

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 708**

51 Int. Cl.:

C07K 2/00 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
C08G 69/10 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2012** **PCT/ES2012/070740**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013** **WO13060919**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2012** **E 12843959 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 2772497**

54 Título: **Síntesis controlada de poliglutamatos con baja polidispersidad y arquitecturas versátiles**

30 Prioridad:

24.10.2011 ES 201131713 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2021

73 Titular/es:

**FUNDACION DE LA COMUNIDAD VALENCIANA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE
(100.0%)
C/ E.P. Avda. Autopista del Saler 16-3, Junto al
Oceanográfico
46013 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**VICENT DOCÓN, MARÍA JESÚS;
BARZ, MATTHIAS;
CANAL, FABIANA;
CONEJOS SÁNCHEZ, INMACULADA;
DURO CASTAÑO, AROA y
ENGLAND, RICHARD MARK**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 835 708 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

Síntesis controlada de poliglutamatos con baja polidispersidad y arquitecturas versátiles

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al control de la polimerización de N-carboxianhídridos de alfa-aminoácidos (NCAs) a través del uso de sales no nucleofílicas con la finalidad de obtener polipéptidos con bajos índices de polidispersidad, (como homopolímeros, polímeros dibloque, tribloque o sistemas multibloque) con arquitecturas altamente versátiles, 10 , así como a procesos para la preparación de los mismos, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en medicina.

Antecedentes de la invención

15 Un polímero ideal para ser usado como portador en la liberación de fármacos o agente para el diagnóstico de imagen molecular debe caracterizarse por poseer (i) biodegradabilidad o un peso molecular adecuado que evite su acumulación progresiva *in vivo*, (ii) baja polidispersidad, de manera que asegure una homogeneidad aceptable del sistema final permitiendo ajustar las propiedades farmacocinéticas del mismo; (iii) tiempo elevado de residencia en el cuerpo, para prolongar la acción del conjugado o permitir su distribución y acumulación en los compartimentos 20 deseados del cuerpo (por lo tanto, se prefieren pesos moleculares elevados) y (iv) en el caso de conjugación de proteínas, un único grupo reactivo para evitar reacciones de entrecruzamiento ("*crosslinking*"), mientras que para el caso de conjugación de fármacos pequeños, es preferible que el portador contenga varios grupos reactivos que permitan modular y optimizar la carga del fármaco (polímeros multivalentes).

25 Debido a su naturaleza implícita, los polímeros presentan diversos retos a la hora de su desarrollo farmacológico. Un fármaco manufacturado debe ser homogéneo y estar compuesto por una única especie definida. Por el contrario, todos los polímeros sintéticos son inherentemente heterogéneos y, como macromoléculas pueden presentar diversos desafíos en su caracterización. El control exhaustivo de parámetros cruciales como el peso molecular, la polidispersidad, la localización de las cargas o el balance hidrofobia-hidrofilia es un requisito para modular la 30 biodistribución, el destino final, la actividad biológica y la toxicidad.^{1,2} El peso molecular medio se expresa en terminos de "peso molecular promedio, en peso" (M_w) y "peso molecular promedio en número" (M_n), y el cociente M_w/M_n proporciona una medida de la dispersidad D .

Por lo tanto, existe un creciente interés y una necesidad en el desarrollo de metodologías para la obtención de 35 sistemas poliméricos biodegradables con mayores pesos moleculares, controlando la homogeneidad de los mismos en el proceso, y permitiendo un alto grado de versatilidad para ser posteriormente implementados en diversas necesidades clínicas.

La polimerización por apertura de anillo (ROP del acrónimo inglés "*ring-opening polymerisation*") de N- 40 carboxianhídridos de aminoácidos (NCAs) es la técnica de polimerización más amplia y comúnmente aplicada para obtener polipéptidos y copolímeros de bloque basados en polipéptidos en escala multigramo. A pesar de que los polímeros obtenidos son menos definidos que los péptidos producidos por un organismo natural, este método de polimerización permite el acceso a arquitecturas poliméricas que están por encima de las posibilidades de la naturaleza. Además, la apertura de anillo de NCAs ya ha sido empleada en varias aplicaciones dentro de diferentes 45 campos de la ciencia. Dichas aplicaciones van desde el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos o agentes moleculares de imagen a materiales para recubrimiento de superficies²⁻⁶

Como ejemplo prominente del uso de polimerización de NCAs debe mencionarse el conjugado de ácido poliglutámico (PGA) y paclitaxel (Opaxio®, formalmente Xyotax, PPX, CT-2103). El conjugado polímero-fármaco se 50 encuentra en fase clínica III⁷⁻⁹ lo que pone de manifiesto la importancia del método de polimerización de NCAs para la preparación de polipéptidos sintéticos definidos. El ácido poliglutámico es un material prometedor para el diseño de nanomedicinas debido a su elevada biocompatibilidad, multivalencia y a su degradabilidad *in vivo* mediada por tiol proteasas (Catepsina B).¹⁰⁻¹¹

