes conservantes, agentes colorantes y agentes de revestimiento.

- 5 Una forma de realización particularmente preferida es una forma de dosificación farmacéutica de un liofilizado. Se encontró sorprendentemente que soluciones de poliglicerol sulfatado en medios o tampones acuosos exhiben la tendencia a formar aglomerados o agregados mayores cuando aumenta el tiempo de almacenamiento. Se encontró que una reconstitución inmediata de una solución desde un sólido liofilizado que contiene aditivos farmacéuticamente aceptables no conduce a aglomerados o agregados mayores. La reconstitución tiene lugar antes de la administración.
- 10 Aditivos preferidos son compuestos crioprotectores (crioprotectores o lioprotectores), tales como sacarosa, manosa o trehalosa, que pueden usarse solos, como mezclas, o en combinación con otros agentes aglomerantes, agentes de suspensión, agentes tamponantes, lubricantes, agentes aromatizantes, edulcorante, agentes conservantes, agentes colorantes y agentes de revestimiento. Sacarosa, manosa o trehalosa se usan preferiblemente en una cantidad de 1-100 veces, más preferiblemente 5-20 veces la cantidad del poliglicerol sulfatado y sus conjugados de acuerdo con la invención. Lo más preferido es el uso de trehalosa en una cantidad de 5-20 veces, por ejemplo, 10 mg de fármaco con 100 mg de trehalosa.

El Ejemplo 21 ilustra un curso temporal de fluorescencia de un conjugado de derivado ICG con poliglicerol sulfatado (conjugado P17/E1) en solución acuosa. La disminución de la intensidad de fluorescencia indica el grado en curso de agregación causando de este modo inactivación de la fluorescencia. Se encontró sorprendentemente que una solución recién preparada a partir de la sustancia farmacológica liofilizada usando los aditivos antes descritos, no exhibe agregación en la escala temporal estudiada (aproximadamente 1 hora). Por tanto es una etapa de la invención proponer material liofilizado de macromoléculas sulfatadas, preferiblemente poliglicerol sulfatado, poliglicerol sulfatado con enlazadores, y sus conjugados con moléculas efectoras de acuerdo con la invención.

Un medicamento o composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco o de varios fármacos, es decir, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención. Un experto podrá determinar la cantidad terapéuticamente efectiva basándose en la enfermedad a tratar y considerando el estado del paciente. Un medicamento o una composición farmacéutica pueden contener adecuadamente entre aproximadamente 5 y 1000 mg, preferiblemente aproximadamente 10 a 500 mg de un compuesto de acuerdo con la presente invención.

La vía de administración de los compuestos de acuerdo con la invención es preferiblemente parenteral, incluyendo subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, intramuscular, intratumoral. La más preferida es la vía de administración intravenosa y subcutánea. Se encontró sorprendentemente que una dosificación diaria repetida (subcutánea) de hasta 30 días en diferentes modelos animales de enfermedad (Ejemplos 13, 14, 15) no condujo a observaciones de toxicidad y no causó efectos adversos en el intervalo de tiempo del tratamiento. Así, la invención comprende el uso de poliglicerol sulfatado y conjugados de poliglicerol sulfatado con moléculas efectoras para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, inflamación, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis con múltiples dosificaciones de compuestos. Múltiples dosificaciones significa tratamientos que usan más de una dosificación, incluyendo tratamiento diario, tratamiento cada 2 hasta 7 días, tratamiento más de una vez al día o intervalos de tiempo tales como tratamiento en intervalos de cinco días. Más específicamente, la invención comprende el tratamiento múltiple de pacientes con una dosis subcutánea de 10 mg/kg hasta 1000 mg/kg, preferiblemente 20 mg/kg a 500 mg/kg, lo más preferiblemente 50 mg/kg a 200 mg/kg de peso corporal. La invención comprende además el tratamiento múltiple de pacientes con una dosis intravenosa de 1 mg/kg hasta 200 mg/kg, preferiblemente 10 mg/kg a 100 mg/kg, lo más preferiblemente 20 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal.

Ejemplos:

45 **Ejemplo 1:** Generación de macromoléculas multivalentes polianiónicas para el direccionamiento intracelular de proliferación y síntesis de proteínas mediante la síntesis de poligliceroles sulfatados

Ejemplo 1a: Generación de núcleos de poliglicerol dendrítico mediante polimerización aniónica de glicidol: Se obtienen poligliceroles dendríticos y caracterizados de acuerdo con Bioconjugate Chemistry 15, 2004, 162-167; Advanced Materials 12, 2000, 235-239; Macromolecules 32, 1999, 4240. Se obtienen una diversidad de materiales poliméricos de diferentes pesos moleculares de diferentes moléculas iniciadoras (1,1,1-tris(hidroximetil)propano (TMP), 1,1,1-tris(hidroximetil)etano (TME) y penteritrol (PE)) y se aplican a reacciones de sulfatación.

Ejemplo 1b:

Síntesis de poligliceroles altamente sulfatados: se sintetizan poligliceroles sulfatados basándose en la descripción experimental de Bioconjugate Chemistry 15, 2004, 162-167. Para conseguir altos grados de sulfatación, se modifica el procedimiento publicado. Se añade complejo de SO₃/piridina en un exceso molar de 1,2 veces a 90°C, y se continúa agitando a 90°C durante 18 h. La purificación se consigue por diálisis y ultrafiltración (corte de PM 2000). El grado de sulfatación se determina por análisis elemental. Todos los compuestos se obtienen como sales de sodio (Tabla 3).

5 No puede ajustarse un grado deseado de sulfatación con el uso de una relación molar definida del reaccionante de sulfatación en la mezcla de reacción, puesto que su reactividad depende de la naturaleza, pureza y origen de los reaccionantes y materiales de partida usados. Sin embargo, con exceso de reaccionante de sulfatación, se garantiza un grado de sulfatación superior al 90%, aunque menos reaccionante de sulfatación, preferiblemente 0,6 a 1 equivalentes molares, permite recibir productos en el entorno de 50 a 90% de sulfatación.

Tabla 3: Poliglicerol sulfatado obtenido en el Ejemplo 1b:

Comp. nº	Molécula iniciadora	Peso molecular medio (Mn) del núcleo de PG (g/mol)	Grado de sulfatación (%)	Peso molecular medio (Mn) del poliglicerol sulfatado (g/mol)
P1	PE	2600	88	5750
P2	PE	2600	91	5860
P3	PE	6000	92	13600
P4	PE	7000	92	15880
P5	PE	7500	82,5	16030
P6	PE	7500	86	16390
P7	PE	7500	92	16920
P8	PE	10500	92	23820
P9	TMP	3000	88	6640
P10	TMP	6000	85	13030
P11	TMP	6000	91	13530
P12	TMP	7500	89	16700
P13	TMP	7500	94	17220

Ejemplo 1c:

10 Procedimiento general para la síntesis de poligliceroles sulfatados como procedimiento en “una etapa”. La reacción se lleva a cabo en un reactor equipado con agitador mecánico. Todo el aparato se seca bajo vacío y se llena con argón secado. El procedimiento de secado se repite 4 veces. Se agita glicidol aplicado de Acros (pureza > 96%) sobre CaH₂ durante la noche y se destila a 45°C y 1 mbar. La fracción 1 (5% de la cantidad de glicidol usada) consiste en di-
 15 /trímeros. La fracción 2 es el glicidol puro deseado. El glicidol destilado se mantiene en el frigorífico y solo se abre en condiciones secas. Se añade TMP (2,68 g, 20 mmol) al reactor y se funde a 60°C a vacío. Bajo atmósfera de argón, se añade KOtBu (1 M en THF, 6 ml) y el precipitado se disuelve por adición de NMP. La mezcla se calienta hasta
 20 120°C y se agita durante 2 horas para eliminar el t-butil alcohol. Se disuelve glicidol (100 g, 1,35 mol) en 225 ml de THF (relación 1:2,5) y se añade con una bomba dosificadora durante 18 horas. La mezcla se enfría hasta 90°C y se diluye con 200 ml de DMF seco. Se añade complejo de piridina-SO₃ (215 g, 1,35 mol) como sólido y se añaden otros
 25 50 ml de DMF seco. Después de agitar durante 24 horas, se añaden 350 ml de agua a la mezcla de reacción en un matraz separado, y la mezcla se neutraliza con NaOH 2M hasta un pH de aproximadamente 9-10. Después de evaporar hasta sequedad, el sólido cristalino se agita sobre dietil éter para eliminar el NMP. La purificación se consigue por ultrafiltración (agua, membrana de celulosa reg.; MWCO 1000). Después de evaporar y secar a alto vacío, el producto se obtiene como un sólido amorfo amarillo pálido.

25 **Ejemplo 2:** Generación de moléculas vehículo macromoleculares polianiónicas para el direccionamiento intracelular de proliferación y síntesis de proteínas mediante la síntesis de poligliceroles sulfatados con enlazadores para conjugación covalente de moléculas efectoras.

Ejemplo 2a:

Procedimiento general para la síntesis de núcleos de políglicerol dendríticos con unidades enlazadoras funcionalizadas adicionales unidas en el curso de la reacción de polimerización: Se lleva a cabo una síntesis de polimerización modificada basada en la síntesis publicada en *Bioconjugate Chemistry* 15, 2004, 162-167. Después de finalizar la adición de la especie enlazadora reactiva que se une a los grupos hidroxilo desprotonados a una temperatura 60-100°C. El enlazador se añadió a 1-50% mol respecto al glicidol y se continúa la reacción durante 2-24 horas. El polímero bruto se obtiene por precipitación repetida en metanol/acetona y se seca a alto vacío a 50-80°C durante 24 h. Este material se usa en la reacción de sulfatación.

Ejemplo 2b:

Procedimiento general para la unión de un enlazador a través de una unión éter mediante una segunda etapa de síntesis usando un material políglicerol aislado que conduce a compuestos ejemplo P14 a P25: Se purifican por diálisis (agua, MWCO 3000) polígliceroles dendríticos obtenidos en el Ejemplo 1a, se evaporan a vacío y se secan a alto vacío (0,05 mbar) durante 24 h a 60°C. Se disuelve 1 g de políglicerol en DMF seco (20 ml) a 60°C y se trata con hidruro de sodio (2,5 equivalentes molares por OH a derivatizarse con enlazador), seguido de agitación a 80°C durante 18 h. A continuación, se añade a 80°C una solución de una cantidad molar igual de enlazador que contiene grupos lábiles bromuro o tosilato o grupos reactivos epóxido (Tabla 2) en DMF y la solución se agita durante otras 18 horas. El producto se inactiva mediante adición de metanol, precipita con acetona, se seca a vacío y se dializa en metanol (MWCO 1000) durante 2 días, seguido de secado a alto vacío a 60 °C.

Ejemplo 2c:

Procedimiento general para la unión de un enlazador a través de una unión carbamato mediante una segunda etapa de síntesis usando un material políglicerol aislado que conduce a compuestos ejemplo P26 a P27: Se purifican por diálisis (agua, MWCO 3000) polígliceroles dendríticos obtenidos en el Ejemplo 1a, se evaporan a vacío y se secan a alto vacío (0,05 mbar) durante 24 h a 60°C. Se disuelve 1 g de políglicerol en DMF seco (20 ml). A esta solución se añade carbonildiimidazol (CDI; 5 equivalentes molares por OH a derivatizarse con enlazador), y la solución se agita durante 24 h. A continuación, se añade acetona para precipitar el políglicerol activado. El residuo se disuelve en 15 ml de DMF y se añade una solución de LP12 (1,5 equivalentes por OH; 12 eq. totales; véase la Tabla 2) en DMF y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante otras 18 horas. El producto se precipita con acetona, se seca a vacío y se dializa en metanol (MWCO 2000) durante 2 días, seguido de secado a alto vacío a 60°C.

Ejemplo 2d:

Síntesis de polígliceroles sulfatados con enlazadores mediante sulfatación de compuestos del Ejemplo 2a-c: La reacción se lleva a cabo de acuerdo con *Bioconjugate Chemistry* 15, 2004, 162-167 y el Ejemplo 1b. La purificación se consigue por diálisis y ultrafiltración. El grado de sulfatación se determina por análisis elemental. Todos los compuestos se obtienen como sales de sodio (Tabla 4).

Tabla 4: Sulfatos de políglicerol P14-P27 con enlazadores obtenidos en el Ejemplo 2a-d (antes de la retirada de los grupos protectores), y P28 obtenido en el Ejemplo 2e:

Comp. n°	Molécula iniciadora	Peso molecular medio (Mn) del núcleo de PG (g/mol)	Grado de sulfatación (%)	Molécula enlazadora	Grado de sustitución del enlazador (%)	Peso molecular medio (Mn) del sulfato de políglicerol con enlazador (g/mol)
P14	PE	7500	74	LP2	3	15770
P15	PE	7500	91	LP4	3	17600
P16	PE	10500	86	LP9	7	25250
P17	PE	6000	92	LP6	3	13800
P18	TMP	7000	86	LP4	5	16380
P19	TMP	10000	72	LP4	20	26110
P20	TMP	5500	83	LP3	10	12780

Comp. n°	Molécula iniciadora	Peso molecular medio (Mn) del núcleo de PG (g/mol)	Grado de sulfatación (%)	Molécula enlazadora	Grado de sustitución del enlazador (%)	Peso molecular medio (Mn) del sulfato de poliglicerol con enlazador (g/mol)
P21	TMP	7500	78	LP3	12	17180
P22	TME	3000	92	LP1	5	7220
P23	TME	3000	75	LP2	15	7340
P24	TME	2500	85	LP3	5	5840
P25	TME	2500	80	LP3	10	6080
P26	PE	6000	80	LP12	8	14200
P27	PE	6000	75	LP12	15	15160
P28	TMP	5500	88	LP2	5	13000

Pueden aplicarse los siguientes procedimientos para retirar grupos protectores, pero no están limitados a los mismos, grupos amino protegidos con Boc, ^tbutiléster, grupo hidroxilo protegido por ^tbutilo, grupo hidroxilo protegido por THP: se disuelven 100 mg de polímero en 5 ml de ácido trifluoroacético/agua (1:2) y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a vacío, el residuo se trata repetidamente con diclorometano y se evapora. A continuación se añaden 5 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 8 mediante la adición de solución 1M de NaOH. La purificación del producto final se consigue por ultrafiltración en agua destilada.

Grupos amino protegidos con ftalimido: se disuelven 100 mg de polímero en 5 ml de metanol/agua (1:1) y a esta solución se añade hidrazina monohidratada (1 ml). La solución se agita durante 4 h a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a vacío, el residuo se trata repetidamente con diclorometano y se evapora. A continuación se añaden 5 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 8 mediante la adición de solución 1M de NaOH. La purificación del producto final se consigue por ultrafiltración en agua.

En el Ejemplo 2e se describe un segundo método para desproteger el grupo ftalimido usando borohidruro de sodio y ácido acético.

Grupos amino protegidos con carbobenciloxi (Cbz), grupos amino protegidos con bencilo y dibencilo, bencil ésteres: se disuelven 100 mg de polímero en 10 ml de metanol/agua (9:1) y a esta solución 10 mg de catalizador de Pd al 10%/C. La solución se agita durante 24 horas bajo hidrógeno a 3 mbar. La mezcla se filtra a través de Celite, se elimina el disolvente a vacío, el residuo se trata repetidamente con diclorometano y se evapora. A continuación se añaden 5 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 8 mediante adición de solución 1M de NaOH. La purificación del producto final se consigue por ultrafiltración en agua destilada.

Reducción de grupos azido a grupos amino: se disuelven 100 mg de polímero en 20 ml de THF/agua (1:1) y a esta solución se añaden 5 mol-eq de trifenilfosfina por grupo azido. La solución se agita durante 48 horas bajo argón a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a vacío, el residuo se resuspende en agua y el precipitado se separa por filtración y descarta. La solución acuosa se somete a por ultrafiltración en agua destilada.