55 Desde el punto de vista histórico, la polimerización de NCAs es un método relativamente antiguo ya que fue descubierto por Leuch al inicio del siglo XX.¹²⁻¹⁴ Desde entonces, se han estudiado y publicado diferentes metodologías de polimerización.¹⁵⁻¹⁷ Hasta el momento las aproximaciones químicas más prometedoras se basan en la iniciación de NCAs purificados con aminas primarias combinado con el uso de técnicas de alto vacío,¹⁸⁻²⁰ el uso de sales hidrocílicas de amonio como iniciadores,²¹ catalizadores basados en metales pesados²²⁻²⁴ o 60 hexametildisilazanos (HMDS).²⁵⁻²⁶ Hideharu Mori et. al., Polymer 48 (2007) 5867-5877 divulga la polimerización por apertura de anillo del gamma-bencil-L-glutamato-N-carboxianhídrido en un líquido iónico que es tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio ([BMI][BF₄]) para producir polímeros basados en aminoácidos con una polidispersidad más estrecha.

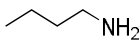
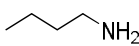
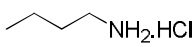
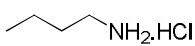
Sin embargo, la mayoría de estos métodos poseen limitaciones para la síntesis de polipéptidos bien definidos. Por ejemplo, las aminas hexametildisilazanos (HMDS) son sensibles a reacciones de hidrólisis, y los catalizadores basados en metales pesados deben eliminarse posteriormente a la polimerización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

- 5 La iniciación normal basada en el uso de aminas primarias proporciona en la mayoría de los casos un control reducido debido al propio proceso de polimerización. Existen reacciones secundarias que interfieren en el proceso de polimerización, especialmente cuando se requieren elevados grados de polimerización o arquitecturas complejas. En general, los poliglutamatos con un peso molecular en el rango entre algunos miles y 50 kg/mol PDIs de 1,2 a 1,5 se encuentran descritos en literatura¹⁷. PDIs superiores se atribuyen con toda probabilidad al hecho de que la polimerización de NCAs sufre de la presencia de reacciones secundarias. La más importante de ellas es la que se conoce como proceso del "monómero activado" ("Activated Monomer") que tiene lugar por la desprotonación de una molécula de monómero NCA. El anión generado en el NCA es lo suficientemente nucleofílico como para iniciar la oligomerización de NCAs. Los compuestos N-aminoacil NCA formados en el proceso pueden tanto añadirse a la cadena en propagación como llevar a cabo procesos de autocondensación, estos últimos produciendo elevados pesos moleculares a elevados a elevadas conversiones de monómero. Debido a que las aminas primarias pueden actuar como nucleófilos y como bases, el proceso de polimerización oscilará siempre entre el mecanismo de "amina" y el de "monómero activado" (NAM).
- 20 Disminuyendo la temperatura de reacción, los polipéptidos obtenidos son más definidos, debido a se suprimen diversas reacciones secundarias, sin embargo, ello implica un aumento de los tiempos de reacción de entre 2 a 4 veces, conllevando también una disminución en el rendimiento.²⁷⁻²⁹ Sin embargo, para la producción de copolímeros de bloque (di-, tri- o multibloque), la polimerización de NCAs debe proceder preferentemente con altas conversiones *via* el mecanismo de "amina", es decir, apertura de anillo nucleofílica de la NCA dando lugar a grupos terminales bien definidos. El control sobre los grupos terminales poliméricos es esencial en la metodología de síntesis de arquitecturas multibloque.³⁰

El mecanismo del "monómero activado" debería evitarse con la simple adición de un ácido, de manera que se induzca la reprotonación de los eventualmente formados aniones NCAs. Estos autores investigaron la reacción estequiométrica entre NCAs y los hidroclouros de aminas primarias para la preparación de derivados aminoacilos. Schlaad y colaboradores usaron este método para preparar copolímeros de bloque basados en poliestireno.²¹

La desventaja de esta aproximación es el hecho de que el ion cloruro como tal puede actuar como nucleófilo o como base, desprotonando el monómero NCA y por lo tanto, dando lugar a reacciones secundarias, e.g., iniciación de la apertura de anillo mediante el mecanismo de monómero activado (AMM) tal como demostró Schlaad²¹ y fue reproducido en nuestro laboratorio (para los datos analíticos de la polimerización inducida por HCl para los NCAs basados en ácido glutámico se incluye a modo de comparación (ver Tabla 1)).

Tabla1. Comparación entre la aproximación basada en el uso de aminas normales y la técnica de polimerización NCA de Schlaad

Iniciador	P	[M]/[I]	DP Calc.)) (calc.) a)	DP 1 ^H - NN MR	[M] Mol/L	t reacción (d)	Rdto (%)	Mn KDa	Mw KDa	PDI
NAM  	1	100	77	41	0,38	3	77	20,3	25,4	1,25
	2	400	300	59	0,38	3	75	22,4	31,9	1,4
	3	1600	1328	60	0,38	3	83	20,5	28,3	1,4
Schlaad  	4	100	60	36	0,38	3	60	4,4	5,6	1,3
	5	400	288	55	0,38	3	72	18,1	27,2	1,5
	6	1600	1168	90	0,38	3	73	20,7	31,2	1,5

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

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

5

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

10 Explicación de la invención

La presente invención se realizó en vista del estado de la técnica descrito arriba, y el objeto de la presente invención es aumentar el grado de polimerización (DP), obtener una versatilidad estructural y disminuir el índice de polidispersabilidad (PDI) de los polipéptidos obtenidos mediante la polimerización de N-carboxianhídridos de alfa-aminoácidos (NCAs).

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

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona sólo a título informativo.

Descripción de las figuras

FIGURA 1: Espectro de ¹H-RMN del gamma-bencil L-glutamato N-Carboxianhídrido (NCA).

FIGURA 2: Espectro de ¹H-RMN de las polimerizaciones realizados con las sales de n-butil tetrafluoroborano a diferentes índice de polimerización **[M]/[I]** en DMF.

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

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

FIGURA 5: Espectro de ¹H-RMN del ácido n-butil-alfa-poliglutámico correspondientes al lote de escalado de 5 gramos tras la desprotección. DP=252 como se confirma por RMN.

FIGURA 6: Espectro de ¹H-RMN de un derivado del PGA modificado con propargilamina.

FIGURA 7: Espectro de ¹H-RMN de un derivado del PGA modificado con grupos oligoEG-azidas.

FIGURA 8: Espectro de ¹H-RMN de un copolímero resultante del acoplamiento entre PGA-propargilamina con NH₂PEG(2)N₃.

40

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

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

45

FIGURA 10A: Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green (TB-OG50 [P: 41 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa], TB-OG100 [P: 42 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa], y TB-OG200 [P: 43 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa]). Estudios mediante citometría de flujo a 37°C y a 4°C (inhibición de mecanismos de internalización celular dependientes de energía como endocitosis).

50

FIGURA 10B: Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green (TB-OG50 [P: 41 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa], TB-OG100 [P: 42 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa], y TB-OG200 [P: 43 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG2000-OMe, R₃=ONa]). Microscopía Confocal *in vivo* en células HeLa a diferentes tiempos de incubación (5 min, 30 min, 1h, 2h y 5h). Las imágenes corresponden a la internalización de TB-OG (verde) en presencia de marcador de membrana lipídica (rojo) a 1h y 5h.

55

FIGURA 11A: Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green. Estudios mediante citometría de flujo a 37°C y a 4°C (inhibición de mecanismos de internalización celular dependientes de energía como endocitosis) (TB-OG200_4TP [P: 43 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG3000-S-S-4TP, R₃=ONa], TB-OG400_4TP [P: 44 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG3000-S-S-4TP, R₃=ONa] y TBOG800_4TP [P: 44 donde R₁= MeO-PEG2000, R₂=-NH-PEG3000-S-S-4TP, R₃=ONa]).

60

FIGURA 11B: Cinética de internalización celular con los tribloques sintetizados y marcados con oregon green.

Microscopía confocal in vivo en células HUVEC con TB-OG200_TP a 2h de incubación. Marcador lisosomal Dextran Texas Red (rojo).

FIGURA 12A: Medidas de fluorescencia del suero mediante espectrofluorímetro a los diferentes tiempos de sacrificio del animal y los consecuentes tratamientos del suero: medida directa del suero (■), medida del sobrenadante tras la homogenización con HClO_4 (■), medida tras el lavado del pellet con metanol (■) y medida tras el lavado del pellet con acetonitrilo (■).

FIGURA 12B. Medidas de la fluorescencia de los distintos órganos homogenados (hígado, riñón, intestino, bazo, cerebro, musculo, cerebelo y pulmón) tras 4 y 24h post inyección. TB=TB200 [P:34 donde X=-S-S-4TP], TBO 4= TB-OG200_4TP [P: 43 donde $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$, $R_2 = \text{-NH-PEG3000-S-S-4TP}$, $R_3 = \text{ONa}$], (4h), TBO 24= TB-OG200_4TP [P: 43 donde $R_1 = \text{MeO-PEG2000}$, $R_2 = \text{-NH-PEG3000-S-S-4TP}$, $R_3 = \text{ONa}$], (24h).