25 Ejemplo 2e:

Procedimiento para la síntesis de poligliceroles sulfatados con enlazador como un procedimiento en "una etapa" usando como precursor enlazador derivado de N-(2,3-epoxipropil)ftalimida (LP2): La reacción se lleva a cabo en un equipo con agitador mecánico. Se seca todo el aparato bajo vacío y se llena con argón seco. El procedimiento de secado se repite 4 veces. El glicidol aplicado de Acros (pureza >96%) se agita sobre CaH₂ durante la noche y se destila a 45°C y 1 mbar. La fracción 1 (5% de cantidad de glicidol usada) consiste en di-/trímeros. La fracción 2 es el glicidol puro deseado. El glicidol destilado se mantiene en el frigorífico y solo se abre en condiciones secas. Se añade TMP (2,68 g, 20 mmol) al reactor y se funde a 60°C a vacío. Bajo atmósfera de argón, se añade KOtBu (1 M en THF, 6 ml) y el precipitado se disuelve por adición de NMP. La mezcla se calienta hasta 120°C y se agita durante 2 horas para eliminar el t-butil alcohol. Se disuelve glicidol (100 g, 1,35 mol) en 225 ml de THF (relación 1:2,5) y se añade con una bomba dosificadora durante 18 horas. Se disuelve N-(2,3-epoxipropil)ftalimida (27,4 g, 135 mmol) en 55 ml de THF seco calentando, se añade con una jeringa durante 70 minutos y se agita durante una noche. La mezcla se enfría hasta 90°C y se diluye con 200 ml de DMF seco. Se añade complejo de piridina-SO₃ (215 g, 1,35 mol) como sólido y

se añaden otros 50 ml de DMF seco. Después de agitar durante 24 horas, se añaden 350 ml de agua a la mezcla de reacción en un matraz separado, y la mezcla se neutraliza con NaOH 2M hasta un pH de aproximadamente 9-10. Después de evaporar hasta sequedad, el sólido cristalino se agita sobre dietil éter para eliminar el NMP. La purificación se consigue por ultrafiltración (agua, membrana de celulosa reg.; MWCO 1000). Después de evaporar y secar a alto vacío, el producto se obtiene como un sólido amorfo amarillo pálido.

Para el compuesto de ejemplo P28 el análisis de GPC (eluyente: agua, patrones: pululano) de una muestra extraída antes de la adición del complejo de piridina-SO₃ da un M_n de 5500 g/mol y un índice de polidispersidad de 1,4. MALDI-TOF permite determinar muestras de 4-5 enlazadores de ftalimido como promedio. La sulfatación proporciona un grado de 88%. La desprotección se consigue tratando 10 g (aproximadamente 13000 g/mol) de intermedio sulfatado con borohidruro de sodio (1,5 g) en 25 ml de agua durante 5 horas a temperatura ambiente. A esta mezcla se añade ácido acético (5 ml) seguido de agitación a 80°C durante 3 h. La purificación se consigue por ultrafiltración (NaCl sat., luego agua destilada, membrana de celulosa reg.: MWCO 2000) proporcionando 8 g del aminopoliglicerol sulfatado como un sólido amorfo blanco.

Ejemplo 3: Síntesis de conjugados de poliglicerol sulfatado con moléculas efectoras de diagnóstico (E) de la clase de colorantes de cianina

Ejemplo 3a:

Generación de conjugado de colorante de cianina por reacción de un colorante de isotiocianato cianina (E3) con poliglicerol sulfatado modificado con amino P14: se desprotegen 200 mg de P14 con hidrazina de acuerdo con el Ejemplo 2d proporcionando 160 mg de material después de diálisis. Estos 160 mg de polímero P14 se disuelven en 1 ml de tampón acetato de sodio (100 mM) y se tratan con colorante de isotiocianato cianina E3 (3 eq) durante 24 h a 40°C. El producto se purifica separando colorante sin reaccionar por ultrafiltración (celulosa reg., MWCO 3000) en agua, seguido de liofilización. Producto: 140 mg de un sólido amorfo verde (véase la Figura 5).

Ejemplo 3b:

Generación de conjugado de colorante de cianina por reacción de un colorante de propargil cianina (E2) con poliglicerol sulfatado modificado con azido P26: se disuelven polímero P26 (30 mg) y colorante E2 (5,5 mg) en una mezcla de 0,6 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH7,4) y 0,2 ml de metanol. A esta mezcla se añaden 0,1 ml de una solución de CuSO₄.pentahidratado (12 mg/ml en PBS) y 0,1 ml de ascorbato de sodio (3,8 mg/ml en PBS). La solución se incuba bajo agitación vigorosa a 40°C durante 5 días bajo protección de la luz. La purificación se consigue por ultrafiltración (celulosa reg., MWCO 4000-6000) en agua destilada, seguido de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-50). La liofilización proporcionó un sólido verde (19 mg). (véase la Figura 5).

Ejemplo 3c:

Generación de conjugado de colorante de cianina por reacción de un colorante de propargil cianina E5 (Sisson *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 48: 7540-7545, 2009) con poliglicerol sulfatado modificado con azido P17: Se disuelven polímero P17 (30 mg) y colorante E5 (5 mg) en una mezcla de 0,4 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH7,4) y 0,4 ml de etanol. A esta mezcla se añaden 0,1 ml de una solución de CuSO₄.pentahidratado (12 mg/ml en PBS) y 0,1 ml de ascorbato de sodio (3,8 mg/ml en PBS). La solución se incuba bajo agitación vigorosa a 40°C durante 5 días bajo protección de la luz. La purificación se consigue por una combinación de ultrafiltración (celulosa reg., MWCO 4000-6000) en metanol y HPLC prep. (RP18, agua) proporcionando el producto como el pico que eluye inmediatamente. La liofilización proporcionó 18 mg de conjugado de indocarbocianina (ICC) (liofilizado color rojo púrpura). (véase la Figura 5).

El procedimiento de reacción del Ejemplo 3b y 3c puede aplicarse seguidamente a la preparación de los conjugados basados en combinaciones de polímero/colorante tales como P17/E1, P17/E2, P26/E1, P26/E5, P27/E1, P27 E2, P27/E5.

Ejemplo 3d:

Generación de conjugado de colorante de cianina por reacción de un colorante de cianina-NHS-éster E7 con poliglicerol sulfatado modificado con amino P28: se disuelven 200 mg de P28 en una mezcla de DMF/agua de 9:1 (2 ml). A esta mezcla se añaden 86 mg de colorante de NHS-éster E7 (4 mol-eq.) seguido de 48 horas de agitación a temperatura ambiente. Después de evaporar hasta sequedad, se consiguió la purificación del residuo sólido como se describe en el Ejemplo 3c. La liofilización proporcionó 185 mg de conjugado de indocarbocianina (liofilizado azul).

El procedimiento de reacción del Ejemplo 3d puede aplicarse seguidamente a la preparación de los conjugados de P28 con colorante E8 y otras moléculas efectoras de diagnóstico y terapéuticas ésteres NHS (véase también el Ejemplo 4b).

Ejemplo 3e:

Síntesis de colorantes de cianina usados en los ejemplos 3a-d: Se sintetiza el colorante de propargil cianina (E1) con

modificación de Lee *et al.*, J. Org. Chem. 73 : 723 (2008) que describe la derivatización de IR-820 mediante reacción de Suzuki usando precursores de ácido fenilborónico. En la presente invención, se hizo reaccionar IR-820 con ácido 4-carboxietilfenilborónico dando el respectivo producto acoplado de Suzuki. La conversión a E1 se consiguió con propargilamina y HBTU usando un procedimiento conocido de formación de amida. De acuerdo con este procedimiento, se obtienen nuevos análogos de IR-820 con una mayor sustitución de los anillos aromáticos con grupos sulfonato, seguido por acoplamiento de Suzuki y amidación con propargil amina (véase E2-E4 en la Tabla 1).

Para este propósito, se preparó 1-(4-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetilbenzindoleninio-5,7-disulfonato, sal disódica y 1-(4-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetilbenzindoleninio-6-sulfonato, sal sódica de acuerdo con los métodos publicados, seguido de conversión en análogos IR-820 usando monohidrócloruro de N-[(3-(anilino metileno)-2-cloro-1-ciclohexeno-1-il)metileno]anilina (Salon *et al.*, J. Heterocycl. Chem. 42: 959 (2005)).

Ejemplo 3f:

Síntesis de conjugado de colorante de cianina E1 con dendrón glicerol sulfatado: La síntesis proporciona un conjugado de colorante con un dendron definido que comprende 16 grupos sulfato. Se hizo reaccionar E1 con [G3.0]-azida (compuesto 14 en Wyszogrodzka *et al.*, Chemistry 14: 9292 (2008)) como se describe en el Ejemplo 3b. La desprotección de los acetales se consigue como se describe por Wyszogrodzka *et al.*, seguido de sulfatación de acuerdo con el Ejemplo 2d. El análisis HPLC proporciona el conjugado con un rendimiento de 25%.

Ejemplo 4: Síntesis de conjugados de poliglicerol sulfatado con moléculas efectoras de diagnóstico (E) de la clase de quelatos / agentes complejantes para radiomarcado

Ejemplo 4a:

Generación del conjugado de poliglicerol quelante por reacción de propargilo-DOTA (E13) con poliglicerol sulfatado modificado con azido P17: Se disuelven polímero P17 (30 mg) y propargilo-DOTA E13 (3 mg) en una mezcla de 0,4 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH7,4) y 0,4 ml de etanol. A esta mezcla se añaden 0,1 ml de una solución de CuSO₄.pentahidratado (12 mg/ml en PBS) y 0,1 ml de ascorbato de sodio (3,8 mg/ml en PBS). La solución se incuba bajo agitación vigorosa a 40°C durante 5 días bajo protección de la luz. La purificación se consigue por una ultrafiltración (celulosa reg., MWCO 4000-6000) en agua proporcionando 20 mg de conjugado como sólido blanco (Figura 6).

Ejemplo 4b:

Generación del conjugado de poliglicerol quelante por reacción de propargilo-DO3A (E14) con poliglicerol sulfatado modificado con azido P17: La reacción se lleva a cabo como se describe para el Ejemplo 4a.

Además, pueden obtenerse conjugados de quelante DOTA por reacción de poliglicerol sulfatado modificado con amino con DOTA-NHS éster de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 3d, tal como usando P28 y E12.

Ejemplo 5: Síntesis de conjugados de poliglicerol sulfatado con moléculas efectoras de diagnóstico (E) de la clase de complejos de Gd³⁺ para Imagen por Resonancia Magnética (MRI).

Ejemplo 5a:

Generación del conjugado de poliglicerol con complejo de gadolinio por reacción de derivado de propargilo-Gd³⁺-DO3A (E16) con sulfato de poliglicerol modificado con azido P27. Se requiere un alto número de grupos azido (15%) para proporcionar una alta relación efector/polímero. Se disuelven polímero P27 (50 mg) y complejo E16 (36 mg) en una mezcla de 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH8,5) y 0,4 ml de metanol. A esta mezcla se añaden 0,2 ml de una solución de CuSO₄.pentahidratado (12 mg/ml en PBS) y 0,2 ml de ascorbato de sodio (3,8 mg/ml en PBS). La solución se mantiene bajo agitación vigorosa a 25°C durante 3 días. La purificación se consigue por una ultrafiltración (celulosa reg., MWCO 4000-6000) en agua proporcionando 52 mg de conjugado como un sólido blanco. El análisis de metales por ICP-MS proporciona un contenido en gadolinio de 5 moles de complejo de gadolinio por mol de polímero (Figura 6).

Ejemplo 6: Síntesis de conjugados de poliglicerol sulfatado con moléculas efectoras terapéuticas (E) de la clase de fotosensibilizadores, citostáticos o ARNip.

Ejemplo 6a:

Generación de conjugado de fotosensibilizador por reacción de un fotosensibilizador de maleimido (E20) con poliglicerol sulfatado modificado con tiol: Se consigue la modificación con tiol del poliglicerol sulfatado usando el polímero P16. Se agitan 50 mg de polímero P16 en 1 ml de agua/ácido trifluoroacético durante 2 h y luego se precipita con etanol, seguido de secado a alto vacío. Este material se disuelve en 0,5 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) y se trata con 10 mol-eq. de 2-iminotiolano durante 1 hora a temperatura ambiente. A esta mezcla se añaden 0,67 ml (10 mol-eq.) de una solución de maleimido-pirofeoforbida (E16) en DMF (conc. 20 mg/ml). La mezcla de reacción se agita vigorosamente a 45°C durante 24 h. El producto se aísla evaporando la mezcla, y lavando/centrifugando el residuo varias veces con diclorometano. La purificación final se consigue por HPLC prep. (RP18, agua/metanol)

proporcionando 20 mg de conjugado (Figura 7).

Ejemplo 6b:

5 Generación de conjugado de clorambucilo por reacción de un clorambucilo-N-hidroxisuccinimidil éster (E25) con poliglicerol sulfatado modificado con amino: Se desprotegen 200 mg de P14 con borohidruro de sodio / ácido acético de acuerdo con el Ejemplo 2e proporcionando 160 mg de material después de diálisis. Estos 160 mg de polímero P14 se disolvieron en 1 ml de una mezcla (9:1) de DMF y tampón fosfato 50 mM (pH8,0). A esta mezcla se añaden E25 (15 eq.) seguido de agitación vigorosa durante 24 h a 40°C. El producto se aísla evaporando la mezcla, y lavando/centrifugando el residuo varias veces con diclorometano. Señales aromáticas en la RMN de ¹H revelan conjugación de aproximadamente 1,8 moléculas de clorambucilo por polímero como media (Figura 7).

10 De forma similar, la reacción con paclitaxel succinato NHS éster (E28) da 1,2 moléculas de paclitaxel por polímero como media.

Ejemplo 6c:

15 Generación de conjugado de paclitaxel por reacción de maleimido paclitaxel (E26) poliglicerol sulfatado modificado con tiol: La modificación con tiol del poliglicerol sulfatado usando 2-iminotiolano se consigue como se describe en el Ejemplo 6a. A una solución de poliglicerol sulfatado modificado con tiol (50 mg/ml) se añaden 10 mol-eq. de maleimido paclitaxel (E20; solución de 10 mg/ml en DMF). La mezcla de reacción se agita vigorosamente a 25°C durante 24 h. El producto se aísla evaporando la mezcla, y lavando/centrifugando el residuo varias veces con diclorometano. Señales aromáticas en la RMN de ¹H revelan conjugación de aproximadamente 2 moléculas de paclitaxel por polímero como media (Figura 7). De igual modo, la reacción con clorambucilo maleimidadas (E22 o E23) da 2,2 moléculas de clorambucilo por polímero como media. Además, pueden obtenerse conjugados de paclitaxel por reacción de poliglicerol sulfatado modificado con amino con paclitaxel-NHS éster de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 3d usando P28 y E28, dando conjugados de 1 molécula de paclitaxel por polímero como media.

Ejemplo 6d:

25 Generación de conjugado con complejo de diamina platino(II) (análogo de carboplatino) por reacción de derivado enlazador de maleimido (E31) y poliglicerol sulfatado modificado con tiol: La modificación con tiol del poliglicerol sulfatado usando 2-iminotiolato se consigue como se describe en el Ejemplo 6a. Se sintetiza carboplatino maleimida (E31) de acuerdo con Warnecke *et al.* Bioconjugate Chem. 2004, 15(6), 1348-1359. A una solución de poliglicerol sulfatado modificado con tiol (50 mg/ml) se añaden 15 mol-eq. de E31 (solución de 20 mg/ml en etanol), la mezcla de reacción se agita vigorosamente a 25°C durante 24 h. El producto se aísla evaporando la mezcla, y lavando/centrifugando el residuo varias veces con diclorometano y n-butanol. El contenido en platino se determina por ICP-MS (relación metal a polímero 2:1).