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

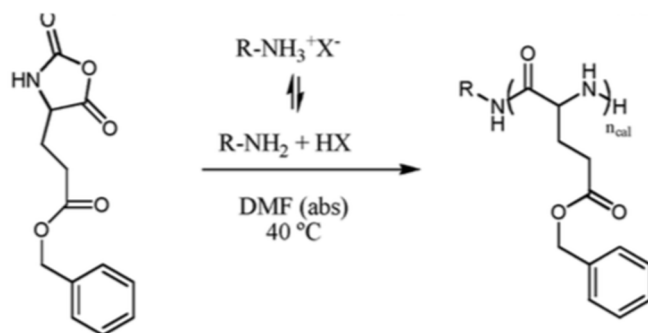
FIGURA 14A: Imagen por resonancia magnética de la cabeza de la rata antes de la inyección del compuesto TB800-DTPA/Gd

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

FIGURA 15. Imagen obtenida mediante PET/CT. Monitorización del PGA-DOTA⁶⁸Ga (50,5 μCi). (A) Estructura del PGA-DOTA-⁶⁸Ga utilizado en este ejemplo. Corte sagital 18 min después de administración i.v., adquisición imagen 60 min. Eliminación vía renal del portador polimérico. (B) Corte sagital, ventral y dorsal.

Descripción detallada de la invención

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



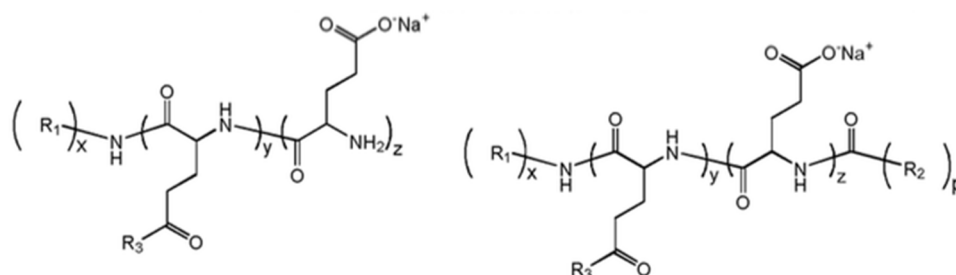
donde:

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

n representa el número de unidades de gamma-bencilglutamato en el polímero en el rango de 1 a 1000 unidades

Las sales de tetrafluoroborano de amonio pueden ser preparadas mediante una metodología simple que incluye la reacción de la correspondiente amina con el complejo de ácido tetrafluorobórico $\text{HBF}_4 \cdot \text{OEt}_2$, seguida de un sencillo proceso de purificación y posterior almacenaje sin detectar descomposición o impurezas en el producto final.

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



donde:

- 5 R1 representa un grupo alquilo, grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes tamaños incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 10000 g/mol).
- R2 representa un grupo alquilo, grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes tamaños incluyendo polietilenglicol (PEG, de un Mw desde 100 a 10000g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.
- 10 R3 representa un grupo alquilo, grupo de unión C-terminal definido ((alquino, azida, tioles activados, haluros, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes tamaños incluyendo polietilenglicol (PEG, desde n=2 a n=16); aminoácidos tales como lisina, arginina, imidazol e histidina, cisteína y grupos amino secundarios y terciarios.
- 15 x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500
y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 500
z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000
p representa unidades de monómero incluidos en definición R3, de 1 a 500

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

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

- 30 En distintas realizaciones particulares de la invención R representa el grupo n-butil, R1 representa el m-PEG, R2 representa PEG que opcionalmente posee un grupo terminal funcional (incluyendo -OH, -SH, -S-S-4TP, cualquier derivado -S-protégido, -NH₂, alquino, azida, o maleimida) con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno. En otra realización R3 representa -EG-alquino, EG-azida, alquilo, opcionalmente sustituido. En otra realización R3 representa -(CH₂)₂-fenilo opcionalmente sustituido con uno ó más sustituyentes seleccionados entre
- 35 halógeno. En otra realización R3 representa complejos de coordinación, como por ejemplo Gd-DTPA ó Ga-DOTA, Tc-DTPA, Cu-poliamina.

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

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

- La presente invención se refiere al proceso de preparación de los nuevos compuestos descritos anteriormente, formas tautoméricas, esteroisómeros, polimorfos, sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatados de los
- 45 mismos.

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

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

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

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

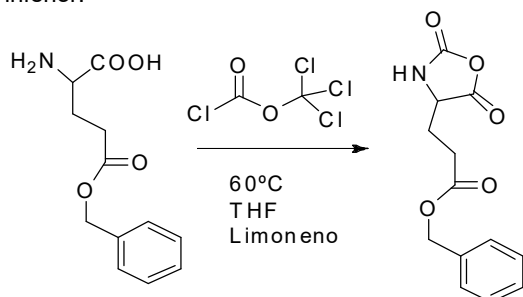
- 65 En una realización de la invención, la composición farmacéutica está en forma de nanoesferas, micropartículas y

nanopartículas.

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

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

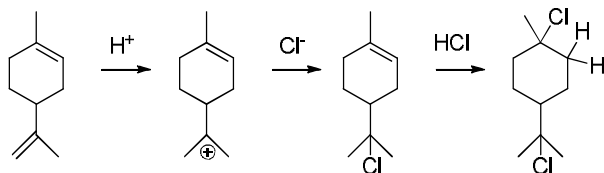
10 inferior.



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

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

- El mecanismo de la reacción implica la fosgenación directa de alfa-aminoácidos desprotegidos. La ciclación tiene lugar a través de la formación de intermedios N-cloroformil aminoácidos y la posterior pérdida de una segunda molécula de HCl da lugar al NCA. La reacción genera 2 equivalentes de HCl por molécula de NCA. El HCl, como se ha mencionado anteriormente, puede iniciar la autodegradación del monómero NCA. En esta invención, se ha incorporado el limoneno a las condiciones de reacción para neutralizar el HCl por adición a los dobles enlaces de la molécula. No se pueden utilizar aminas u otras bases fuertes debido a que atacarían al monómero formado, dando lugar a su descomposición. Por el contrario, el limoneno (casi no nucleofílico/básico) actúa como un neutralizador de HCl. En el siguiente esquema se muestra el mecanismo de acción del limoneno.



- La ausencia de HCl en los NCAs purificados se confirma mediante el uso de una disolución de nitrato de plata. La presencia de HCl puede ser identificada mediante la precipitación de cloruro de plata cuando se añaden unas gotas de una disolución 1M de AgNO_3 sobre una disolución de monómero. La pureza del monómero es un criterio indispensable a la hora de asegurar su almacenamiento a largo plazo. Para comprobarlo se realizaron estudios de estabilidad del monómero en diferentes condiciones de almacenamiento. Los resultados se muestran en la tabla siguiente donde el símbolo "—" significa que el monómero se encontró polimerizado/ descompuesto y el "+" que el monómero se encontraba estable.

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

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

T.A: Temperatura ambiente

Por lo tanto, se estableció en el protocolo estándar el almacenamiento del monómero a temperatura de -23°C y 5 condiciones de atmósfera inerte.

Método experimental detallado:

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, provisto de un agitador magnético, una columna de reflujo, un embudo de adición compensada y una entrada y salida de argón, se añadió H-L-Glu(OBzl)-OH (17g, 71,66 mmol). El sistema se purgó con Ar durante 5 minutos. Posteriormente se añadió THF (120 mL, anhidro) y la mezcla se calentó a 60°C. A continuación, se añadió limoneno (11,6 mL, 71,66 mmol, 1Eq) a la suspensión, continuando la agitación antes de añadir las cantidades correspondientes de difosgeno (5,2 mL, 8,5g, 43 mmol, 0,6 Eq) disuelto en THF (10 mL, anhidro) mediante un embudo de adición durante un periodo de 10 minutos. La reacción se dejó agitar durante 2 horas a 60°C con constante purga de Ar, dando lugar a una disolución completamente clara. La mezcla de reacción se burbujeó con Ar para eliminar el HCl remanente durante 2 horas, mientras que la salida de Ar se conectó directamente a una disolución 1M de NaOH para neutralizar el gas. Posteriormente, el volumen de la reacción se concentró a un cuarto de la mitad del volumen original y se añadieron 32 mL de acetato de etilo. El contenido de la reacción se precipitó en hexano frío (200 mL) para dar lugar a un precipitado blanco que se aisló por filtración y se lavó con hexano frío.

El sólido se recrystalizó en tolueno (50 mL, anhidro) y THF (30 mL, anhidro), bajo atmósfera inerte (N₂ o Ar) usando un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL provisto de un agitador magnético, una columna de reflujo y una salida y entrada de argón, induciendo la cristalización mediante la adición gota a gota de hexano frío (27 mL). La solución se almacenó durante una hora a 4°C y posteriormente a -20°C durante una noche. Finalmente, los cristales blancos formados se filtraron bajo condiciones de atmósfera inerte usando técnicas Schlenk y fueron almacenados a -20°C.

Para asegurar que el HCl residual se ha eliminado por completo, 2-4 mg de NCA se disolvieron en 0,5 mL de THF y fueron añadidos a una 1 mL de una disolución 1M de nitrato de plata, sin que se produzca ningún precipitado. Cuando los iones Ag⁺ y Cl⁻ coinciden en disolución dan lugar a la formación de la sal insoluble AgCl, que puede ser fácilmente detectada. Otro control se basa en el chequeo de la solubilidad en THF ya que mientras que el monómero es completamente soluble en THF, y se puede apreciar una ligera turbidez en la disolución si no está completamente libre de hexano (dicha turbidez debe desaparecer al calentar), una clara precipitación se observa si hay presencia de material de partida (no solubles en THF).

Rendimientos: 70-80%. Punto de fusión: 93,4°C. Fórmula molecular: C₁₃H₁₃NO₅. Bencil 3-(2,5-dioxoxazol-4-il)propanoato. Peso Molecular: 263,25 g/mol ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,29 (m, 5H), 6,84 (s, 1H), 5,07 (s, 2H), 4,32 (t, J = 6,2 Hz, 1H), 2,52 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,31 – 1,94 (m, 2H). El espectro de ¹H -RMN del producto puro se adjunta en la Figura 1.