Ejemplo 6e:

Síntesis de conjugados de poliglicerol sulfatado con ARNip.

35 Se obtuvo ARNip de VEGF de acuerdo con J. Contr. Release 2006, 116, 123-129. Cadena codificante: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUCdTdT-3' cadena no codificante: 5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCCdTdT-3'-hexilaminom (E32).

40 La activación se consigue usando SPDP que proporciona un grupo 2-piridildisulfuro (J. Contr. Release 2006, 116, 123-129) proporcionando efector E33 para reacción con poliglicerol sulfatado modificado con tiol, permitiendo la conjugación covalente por reacción de intercambio de sulfhidrilo. La modificación con tiol del poliglicerol sulfatado modificado con amino se consigue usando polímero P16 de acuerdo con el Ejemplo 6a. Se agitaron 10 mg de polímero P16 en 100 µl de agua/ácido trifluoroacético durante 2 h y luego se precipitó con etanol, seguido de secado a alto vacío. Este material se disuelve en 200 µl de tampón HEPES 10 mM (pH 8,0) y se trata con 5 mol-eq. de 2-iminotiolano durante 1 hora a temperatura ambiente. A esta solución se añade ARNip de VEGF (1,2 mol-eq.) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 2 h a 40°C. Se hace pasar esta mezcla a través de una columna NAP10 usando tampón HEPES (pH8,0) y luego se usa directamente en experimentos de cultivos celulares (Figura 7).

45 **Ejemplo 7:** Incubación en células A549 de tumor de pulmón humano con poligliceroles fluorescentes de diferentes pesos moleculares e imagen por fluorescencia *in vitro*

50 La línea de células de cáncer de pulmón humano epiteliales se propagó rutinariamente como sigue: se añadió medio DEMEM, con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 2%, y penicilina/estreptomina (todas de PAN Biotech). Se sembraron las células en el medio a 1 x 10⁵ células/ml, se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂, y se dividieron 1:5 dos veces a la semana. Para la imagen por fluorescencia *in vitro* las células se sembraron a 2 x 10⁵ células/ml en placas de cultivo de 24 pocillos en cubreobjetos de vidrio (Sigma), y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. A continuación, las células se cultivaron con medio que contenía poligliceroles 10⁻⁶M con diferentes pesos moleculares conjugados con propargil éster de indocarbocianina (ICC) (compuesto E5) o conjugado de ICC-triglicerol 10⁻⁶ M (Angew Chem Int Ed Engl. 48: 7540, 2009) como control durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se fijaron con acetona fría.

55

Se usó 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abeam) para la contratinción nuclear. La adquisición de imágenes se realizó usando un microscopio Leica DMRB (Leica). Las imágenes se tomaron con una cámara digital (Spot 32, Diagnostic Instruments).

- 5 No hubo absorción celular de poligliceroles con menor peso molecular (hasta 20 kDa) o conjugado de ICC-triglicerol. La localización intracelular de poligliceroles con alto peso molecular (120 o 208 kDa) se demostró claramente. Los resultados se ilustran en la Figura 8.

Ejemplo 8: Incubación de células A549 de tumor de pulmón humano con macromoléculas polianiónicas fluorescentes e imagen por fluorescencia *in vitro*

- 10 La línea de células de cáncer de pulmón humano epiteliales se propagó rutinariamente y se trataron en placas de cultivo de 24 pocillos como se describe en el Ejemplo 7. Las células se cultivaron con medio que contenía conjugado de heparina-ICC 10^{-6} M o conjugado de poliglicerol sulfatado-ICC (Ejemplo 3c) o conjugado de ICC-triglicerol 10^{-6} M (Angew Chem Int Ed Engl. 48: 7540, 2009) como control durante 4 horas a 37°C. A continuación, las células se fijaron con acetona fría. Se usó 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abeam) para la contratinción nuclear. La adquisición de imágenes se realizó usando un microscopio Leica DMRB (Leica). Las imágenes se tomaron con una cámara digital (Spot 32, Diagnostic Instruments).
15 No hubo absorción celular de conjugados de heparina o glicerol-ICC, mientras que el poliglicerol sulfatado-ICC se mostró en el citoplasma de células A549. Los resultados se ilustran en la Figura 9.

Ejemplo 9: Análisis de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica humana incubadas con poliglicerol sulfatado conjugado con ICC

- 20 Se aislaron células de la fracción mononuclear de sangre humana por centrifugación diferencial en Ficoll-Hypaque, y luego se lavó con RPMI que contenía suero bovino fetal al 10% (PAN Biotech). Se cultivaron 2×10^5 células/ml de las células en placas de 24 pocillos con medio de cultivo RPMI o medio que contenía conjugado de poliglicerol sulfatado-ICC 10^{-6} M (Ejemplo 3c) o conjugado de ICC-triglicerol 10^{-6} M (Angew Chem Int Ed Engl. 48: 7540, 2009) como control durante 4 horas. A continuación, las células se lavaron con PBS y se separaron con 200 μ l/pocillo de acutasa (PAA) y se lavaron dos veces con PBS. Las células se fijaron con 500 μ l de paraformaldehído al 3% durante 10 min a 4°C, se paró con 2 ml de PBS y centrifugó con 250g, durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se separaron y las células se suspendieron en 200 μ l de PBS con albúmina sérica bovina al 0,5% (Roth). Las células fijadas se mantuvieron a 4°C hasta el análisis en un aparato de análisis FACS Calibur (Becton-Dickinson). Se identificaron monocitos o linfocitos analizando el tamaño de las células (dispersión frontal/lateral) y se cuantificó la absorción de conjugado de poliglicerol sulfatado-ICC. En monocitos, se detectó aproximadamente una cantidad aproximadamente varios cientos mayor de poliglicerol sulfatado que en linfocitos. Los resultados se ilustran en la Figura 10.
30

Ejemplo 10: Inhibición de la liberación de TGF- β -1

- 35 Se cultivaron células CASKI como sigue: Se añadió medio DEMEM, con suero bovino fetal al 10% (FCS), glutamina al 2% y penicilina/estreptomycin (todas de PAN Biotech). Se sembraron las células en el medio a 1×10^5 células/ml, se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂, y se dividieron 1:5 dos veces a la semana. Se aplicaron poligliceroles sulfatados con diferentes grados de sulfatación (30%, 70%, 86% o 92% de sulfatación) o diferente peso molecular del núcleo de poliglicerol (2600 o 7500 Da) durante 48 horas a células CASKI a una concentración de 10^{-8} M. Como control se usó cultivo con medio solo. Los sobrenadantes de cultivo se separaron centrifugaron y almacenaron a -20°C. El contenido de TGF-beta-1 en los sobrenadantes de cultivo se detectó usando un kit ELISA disponible comercialmente (eBioscience Inc). Los resultados se ilustran en la Figura 11.

- 40 **Ejemplo 11:** Unión a NF-kappaB de poliglicerol sulfatados usando tecnología SPR

- Los experimentos se realizaron en un equipo BIACORE X (Biacore AB, Uppsala, Suecia) a 25°C. La inmovilización del ligando implicó el uso de tampón HBS-EP (Biacore AB), que consiste en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y 0,005% de tensioactivo P20. Se usó tampón HBS-EP así como tampón de migración durante el ensayo. Se adquirieron cadenas sencillas biotiniladas del motivo de secuencia de ADN kB (negrita) (5'-biotina-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' (directo) y 5'-biotina-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3' (inverso) de Metabion International AG (Martinsried, Alemania). Se mezclaron 30 μ l de ambas soluciones de cadenas sencillas (cada una a una concentración de 100 μ M), se calentaron durante 5 min a 80°C y se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente para permitir una hibridación perfecta. A continuación, se añadieron 60 μ l de tampón HBS-EP a la muestra y la sonda biotinilada se inmovilizó en un chip SA detector funcionalizado con estreptavidina (Biacore AB). Con fines de referencia, el segundo carril del mismo chip quedó vacío. Para un mejor comportamiento, el chip detector se acondicionó inicialmente con tres inyecciones consecutivas en 1 min de NaCl 1 M en NaOH 50 mM antes de empezar la inmovilización. El chip se cargó con el motivo de secuencia de ADN kappaB hasta un desplazamiento basal de 1300 unidades de resonancia (UR). El procedimiento de inmovilización estuvo seguido de varios lavados con tampón de migración para equilibrar la superficie del chip. La proteína p50 NF-kappaB recombinante se adquirió de Active Motif (Carlsbad, CA, Estados Unidos de América). La concentración de trabajo final de proteína NF-kappaB fue aproximadamente 28,6 nM (molaridad basada en el peso molecular del monómero NF-kappaB; 50000 Da). Antes de cargar, cada muestra se incubó con el compuesto de poliglicerol sulfatado respectivo (véase la Tabla 5) durante 18 min a temperatura ambiente a concentraciones finales de inhibidor de 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10
55

5 μM , o $100 \mu\text{M}$. Las muestras se inyectaron sobre el carril de referencia y de ligando (oligonucleótidos de ADN kappaB) a un caudal de $20 \mu\text{l}/\text{min}$. Cada ciclo de medida consistía en un período de 105 s para inyectar la muestra (fase de asociación), una fase de disociación no alterada de 180 s, y un lavado del sistema de flujo con NaCl 1M. Para la evaluación de los datos, se restaron los datos del carril de referencia del carril de ligando (secuencia de ADN kappaB).
 10 Las respuestas de las inyecciones de muestra se extrajeron entre puntos de información fijados al principio de la inyección (0 s) y al final de la fase de disociación (285 s). Los valores de respuesta finales se usaron para la creación de una curva. Cada punto de dato representa el valor medio (\pm DTM) de dos medidas. En la Figura 12 se representan curvas de unión. Los valores de Cl_{50} se listan en la Tabla 5. Las afinidades de unión aumentan al aumentar el grado de sulfatación y peso molecular mostrados por valores de Cl_{50} decrecientes. Los enlazadores y moléculas efectoras no obstaculizan la afinidad de unión. El ensamblaje de sulfatos en dendrones a un número de solo 16 sulfatos no exhibe afinidad de unión suficiente (G3.0-dendron/E1).

Tabla 5: Valores Cl_{50} de poliglicerol sulfatados, poliglicerol sulfatados con enlazadores y conjugados con moléculas efectoras (Ejemplos 1, 2, 3):

Tipo de compuesto	Ejemplo	Valor Cl_{50}
Poliglicerol sulfatado (P3)	1 b	3,5 nM
Poliglicerol sulfatado (P10)	1 b	3,0 nM
Poliglicerol sulfatado (P2)	1 b	5,0 nM
Poliglicerol sulfatado (P8)	1 b	0,7 nM
Poliglicerol sulfatado análogo a P3 con 38% de sulfatación	1 b	4,5 nM
Poliglicerol sulfatado análogo a P3 con 28% de sulfatación	1 b	1000 nM
Poliglicerol sulfatado con enlazador (P20)	2 d	3,0 nM
Poliglicerol sulfatado con enlazador análogo a P17 con 72% de sulfatación	2 d	5,5 nM
Conjugado de poliglicerol sulfatado – colorante de cianina (P26/E2)	3 b	3,0 nM
Conjugado de poliglicerol sulfatado – colorante de cianina (G3.0-dendron/E1)	3 e	1000 nM

15 **Ejemplo 12:** Inhibición del crecimiento de células de tumor de pulmón *in vitro*

Con el fin de probar los posibles efectos de poliglicerol sulfatado sobre el crecimiento celular de células de tumor de pulmón, se usó la línea de células A549 humana. La línea de células A549 humana se propagó rutinariamente como sigue, medio DMEM, con suero bovino fetal al 10% (FCS), 2% de glutamina y penicilina/estreptomina (todas de PAN Biotech) añadidas. Se sembraron las células en el medio a 1×10^5 células/ml, se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 , y se dividieron 1:5 dos veces a la semana.

El análisis de la proliferación celular se realizó con células cultivadas en placas de 24 pocillos. Se incubaron 2×10^5 células/ml en 1 ml de medio de cultivo que contenía concentraciones crecientes de sustancias de prueba. Después de 2 días de cultivo, se analizaron en un contador celular y un sistema de análisis (CASY®, Schärfe Systems) el número de células, la viabilidad y el diámetro de las células como parámetro de los procesos apoptóticos. Además, se valoró la influencia del fármaco *in vitro* usando el ensayo MTT (reducción celular de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como una prueba para la actividad metabólica de las células. De forma resumida, se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos en $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo que contenía concentraciones crecientes de la sustancia de prueba. Después de 2 días de cultivo, se añadieron a cada pocillo $10 \mu\text{l}$ de MTT (5 mg/ml en PBS, obtenida de Sigma) y se incubaron las placas durante 4 h. El producto en formazán resultante se disolvió con isopropanol ácido y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (Ex570) en un espectrómetro Microplate (Anthos htII, Microsystems).

El poliglicerol sulfatado (compuesto P3) se aplicó durante 48 horas a células A549 a una concentración de 10^{-5} M a 10^{-9} M. Como control se usó cultivo con medio solo.

Los resultados se ilustran en la Figura 13.

Ejemplo 13: Eficacia en un modelo de tumor de ratón *in vivo*

Para probar si poliglicerol sulfatado es efectivo en la supresión del crecimiento tumoral *in vivo* se usó un modelo de cáncer de pulmón de ratón atímico bien establecido. Se inyectaron subcutáneamente células amicrocíticas humanas de cáncer de pulmón A549 ($0,7 \times 10^7$ células/ratón) en los costados de ratones atímicos macho NMRI nu/nu (Taconic Europe). El tratamiento diario con 100 μ l de PBS o 30 mg/kg dos veces a la semana con poliglicerol sulfatado (compuesto P3) en 100 μ l de PBS subcutáneamente se realizó los días 12-16, 19-23 y 26-30 después de la implantación celular. Los volúmenes de tumor se determinaron en 10 puntos temporales entre el día 12 y el 44 después de la implantación celular. El tamaño del tumor se midió con un calibre, y se estimó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen (cm^3) = $1/2(L - W^2)$, donde L y W son la longitud (cm) y anchura (cm) del tumor trasplantado. Los resultados se ilustran en la Figura 14. Además, no se identificaron signos de toxicidad y acontecimientos adversos debidos al tratamiento con fármaco durante todo el tiempo de tratamiento de los ratones.

Ejemplo 14: Eficacia en el modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno

Para probar si los poligliceroles sulfatados son efectivos en la supresión de artritis reumatoide, se indujo en ratas artritis reumatoide inducida por colágeno (AIC) experimental. Se indujo AIC por inmunización de ratas Lewis hembra con una emulsión de colágeno bovino tipo II y adyuvante incompleto de Freund (DIFCO Laboratories). Se valoró la inflamación de la pata por el aumento del volumen de la pata después de dos semanas. Las ratas se monitorizaron a diario para determinar signos de enfermedad y se asignaron puntuaciones de enfermedad de 0 a 3. Para el tratamiento *in vivo*, se administraron 30 mg/kg de peso corporal de poliglicerol sulfatado (compuesto P3) en 200 μ l de PBS diariamente por inyección subcutánea a ratas control y AIC desde el día 14 hasta el día 16 después de la inmunización. Las lesiones de hueso y cartílago e infiltrado inflamatorio se valoraron en base al cambio histológico en porciones en parafina de la articulación de la rodilla. Se obtuvieron mastocitos con azul de toluidina (Sigma) en HCl 0,5N (Roth) durante la noche y se contaron en la sinovia. Los resultados se ilustran en la Figura 15. Además, no se identificaron signos de toxicidad y acontecimientos adversos durante todo el tiempo de tratamiento de los ratones.

Ejemplo 15: Eficacia en el modelo experimental EAE

Para probar si los poligliceroles sulfatados son efectivos en la supresión de esclerosis múltiple experimental, se indujo en ratones encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE). Se indujo EAE en ratones SJL hembra de 8 a 12 semanas por inmunización de los ratones subcutáneamente con 100 μ g de PLP en 100 μ l de PBS y 100 μ l de CFA. CFA se preparó mezclando adyuvante incompleto de Freund (DIFCO Laboratories) con 8 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis H37RA (desecada; DIFCO Laboratories). En el momento de la inmunización y 2 días después, los ratones se inyectaron iv con 200 ng de toxina pertúsica (List Biological Laboratories) en 100 μ l de PBS. Los ratones se monitorizaron diariamente para determinar signos clínicos de enfermedad y puntuaciones de enfermedad asignada de 0 a 5 basados en la gravedad de la EAD como sigue: 0, sin enfermedad; 1, cola fría; 2, debilidad extremidades traseras; 3, parálisis extremidades traseras; 4, parálisis extremidades traseras y delanteras; 5, morbilidad y muerte.

Para el tratamiento *in vivo*, se administró poliglicerol sulfatado (compuesto P3) diariamente por inyección subcutánea a ratones inmunizados con PLP del día 2 al día 20. Los ratones se monitorizaron diariamente para determinar signos clínicos de enfermedad. La Tabla 6 demuestra el efecto terapéutico de poliglicerol sulfatado en dosis subcutáneas diarias de 30 mg/kg. Mientras que los animales control exhibieron el día 10 y el día 20 después de la inmunización una puntuación clínica de 3,1 y 2,3, respectivamente, poliglicerol sulfatado en dosis diarias de 30 mg/kg de peso corporal redujo la puntuación clínica a 1,7 y 1,1, respectivamente. Además, no se identificaron signos de toxicidad y acontecimientos adversos debidos al tratamiento con fármaco durante todo el tiempo de tratamiento de los ratones.

Tabla 6: Efecto de poliglicerol sulfatado (P3) sobre la puntuación clínica en el modelo de ratón EAE

	Puntuación clínica el día 10	Puntuación clínica el día 20
Grupo control	3,1	2,3
Grupo de tratamiento	1,7	1,1

Ejemplo 16: Eficacia en el modelo de septicemia subaguda experimental

Se probaron poligliceroles sulfatados en un modelo de septicemia subaguda en ratones NMRI hembras. La septicemia se indujo mediante una inyección intraperitoneal única de LPS en una dosis única de 0,2 mg/kg. Los controles negativos recibieron una única inyección de solución salina. Se aplicó poliglicerol sulfatado (compuesto P3) en una única dosis de 15 mg/kg por inyección subcutánea 30 minutos antes de la aplicación de LPS (Sigma Aldrich). Se midió el nivel sérico de la proteína del complemento C5a (Alpco Diagnostics) como un indicador de septicemia no letal. La medida se realizó 2 horas o 6 horas después de la aplicación de LPS. Comparado con los controles negativos, LPS indujo una estimulación de C5a en suero hasta 245%. Poliglicerol sulfatado en una única dosis de 15 mg/kg indujo una fuerte inhibición de la estimulación mediada por LSP hasta 105% del nivel de los controles negativos. La inhibición también fue evidente 6 horas después de la aplicación de LPS.

Tabla 7: Efecto de poliglicerol sulfatado sobre la inducción de septicemia inducida por LPS en ratones

	Nivel sérico de C5a 2 horas después de la inducción con LPS comparado con controles negativos	Nivel sérico de C5a 6 horas después de la inducción con LPS comparado con controles negativos
Controles negativos – sin inducción con LPS	100 %	100 %
Controles positivos – inducción con LPS	245 %	185 %
Tratamiento con poliglicerol sulfatado (P3) – inducción con LPS	105 %	110 %

Ejemplo 17: Absorción de poliglicerol sulfatado en el modelo experimental de artritis reumatoide por imagen de fluorescencia *in vivo*

5 Se disolvió conjugado efector P26/E2 (Ejemplo 3b) en NaCl 0,9% (concentración: 1 mg/ml) y se inyectó en la vena caudal de ratas con artritis reumatoide inducida por colágeno (modelo animal como se describe en el Ejemplo 14; dosis: 2 mg/kg). Se usó un equipo de imagen por fluorescencia plana que consiste en una unidad láser (longitud de onda de excitación 760 nm) y una cámara CCD con filtro de paso bajo (observación > 780 nm) de acuerdo con J. Biomed. Optics 10, 41205 (2005). Se tomaron imágenes de fluorescencia de ratas anestesiadas a 10 min, 30 min, 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección. Los resultados se representan en la Figura 16 que muestra una absorción rápida y elevada y contraste de fluorescencia en articulaciones artríticas (10 min) que se prolonga hasta 24 h (datos no representados), mientras que las articulaciones sanas no exhibieron fluorescencia. Las flechas indican articulaciones artríticas de progresión de enfermedad creciente (puntuaciones de enfermedad 1, 2 y 3) con contrastes de fluorescencia que aumentan con la puntuación, demostrando así la capacidad del conjugado para monitorizar la actividad de la enfermedad.

Ejemplo 18: Absorción de conjugado de poliglicerol sulfatado con conjugado DOTA en el modelo experimental de dermatitis (ratón) por imagen *in vivo* PET

20 Se sensibilizaron ratones C57B1/6 (hembras, 8 semanas) frente a TNCB mediante aplicación tópica de 450 µg de TNCB sobre la piel abdominal. Después de cinco días, se expusieron de forma provocada los ratones por aplicación tópica de 45 µg TNCB sobre la oreja derecha. El conjugado efector P17/E13 Ejemplo 4a se marcó con Cu-64 de acuerdo con métodos publicados en la bibliografía (generación de Cu-64 en forma de solución en CuCl₂: Appl. Radiat Isot. 2007, 65, 1115). El marcado se realizó en tampón acetato (pH 5) durante 1 hora a 37°C (100 MBq) usando 0,1 mg de conjugado. La pureza radioquímica se determinó por HPLC y radio-TLC. El rendimiento radioquímico fue del 90%. El conjugado HSPG DOTA marcado con Cu-64 se obtuvo como una solución en tampón fosfato pH 7,4 después de purificación SEC. Se inyectaron 100 µCi en la vena caudal de ratones. Se adquirieron repetidamente imágenes de alta resolución de PET 10 min con un escáner PET clínico. Las imágenes de ratones anestesiados se tomaron a los 30 minutos después de la inyección de conjugado HSPG DOTA marcado con Cu-64. Los resultados se representan en la Figura 17 mostrando una rápida y alta absorción en áreas con inflamación (tejido inflamado en la oreja del ratón) como se indica por la flecha.

30 **Ejemplo 19:** Incremento de los efectos citotóxicos de fármacos citostáticos sobre células tumorales por efector citostático conjugado con poliglicerol sulfatado.

35 Con el fin de probar los posibles efectos de la conjugación con poliglicerol sulfatado sobre los efectos citotóxicos de fármacos citostáticos, se usó la línea de células A549 humana. La línea de células A549 se propagó rutinariamente como sigue, medio DEMEM, con suero bovino fetal al 10% (FCS), 2% de glutamina y penicilina/estreptomocina (todas de PAN Biotech) añadidas. Se sembraron las células en el medio a 1 x 10⁵ células/ml, se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂, y se dividieron 1:5 dos veces a la semana.

40 El análisis de la proliferación celular se realizó con células cultivadas en placas de 24 pocillos. Se incubaron 2 x 10⁵ células/ml en 1 ml de medio de cultivo que contenía concentraciones crecientes de sustancias de prueba. Después de 24 horas de cultivo, se retiraron los medios con sustancias de prueba y se sustituyeron por medio de cultivo normal. Después de otras 24 horas se analizaron en un contador celular y un sistema de análisis (CASY®, Schärfe Systems) el número de células, la viabilidad y el diámetro de las células como parámetro de los procesos apoptóticos. Además, se valoró la influencia del fármaco *in vitro* usando el ensayo MTT (reducción celular de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como una prueba para la actividad metabólica de las células. De forma resumida, se sembraron 1 x 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 µl de medio de cultivo que contenía concentración

5 creciente de la sustancia de prueba (conjugado de paclitaxel del Ejemplo 6b). Después de 2 días de cultivo, se añadieron a cada pocillo 10 µl de MTT (5 mg/ml en PBS, obtenida de Sigma) y se incubaron las placas durante 4 h. El producto en formazán resultante se disolvió con isopropanol ácido y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (Ex570) en un espectrómetro Microplate (Anthos htII, Microsystems). Se aplicó paclitaxel (taxol) a células A549 a una concentración de 10^{-7} M y sustancia de prueba a concentraciones de 10^{-7} M a 10^{-10} M. Como control se usó cultivo con medio solo.

Los resultados se ilustran en la Figura 18 mostrando una eficacia superior a concentración comparable de 10^{-7} M, así como efectos citotóxicos a concentraciones menores 1/100.

Ejemplo 20: Inhibición de la expresión de VEGF por poliglicerol sulfatado conjugado con efector VEGF-ARNip

10 Se reprodujo la línea celular de cáncer de pulmón A549 como se describe en el Ejemplo 11. Para recoger los sobrenadantes para la detección de VEGF, se sembraron células a 1×10^6 células/ml en una placa de cultivo de 24 pocillos durante 24 horas. A continuación, para incubar las células se usaron VEGF-ARNip o VEGF-ARNip acoplado con poliglicerol sulfatado (conjugado P16/E33, Ejemplo 6e) sin la adición de otros reaccionantes de transfección. Cuatro horas después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco con FCS al 10%. Después de otras 48 horas, se recogieron los sobrenadantes del cultivo para ELISA. El contenido de VEGF en los sobrenadantes se detectó usando un kit ELISA disponible comercialmente (Quantikine, R&D Systems). Los resultados se ilustran en la Figura 19 que muestra la producción de VEGF en líneas celulares de cáncer de pulmón A549 después de la incubación con las sustancias de prueba. La proteína VEGF se midió por ELISA en medio de cultivo celular acondicionado 48 h. Cada barra es la media \pm DTM de tres determinaciones de tres experimentos independientes.

20 **Ejemplo 21:** Prueba de agregación de soluciones de poliglicerol sulfatado en tampón

Se preparó a una concentración de 0,1 µM una solución de poliglicerol sulfatado conjugado con colorante de cianina (compuesto P17/E1) en NaCl al 0,9% (solución salina). Se determinó la intensidad de fluorescencia (excitación 760 nm, detección > 780 nm) en diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente en la oscuridad (0, 1, 2,5, 3, 4, 24 h). Los resultados se ilustran en la Figura 21 que muestra una disminución estacionaria de la fluorescencia debida a agregación en solución. En agua destilada o metanol no se observó tal disminución. La diálisis en agua destilada, adición de trehalosa (10 mg por mg de poliglicerol sulfatado) y liofilización proporcionó un material sólido. La resuspensión en agua destilada proporcionó una señal de fluorescencia al nivel inicial.

25

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de la fórmula $P(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n(\text{L-G-E})_m$, donde P es una macromolécula de poliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato OSO_3^-M^+ , siendo n un número > 10 , M es un contraion catiónico inorgánico u orgánico para el grupo sulfato aniónico, E es una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1-100, donde la macromolécula de poliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
- un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(\text{RO-CH}_2)_2\text{CH-OR}$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxiado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol $>60\%$ hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
 - la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ con un número n de grupos $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100% , y
 - el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
 - una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X \%$ de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
 - una molécula efectora de diagnóstico y/o terapéutica E, unida covalentemente a uno hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionada la molécula efectora de diagnóstico del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes para metales radiactivos o paramagnéticos, y estando seleccionadas las moléculas efectoras terapéuticas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.
2. Conjugado de la fórmula $P(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n(\text{L-G-E})_m$, donde P es una macromolécula de poliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato OSO_3^-M^+ , siendo n un número > 10 , M es un contraion catiónico inorgánico u orgánico para el grupo sulfato aniónico, E es una molécula efectora terapéutica, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1-100 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis y donde la macromolécula de poliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora terapéutica E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
- un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(\text{RO-CH}_2)_2\text{CH-OR}$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxiado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol $>60\%$ hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
 - la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ con un número n de grupos $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100% , y
 - el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
 - una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X \%$ de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora terapéutica adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
 - una molécula efectora terapéutica E, unida covalentemente a una hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionadas las moléculas efectoras terapéuticas del grupo de citostáticos, fármacos antiangiogénicos, fotosensibilizadores, ARNip.
3. Conjugado de la fórmula $P(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n(\text{L-G-E})_m$, donde P es una macromolécula de poliol en la que un número n de grupos hidroxilo está sustituido por grupos sulfato OSO_3^-M^+ , siendo n un número > 10 , M es un contraion catiónico inorgánico u orgánico para el grupo sulfato aniónico, E es una molécula efectora de diagnóstico, L es un enlazador o espaciador entre P y E, G es un grupo reactivo para la unión covalente entre L y E, y m es un número de 1-100 para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis y donde la macromolécula de poliol sulfatado es un poliglicerol sulfatado que está conjugado covalentemente con una molécula efectora de diagnóstico E y donde el poliglicerol sulfatado comprende:
- un poliglicerol polimérico, compuesto de unidades repetidas de glicerol con la fórmula $(\text{RO-CH}_2)_2\text{CH-OR}$ en una molécula iniciadora multifuncional, que es un compuesto polihidroxiado que tiene 1 a 1000 grupos OH, donde R es H u otras unidades de glicerol, siendo el grado de ramificación del núcleo de la macromolécula de poliol $>60\%$ hasta 67% y siendo su peso molecular promedio de 2000 a 20000 g/mol, y
 - la sustitución de una pluralidad de grupos OH de las unidades de glicerol con $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ con un

- número n de grupos $-\text{OSO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3\text{M}^+$ superior a 10, y un grado de sulfatación X de 30 a 100%, y
- 5 c. el peso molecular promedio resultante del poliglicerol sulfatado que es de 4000 a 50000 g/mol, y
- d. una unidad enlazadora L que porta un grupo funcional G, unido a al menos uno de los grupos OH hasta un máximo de $100 - X$ % de los grupos OH, pudiendo ser conjugados los grupos funcionales con una molécula efectora de diagnóstico adicional, donde X es el grado de sulfatación, y
- 10 e. una molécula efectora de diagnóstico E, unida covalentemente a una hasta el máximo número posible de dichos grupos funcionales, estando seleccionada la molécula efectora de diagnóstico del grupo de colorantes fluorescentes o quelantes para metales radiactivos o paramagnéticos.
4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis donde la molécula efectora E supone menos de 50% en peso del conjugado, y el conjugado tiene una solubilidad en agua de más de 100 mg/ml.
- 15 5. Conjugado según las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis por absorción intracelular en células activadas o células proliferativas y por inhibición de NF-kappaB y/o AP-1 y/o por inhibición de la síntesis de TGF-beta en dichas células.
- 20 6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, donde se llevan a cabo tratamientos múltiples con dosis de 1 mg/kg a 1000 mg/kg de dicho conjugado por administración.
7. Conjugado según las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis donde L es un grupo alquilo C_{1-20} lineal o ramificado donde uno o más grupos metileno no consecutivos pueden estar reemplazados por un grupo seleccionado de O, S, NH, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, $\text{C}(\text{O})$, SO_2 , SO, arilo, eteno o etino, y donde G está seleccionado del grupo que consiste en $-\text{OH}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{C}=\text{C}$.
- 25 8. Un conjugado según la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis mediante el suministro de una molécula efectora terapéutica o de diagnóstico E en células activadas o proliferativas de un sujeto.
- 30 9. Formulación sin agua de un conjugado que comprende un poliglicerol sulfatado según la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis.
10. Formulación sin agua según la reivindicación 9 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, donde el método de tratamiento de dicha enfermedad es por absorción intracelular en células activadas o células proliferativas y por inhibición de NF-kappaB y/o AP-1 y/o por inhibición de la síntesis de TGF-beta en dichas células.
- 35 11. Formulación sin agua según las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmunitaria y fibrosis, que comprende además un liofilizado que contiene sales tampón y/o al menos un crioprotector seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, manosa, trehalosa.