Método general para la preparación de sales de BF₄⁻*Síntesis de la sal tetrafluoroborano de n-butilamonio*

Se disolvió butilamina (200 mg, 2,7 mmol) en 1 mL de dietil eter, y 442 mg (2,7 mmol) de complejo del ácido tetrafluorobórico, HBF₄.Et₂O, se añadieron a la disolución para dar lugar a la formación de un sólido blanco en rendimiento casi cuantitativo. El producto se filtró y recrystalizó dos veces de acetato de etilo. Posteriormente, el producto se secó a alto vacío y se almacenó a -20°C. Rendimiento: 50%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,58 (s, 3H), 2,84 – 2,71 (m, 2H), 1,56 – 1,43 (m, 2H), 1,39 – 1,25 (m, 2H), 0,89 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 38,64, 29,09, 19,08, 13,49. EA: C: 29,61% (calc.: 29,85%), H: 7,27% (calc.: 7,51%), N: 8,60% (calc.: 8,70%).

Síntesis de la sal tetrafluoroborano de neopentilamina

A 5 ml (5,59 g, 36,74 mmol) del complejo del ácido tetrafluorobórico, $\text{HBF}_4(\text{Et}_2\text{O})$, se añadieron 4,31 ml (3,20 g, 36,74 mmol) de neopentilamina. La adición resultó en la formación de un precipitado blanco. Tras eliminación del disolvente el sólido se recristalizó dos veces de acetato de etilo y lavado con ciclohexano. Finalmente, el producto se secó a vacío. Rendimiento: 42% de sólido blanco. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7,58 (s, 3H), 2,63 (s, 2H), 0,93 (s, 9H), ^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 49,94, 30,21, 26,78 EA: C: 34,35% (calc.: 34,43%), H: 7,99% (calc.: 8,06%), N: 8,07% (calc.: 8,00%).

10 *Síntesis de la sal tetrafluoroborano de sales de PEGamonio*

$\text{MeO}-\text{PEG}(2000)\text{-amina}$ (600mg, 0,3 mmol, 1892 g/mol) se disolvió en 3 mL de THF y se añadió a la disolución 53,4 mg (0,3 mmol, 45 μL) del complejo del ácido tetrafluorobórico, $\text{HBF}_4\cdot\text{Et}_2\text{O}$, dando lugar a la formación de una sal ligeramente amarilla en rendimiento cuantitativo. Tras eliminar el disolvente el producto se secó bajo alto vacío y se almacenó a -20°C . Rendimiento: cuantitativo. ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm): 7,69 (s, 3H), 3,78 – 3,70 (m, 2H), 3,52 (d, J = 5,4 Hz, 139H), 3,47 – 3,39 (m, 6H), 3,24 (s, 3H), 3,06 – 2,91 (m, 2H).

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

20 Gamma-bencil L-glutamato N-carboxianhídrido (0,6g, 2,27 mmol, $M_w=264$ g/mol) se añadió a un Schlenk provisto con un agitador magnético, un tapón y se purgó 3 veces con ciclos vacío/argón, bajo un flujo de Ar. El sólido blanco se disolvió en 5 mL del correspondiente disolvente recién destilado. Acto seguido, se añadió el iniciador y la mezcla de reacción se dejó agitando a 40°C en un baño de aceite durante 3 días bajo condiciones de atmósfera inerte. Tras tres días de reacción, la disolución se precipitó en 40 mL de éter frío dando lugar a un sólido blanco en suspensión que se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sólido se suspendió en agua milliQ y se liofilizó.

25 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMF}-d_7$) δ 8,58 (s, 1H), 7,42 (s, 5H), 5,19 (s, 2H), 4,21 (s, 1H), 2,81 (s, 2H), 2,45 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMF}-d_7$) δ 175,94 (s), 172,26 (s), 162,77 – 162,18 (m), 161,98 (s), 136,76 (s), 128,87 – 127,75 (m), 66,05 (s), 57,13 (s), 35,41 – 34,17 (m), 32,48 (s), 30,84, 30,30 – 29,04 (m), 27,28 (s), 25,99 (s).

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

Cinética de polimerización NCA.

35 Gamma-bencil L-glutamato N-carboxianhídrido (0,6g, 2,27 mmol, $M_w=264$ g/mol) se disolvió previamente en 6 mL de DMF previamente destilado. El contenido se repartió en 6 Schlenk provistos de un agitador magnético y un tapón en bajo condiciones de atmósfera inerte. Posteriormente, se preparó una disolución en DMF, del iniciador y la cantidad correspondiente del mismo se añadió a cada tubo. Las mezclas de reacción se dejaron agitando durante 4 días a 40°C en un baño de aceite bajo condiciones de atmósfera de Ar/N_2 a presión constante. Se tomaron puntos para la construcción de la cinética de polimerización a tiempos siguientes: 14, 22, 38, 46, 70, y 96 horas, por precipitación de los polímeros en éter dietílico tres veces, liofilización de la muestra en agua, y análisis del peso molecular por GPC eluyendo con DMF/LiBr .

45 Como ejemplo, en la tabla 3 se muestran algunos resultados obtenidos en diferentes polimerizaciones con varios iniciadores basados en sales de BF_4^- , dos de ellos son iniciadores pequeños, como tetrafluoroborano de n-butilamonio o tetrafluoroborano de neopentilamonio, que dan lugar a homopolímeros de glutamato, y un macroiniciador basado en metoxipolietilenglicol de peso molecular cercano a 2,000 y PDI: 1,03, dando lugar a copolímeros híbridos dibloque PEG-poli(gamma-bencil-glutamatos). El iniciador tetrafluoroborano de neopentilamonio se usó reemplazando al de n-butilamina para así facilitar la caracterización del polímero por ^1H -NMR. Esto se debe a la presencia de 9 protones químicamente equivalentes en el iniciador (los pertenecientes a los tres grupos metilo) lo que conlleva un aumento en la sensibilidad de la caracterización del polímero por H-RMN.

55 **P:** polímero; $[\text{M}]/[\text{I}]$: cociente monómero Iniciador; **DP:** grado de polimerización (% of $[\text{M}]/[\text{I}]$); **Mw:** peso molecular medio en peso; **Mn:** peso molecular medio en número; **PDI:** índice de polidispersidad (cociente M_w/M_n que proporciona una medida de dispersidad D).

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

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

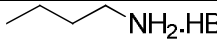
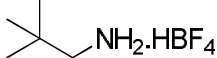
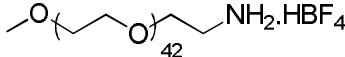
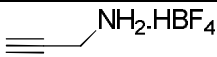
Iniciador	[M]/ [I]	DP (calc.)	DP ¹ H- NMR	[M] Mol/L	t de reac ción (d)	Rto (%)	Mn KDa	Mw KDa	PDI
BF ₄ sal de N-butilamonio	50	32	29	0,38	3	64	6,7	7,4	1,1
	100	64	60	0,38	3	64	13,8	15,2	1,1
	200	126	107	0,38	3	63	16,1	17,7	1,2
	300	147	143	0,38	3	49	20,7	23,5	1,1
	400	288	212	0,38	3	72	31,6	37,9	1,2
	800	424	-	0,38	3	53	48,4	63,0	1,2
	1600	816	-	0,38	6	51	94,4	112,2	1,2
BF ₄ sal de neopentilamonio	50	40	43	0,38	3	80	7,1	8,6	1,2
	100	81	-	0,38	3	81	14,4	18,7	1,2
	200	176	105	0,38	3	88	17,86	22,31	1,2
	1200	960	-	0,38	3	80	156,5	191,1	1,2
BF ₄ sal de PEG(2000)amonio	50	36	38	0,38	3	73	7,0	9,4	1,2
	100	81	79	0,38	3	81	13,9	18,1	1,2
	200	160	148	0,38	3	80	18,4	24,7	1,2

Se adjuntan en la Figura 2, los espectros de ¹H-RMN de las polimerizaciones realizados con las sales de n-butil tetrafluoroborano a diferentes proporciones del cociente [M]/[I] en DMF; Figura 3 la representación del cociente [M]/[I] frente al Mn obtenido por GPC y Figura 4

Con DMF como disolvente se obtuvieron muestras monomodales con polidispersidades de bajas a muy bajas en todos los casos usando la técnica de polimerización de NCA basada en el uso de sales de BF₄-. Siguiendo con el proceso de optimización, el efecto de la temperatura también se estudió. A partir de la literatura mencionada en la introducción, se sabe que las bajas temperaturas se suprimen algunas reacciones secundarias pero se aumenta significativamente el tiempo de reacción. Temperaturas altas (60-80°C) resultaron en reacciones ligeramente coloreadas de amarillo en el caso de 60°C, y en reacciones muy amarillentas con 80°C, debido a la descomposición de DMF en dimetilamina y la rotura del grupo protector a temperaturas elevadas que produce alcohol bencílico que es de color amarillento. En conclusión, con el uso de temperaturas superiores a 60°C no se lograron buenos resultados en cuanto al control en la polimerización. Por otro lado, cuando se aplican bajas temperaturas, manteniendo como tiempo de reacción 3 días, se obtienen rendimientos relativamente bajos. Así, se estableció como temperatura idónea 40°C con DMF o entre 5-40°C con DMI. Parámetros como la concentración en el medio de reacción se optimizaron del mismo modo, estableciéndose como óptima 0,38 M con respecto al monómero en el caso de DMF. Se requiere trabajar dentro de un cierto rango de concentraciones para evitar polímeros menos definidos.