Figura 1

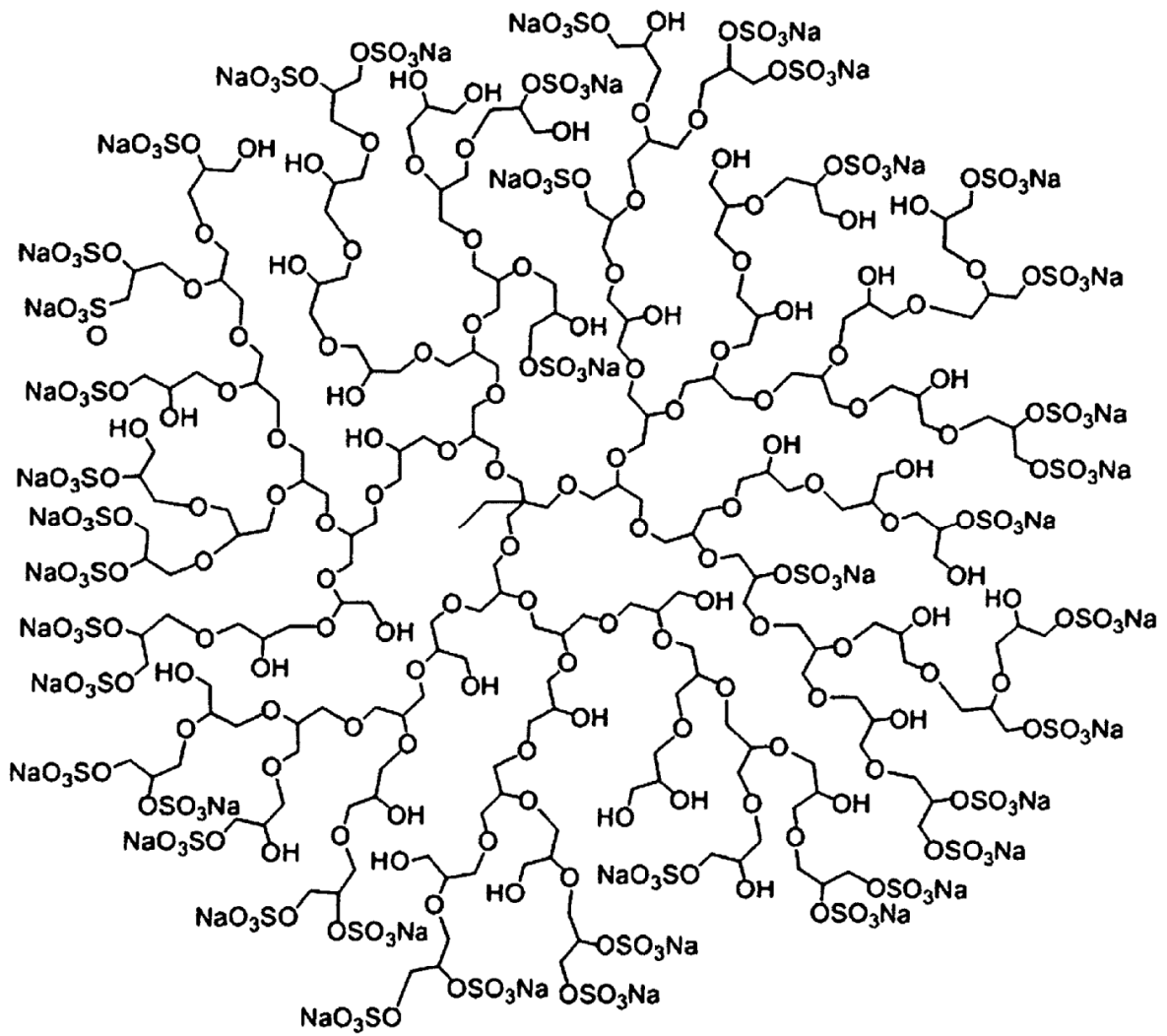


Figura 2

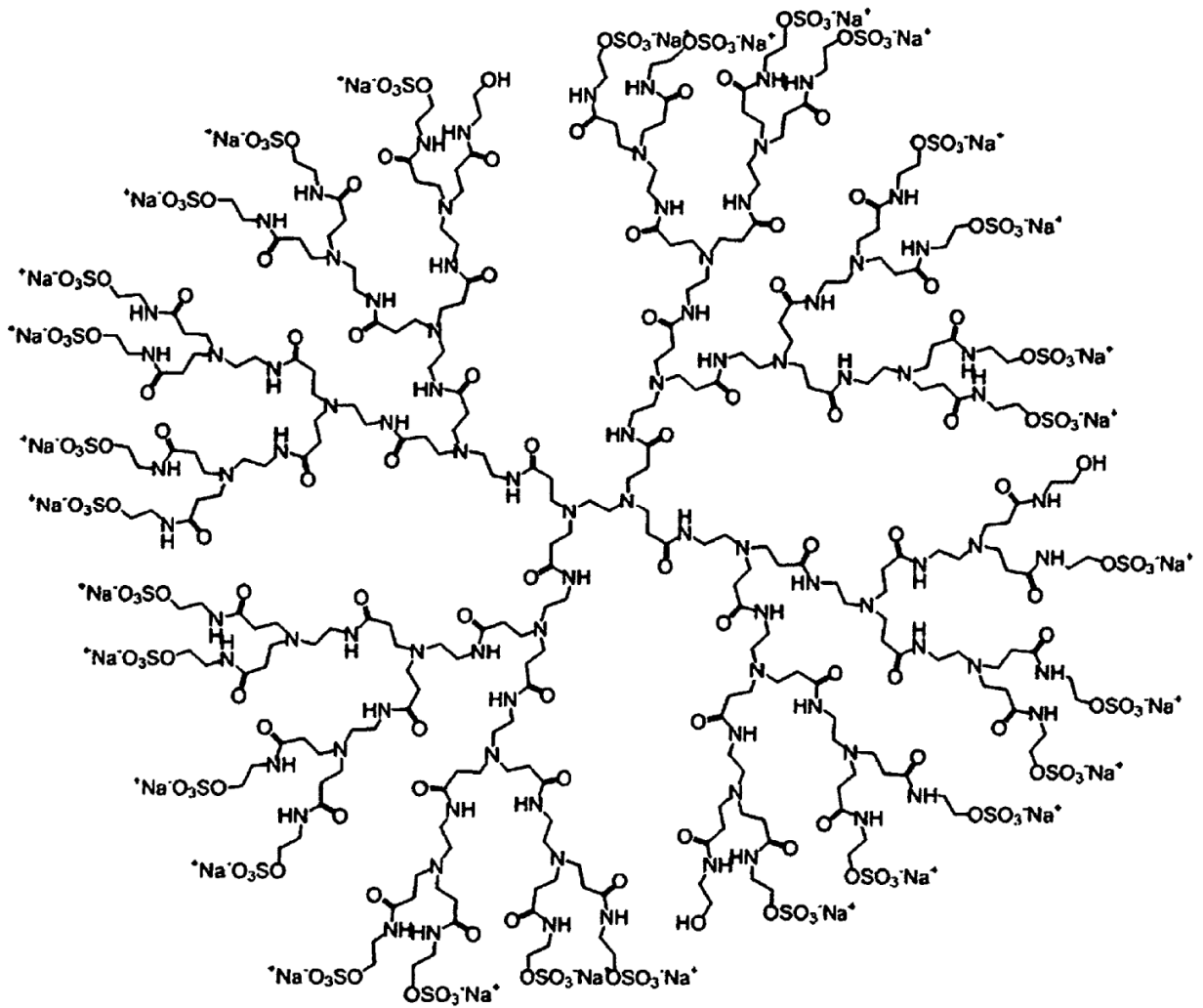


Figura 3

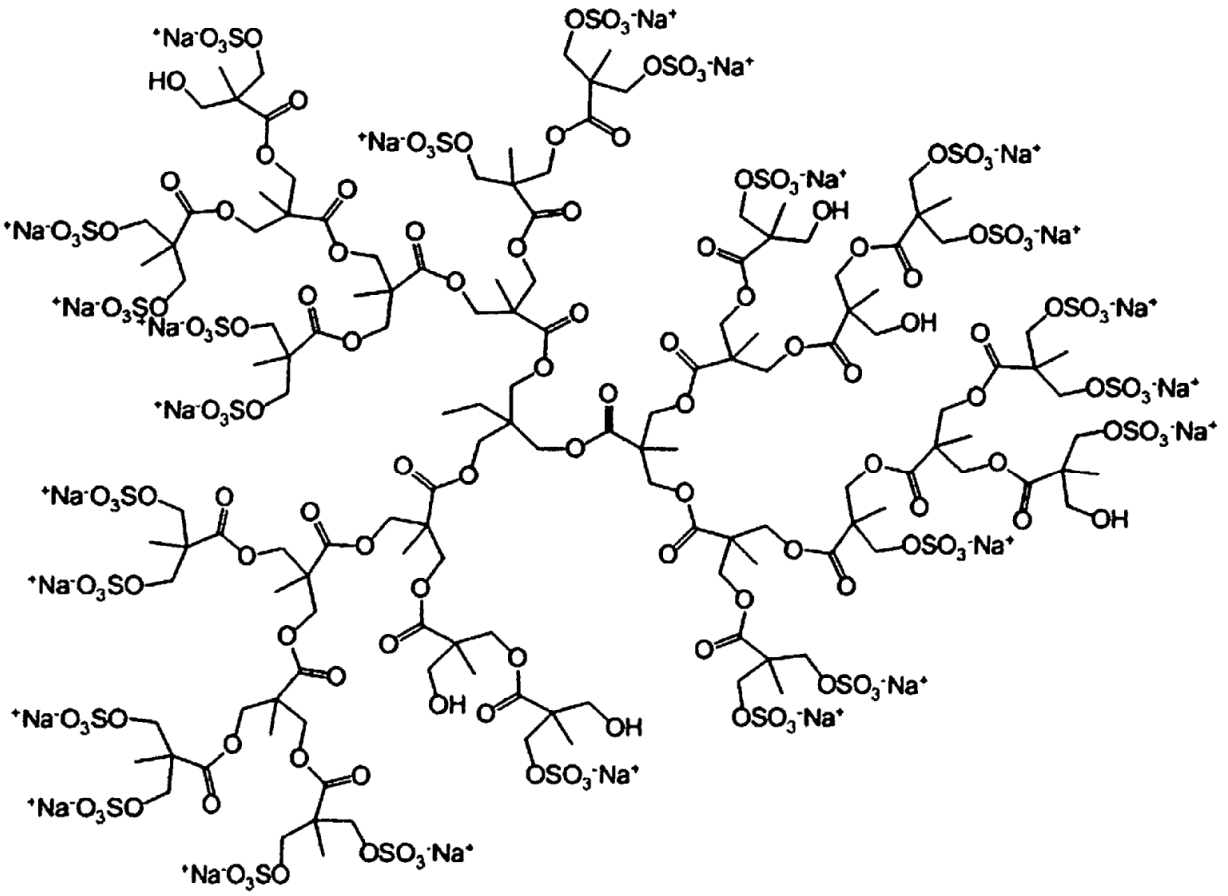
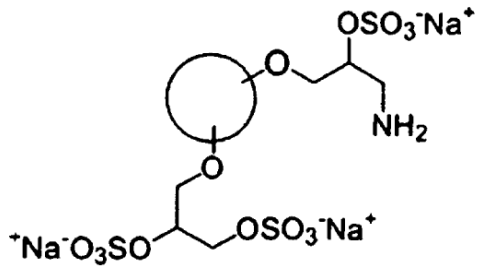
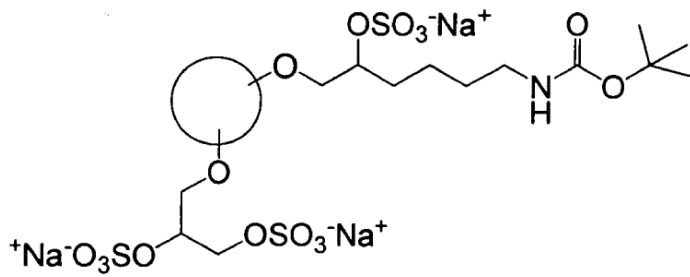


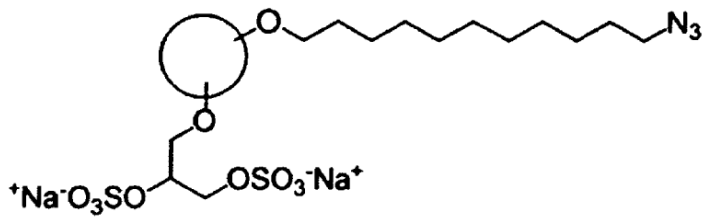
Figura 4



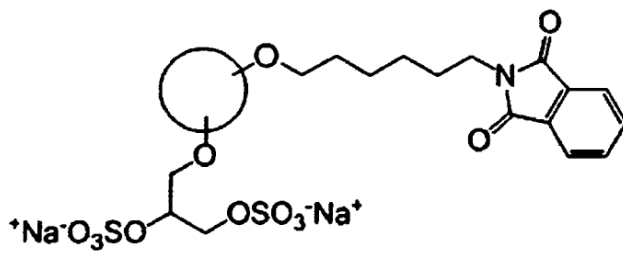
Compuesto P14/P20/P22/
P23/P28 (después de retirar el
grupo protector)



Compuesto P22

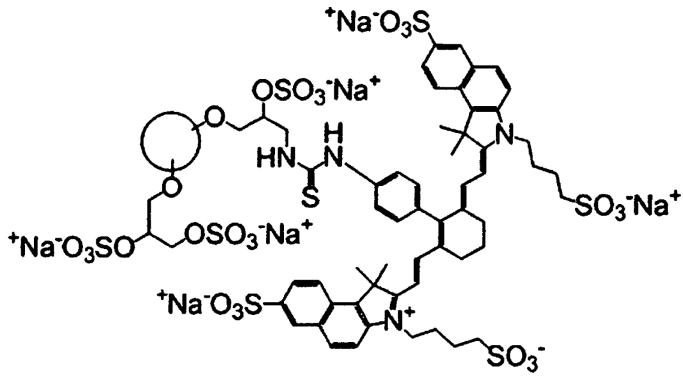


Compuesto P17

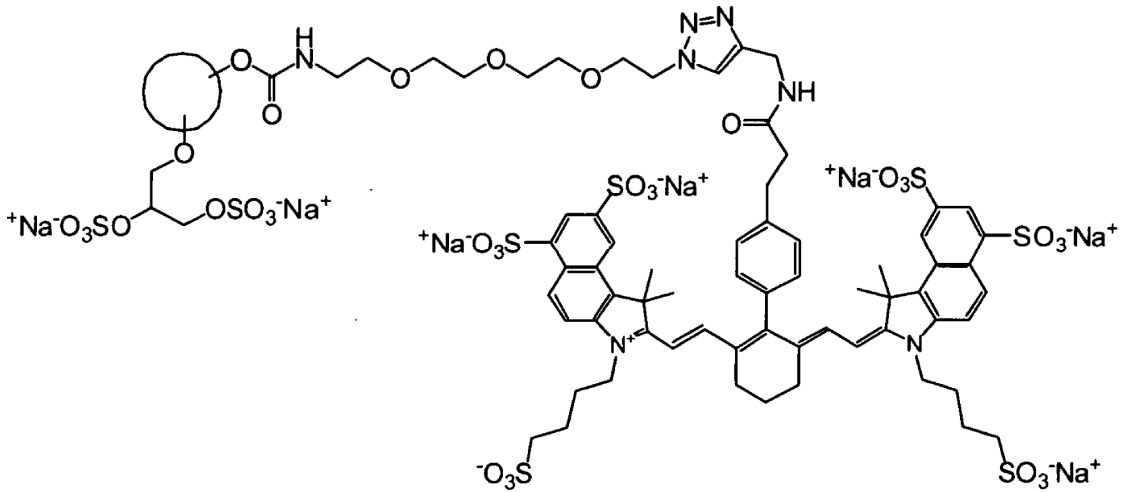


Compuesto P18

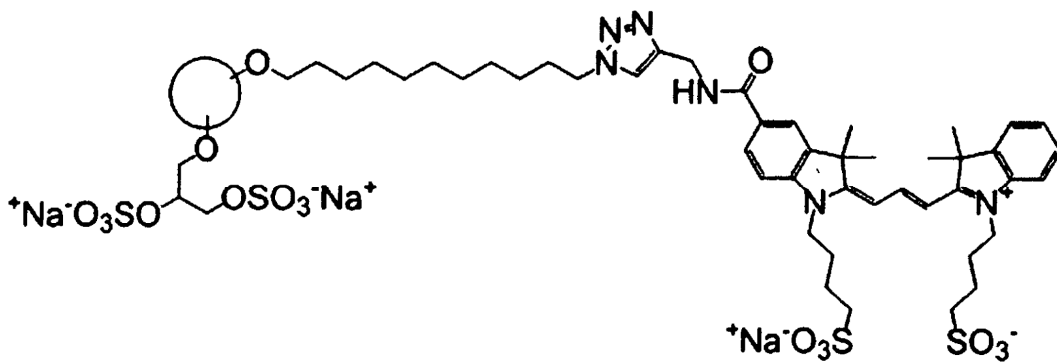
Figura 5



Conjugado efector de diagnóstico derivado de P14 y E3 (Ejemplo 3a)

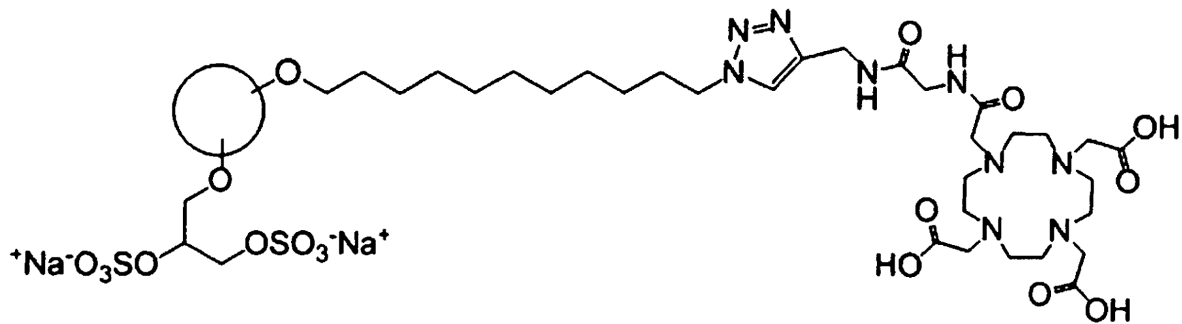


Conjugado efector de diagnóstico derivado de P26 y E2 (Ejemplo 3b)

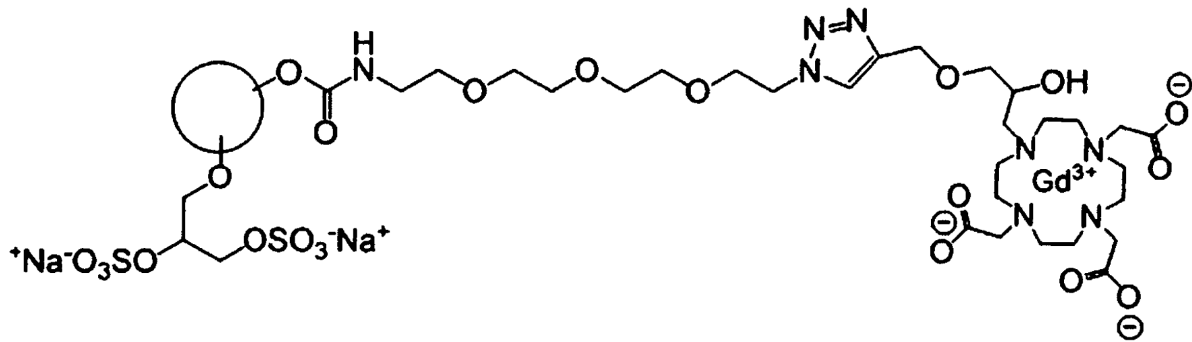


Conjugado efector de diagnóstico derivado de P17 y E5 (Ejemplo 3c)

Figura 6

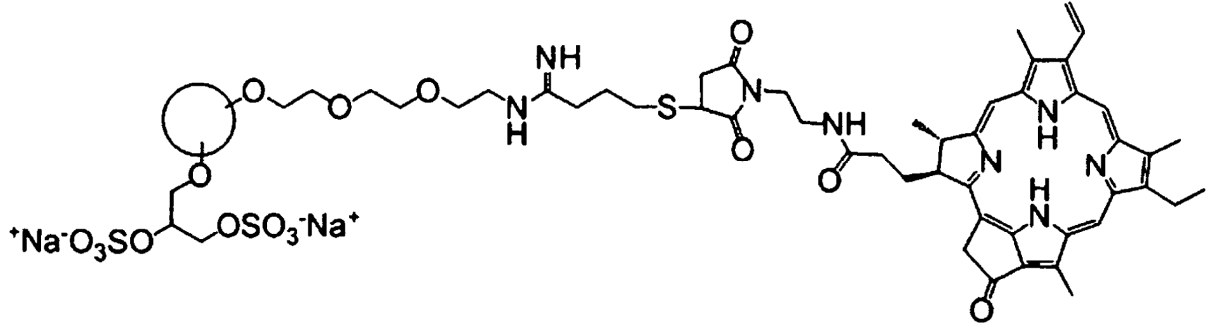


Conjugado para estudio de imágenes con radionúclidos o radioterapia derivado de P17 y E13 (Ejemplo 4a; quelante sin radioisótopo)

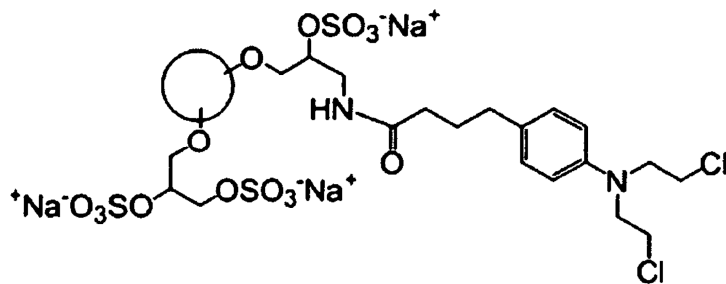


Conjugado de efector de diagnóstico para IRM derivado de P27 y E16 (Ejemplo 5a; quelante sin radioisótopo)

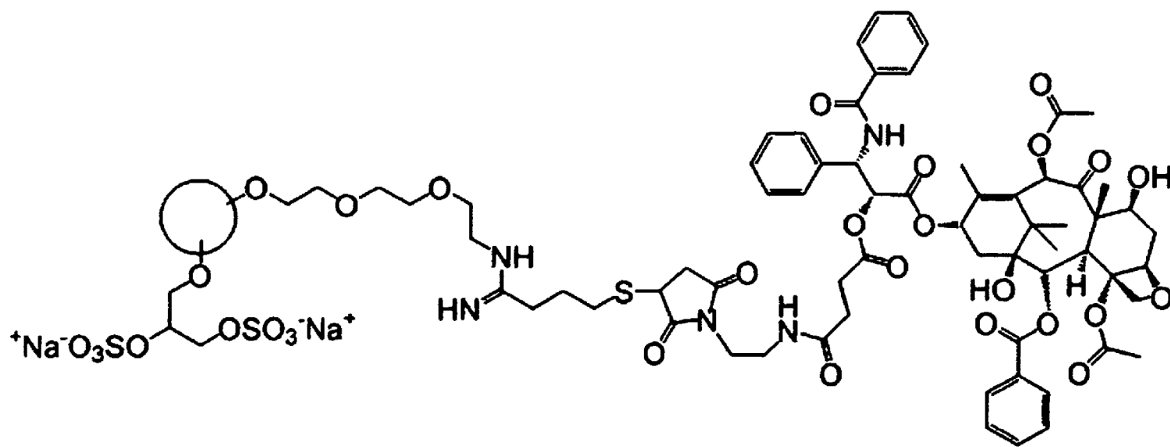
Figura 7



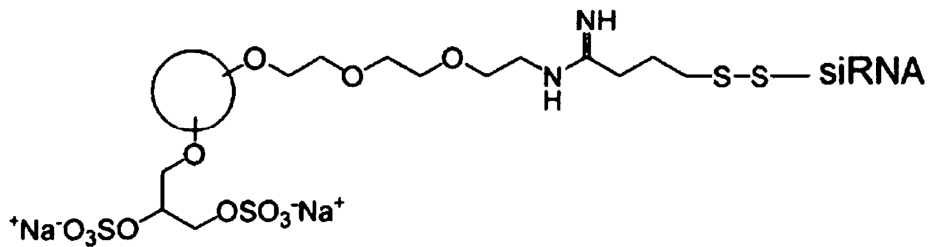
Conjugado efector terapéutico derivado de P16 y E20 (Ejemplo 6a)



Conjugado efector terapéutico de P14 y E25 (Ejemplo 6b)



Conjugado efector terapéutico de P16 y E26 (Ejemplo 6c)



Conjugado efector terapéutico de P16 y E33 (Ejemplo 6e)

Figura 8



Figura 9

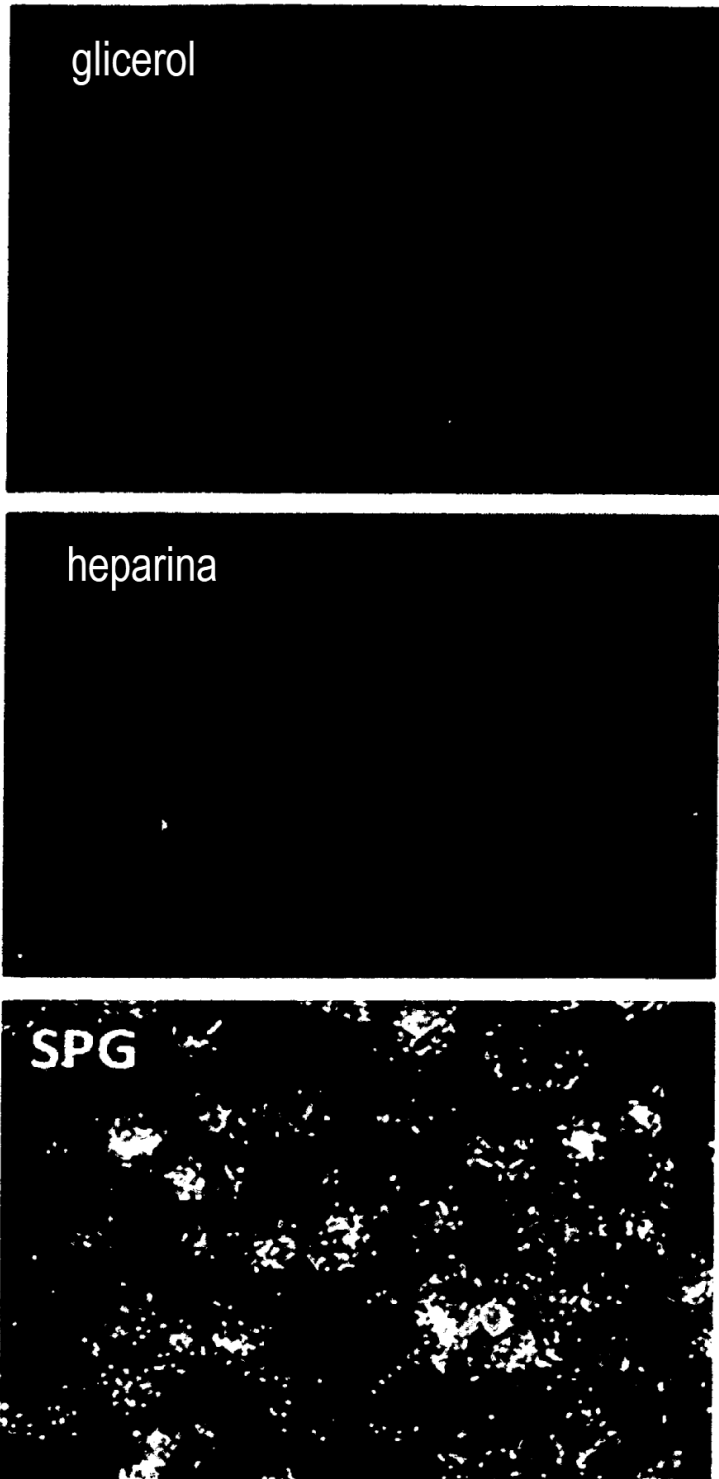


Figura 10

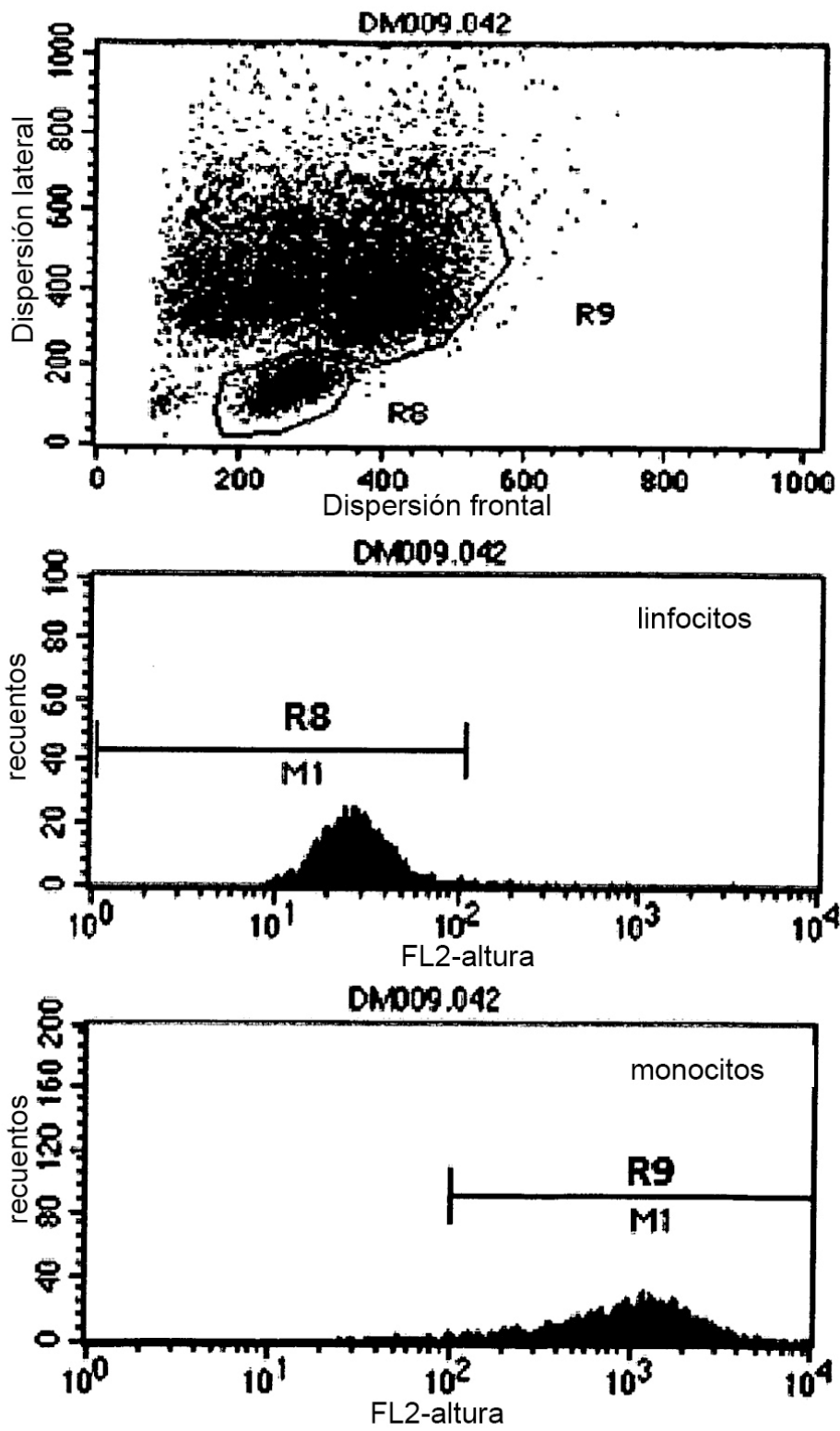


Figura 11

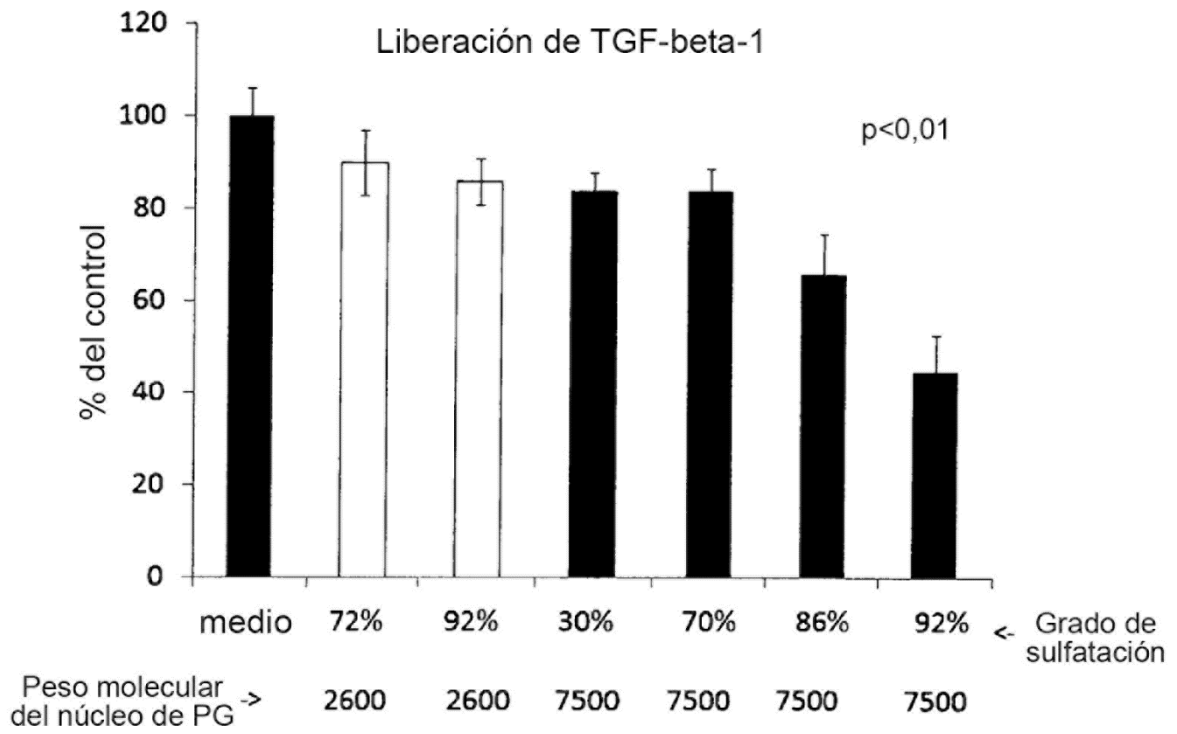


Figura 12

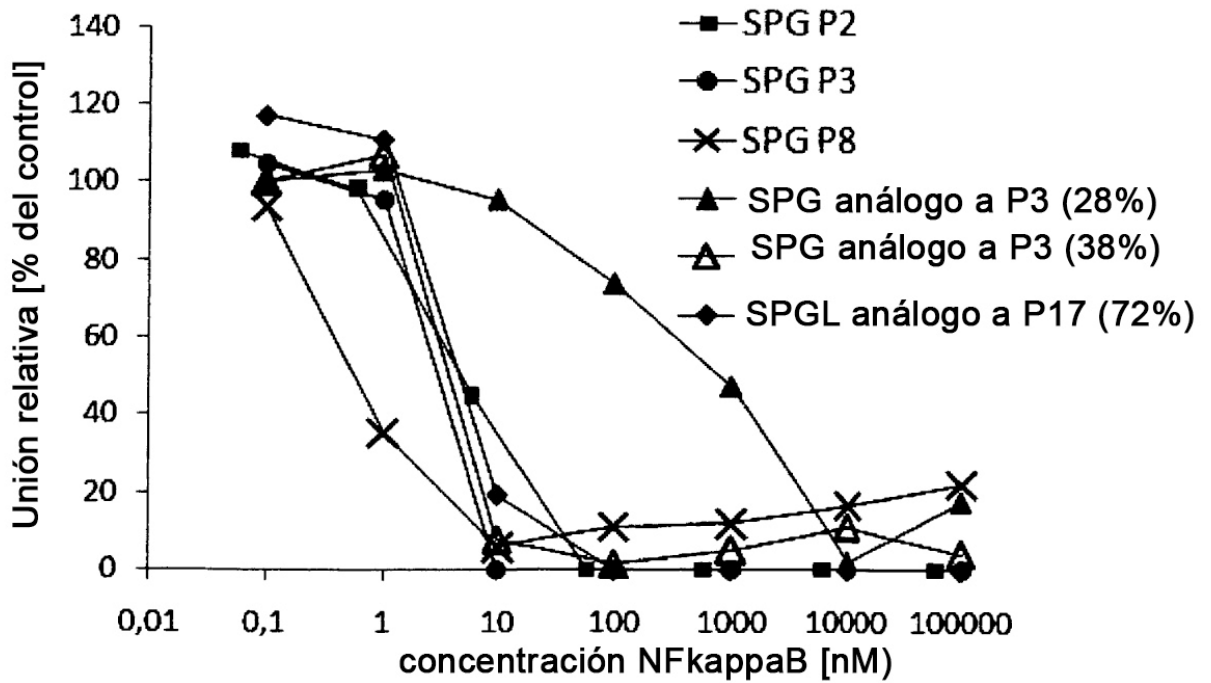
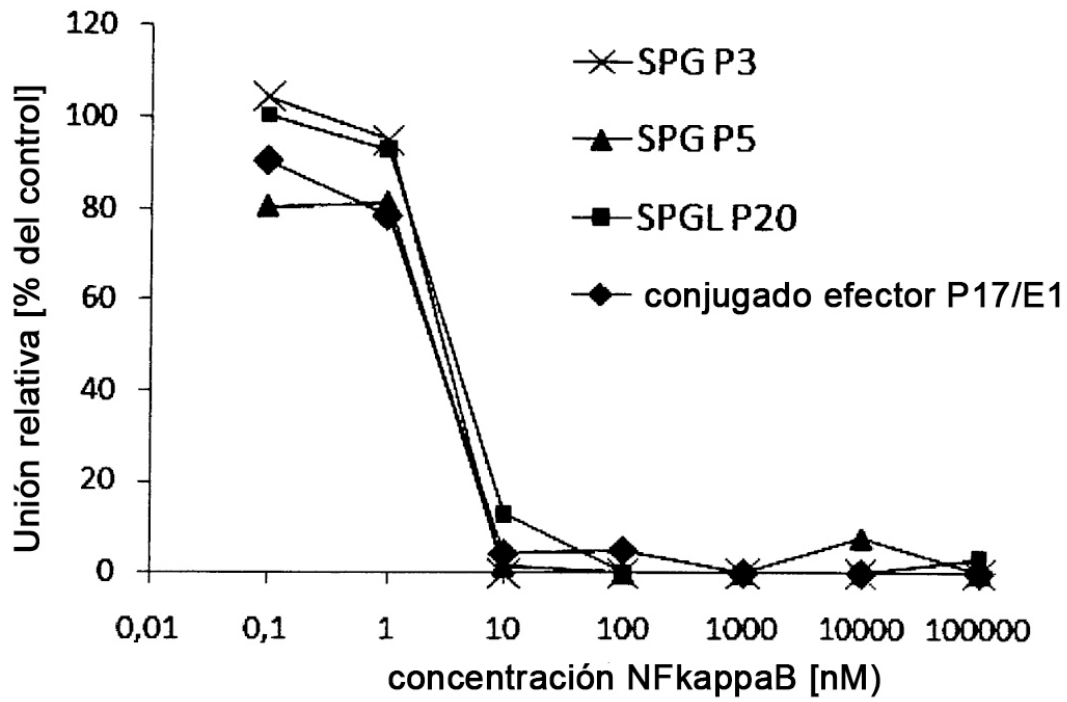


Figura 13

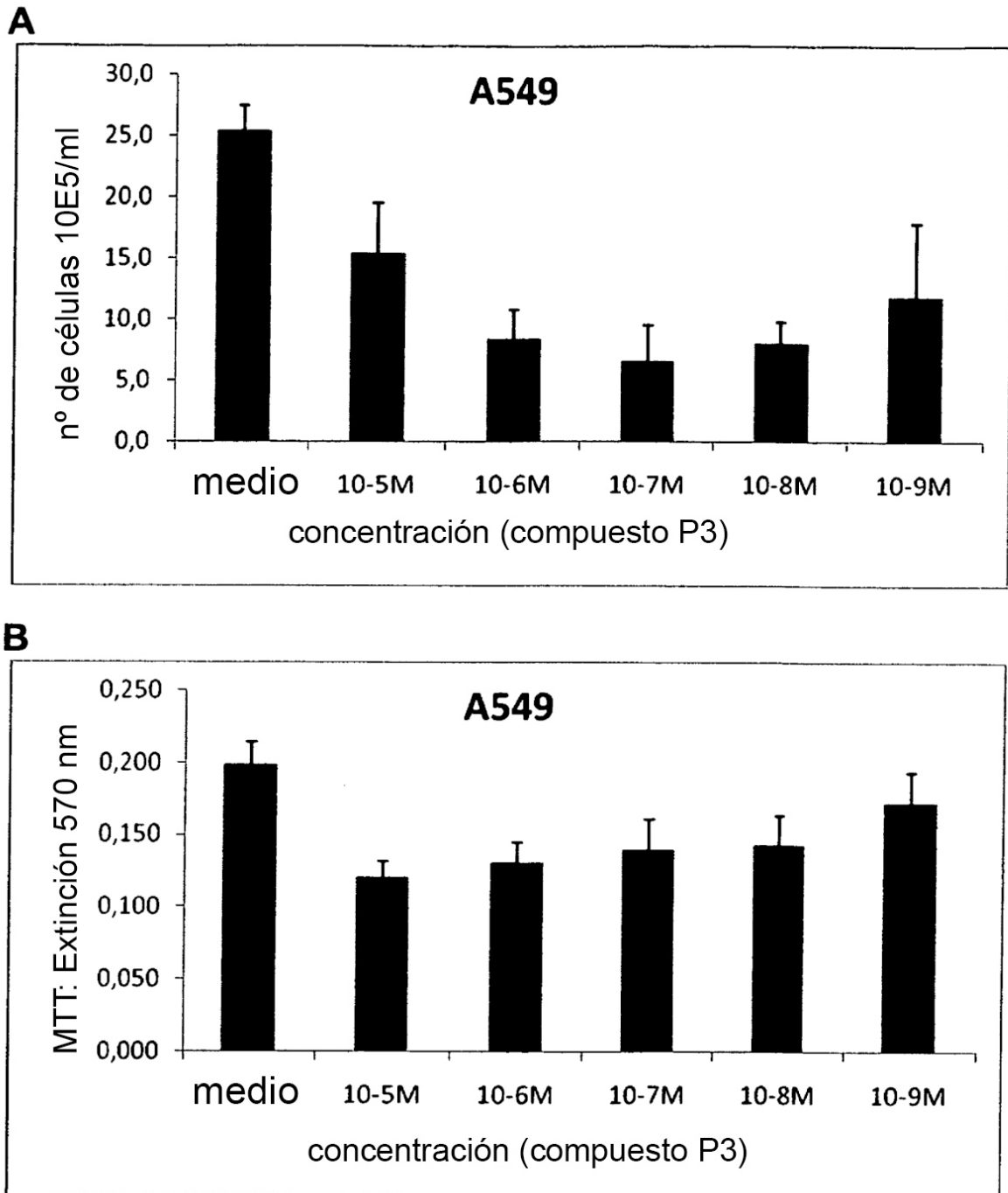


Figura 14

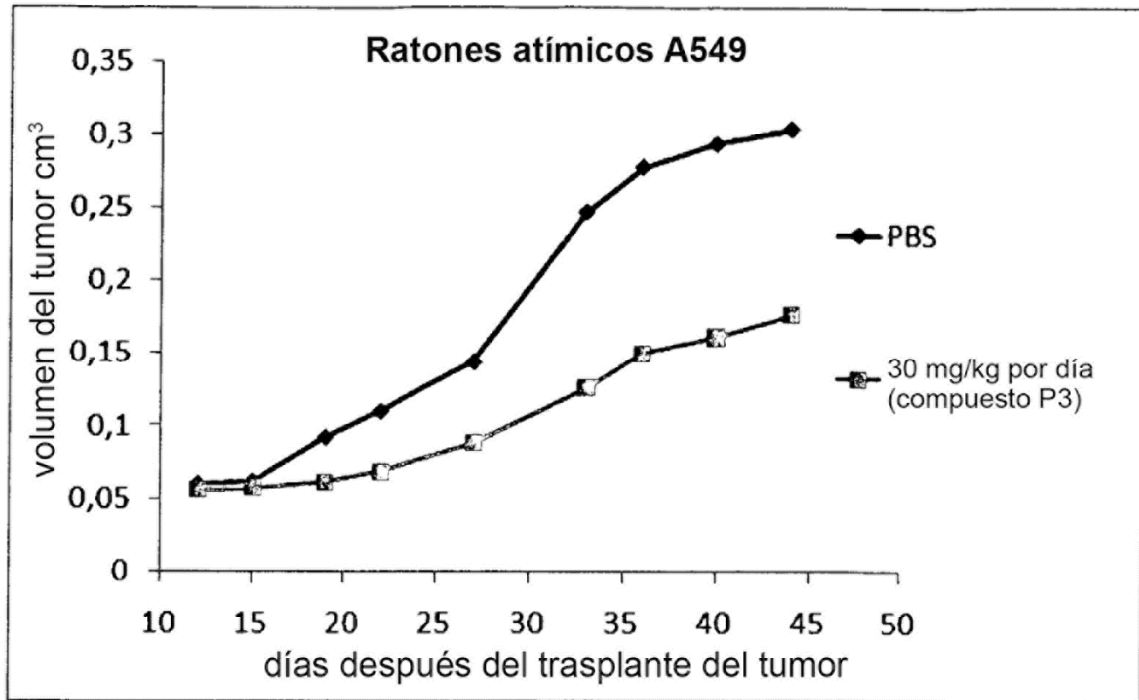
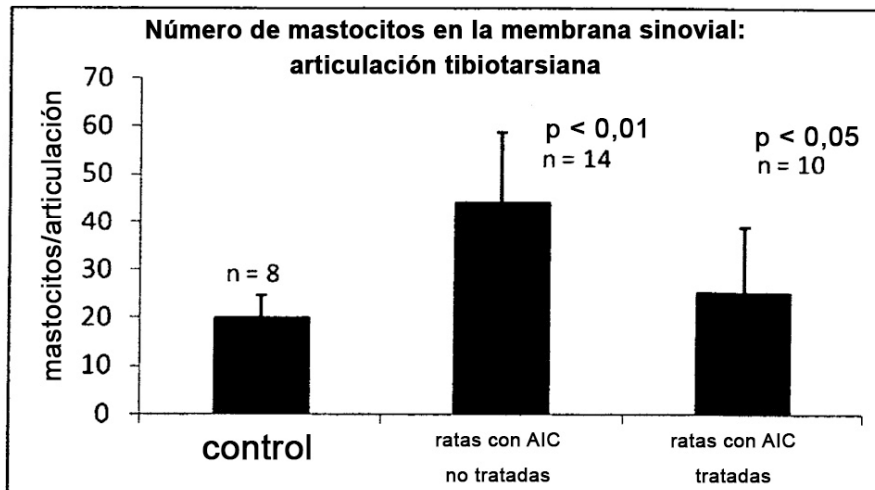
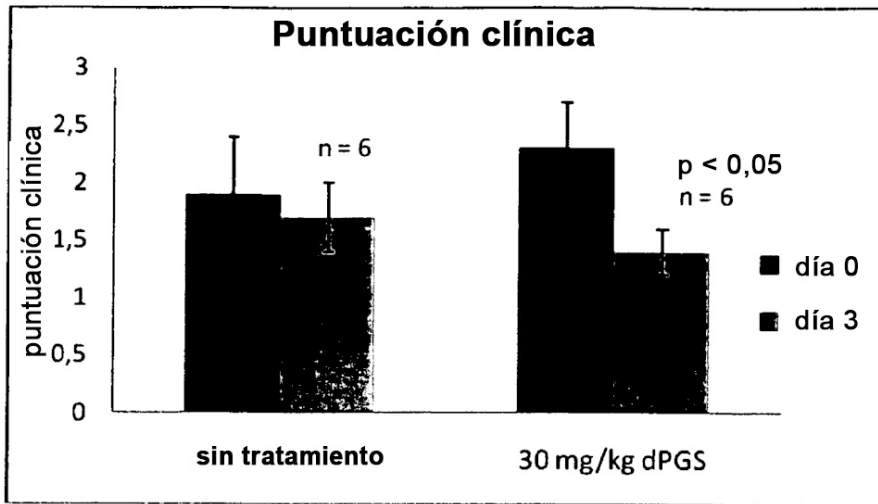
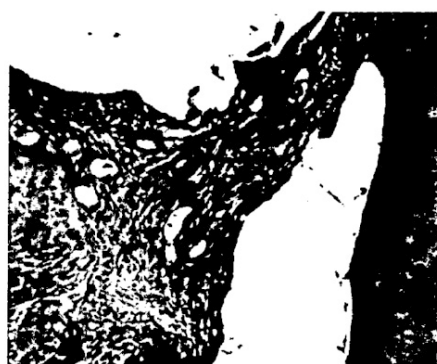


Figura 15



control



compuesto P3

Figura 16

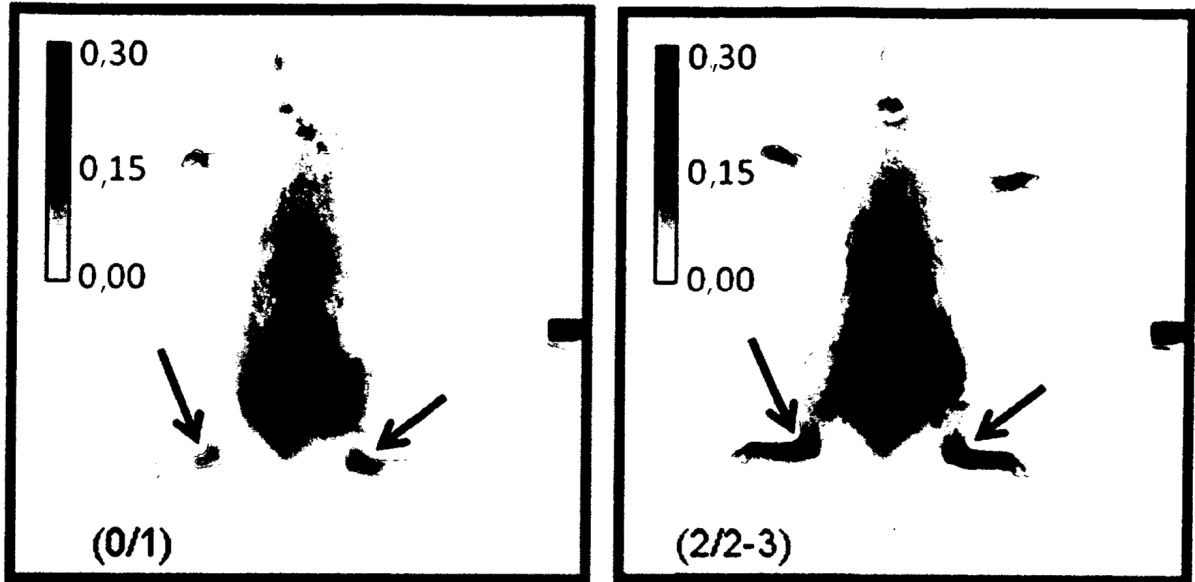


Figura 17



Figura 18

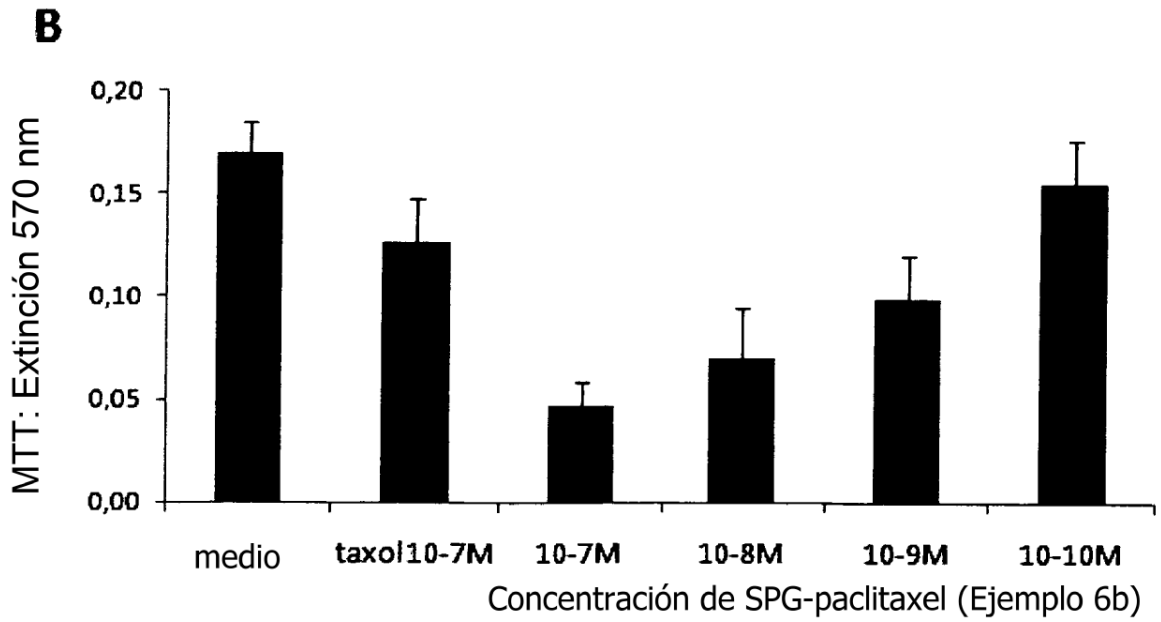
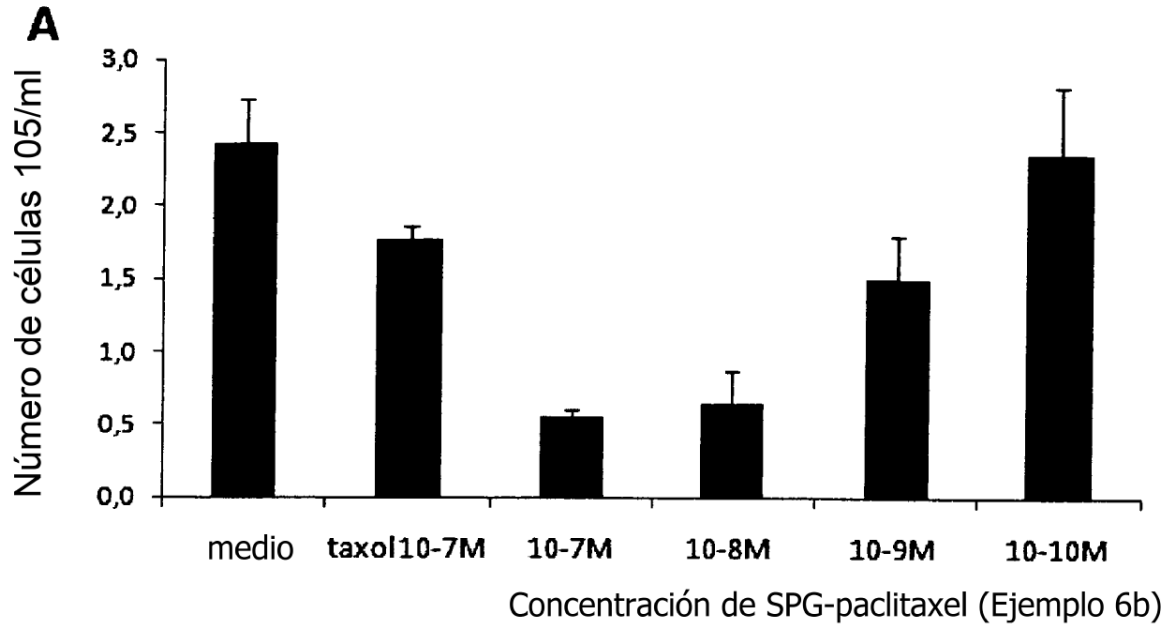


Figura 19

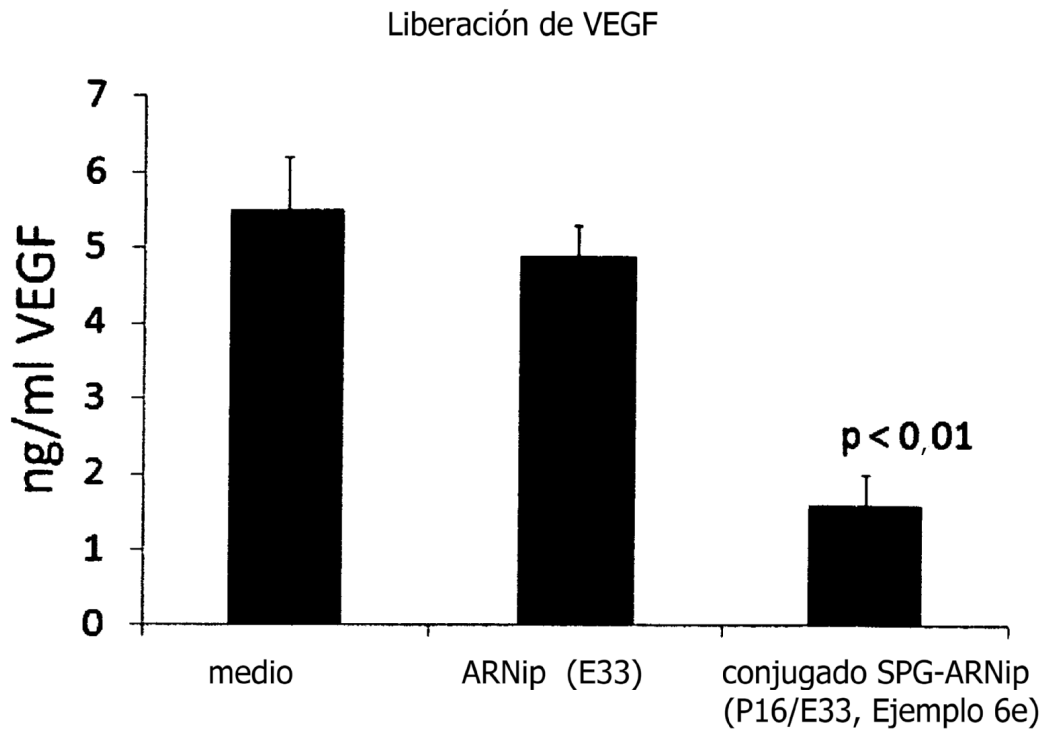
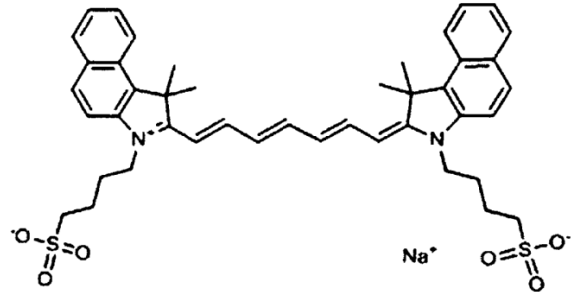
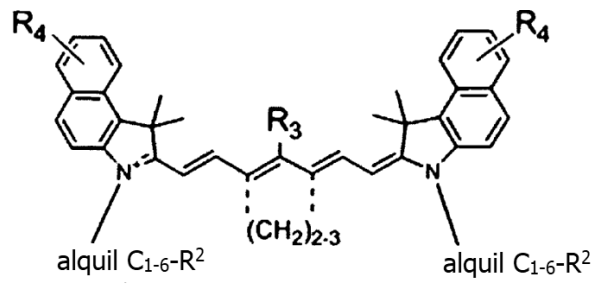


Figura 20

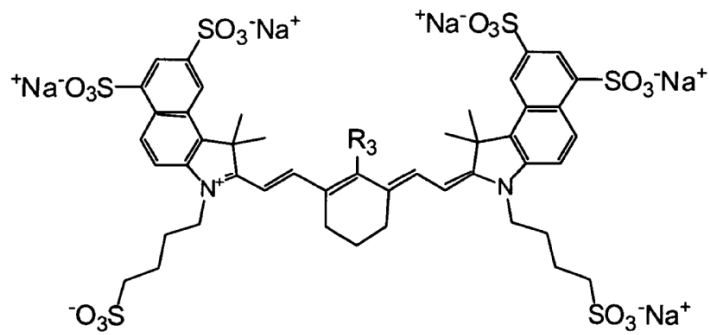
a)



b)



c)



d)

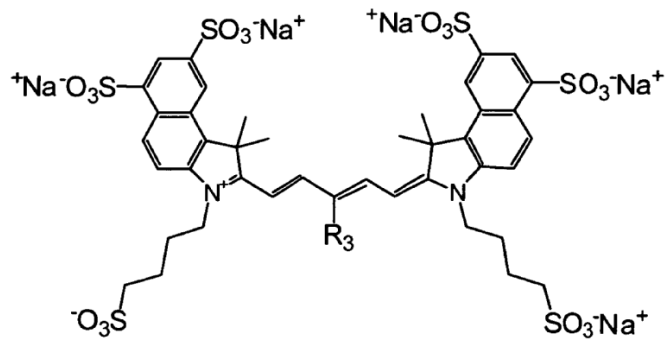


Figura 21