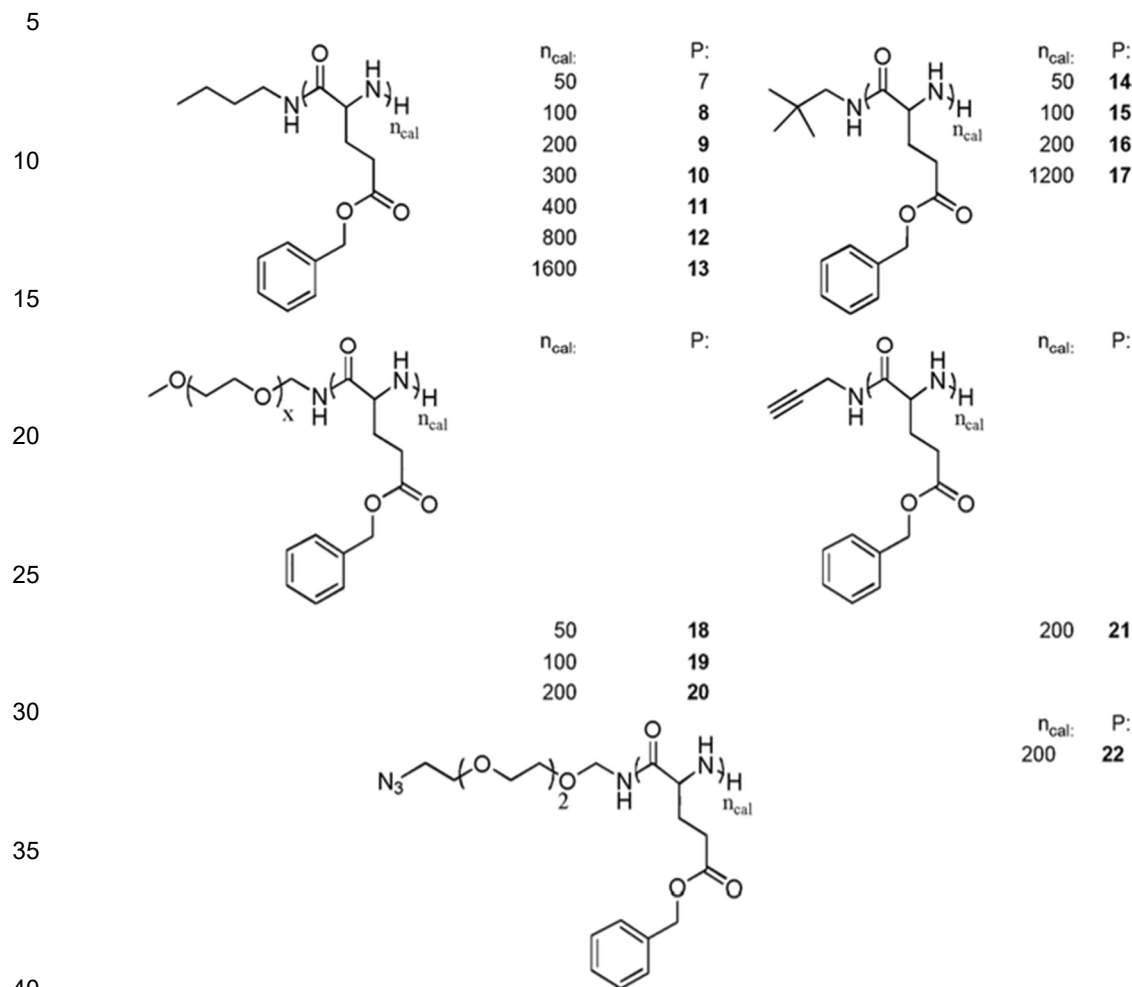
Para comprobar si la metodología propuesta es aplicable a cualquier tipo de iniciador, se probaron diferentes iniciadores basados en sales de BF₄ como propargil-NH₃BF₄ y N₃EG(2) NH₃BF₄. El uso de estas sales como iniciadores permite el acceso a polímeros con grupos alquino y azida en el extremo C-terminal del polímero que podrían usarse para una posterior bioconjugación. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos con los diferentes iniciadores usados.

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

Iniciador	P	DP (calc.)	DP (¹ H- NMR)	[C] M	t (d)	Rto (%)	Mn GPC (KDa)	Mw By GPC	PDI
 NH ₂ .HBF ₄	9	126	107	0,38	3	63	16,1	17,7	1,2
 NH ₂ .HBF ₄	16	176	105	0,38	3	88	17,86	22,31	1,2
 NH ₂ .HBF ₄	20	160	148	0,38	3	80	18,4	24,7	1,2
 NH ₂ .HBF ₄	21	168	-	0,38	3	84	16,5	22,1	1,3

	22	154	-	0,38	3	77	18,3	24,5	1,3
--	----	-----	---	------	---	----	------	------	-----

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



Las cantidades aproximadas usadas para cada polimerización se encuentran entre 0,5-1 gramo de monómero. Para validar la posibilidad de una aplicación industrial de la reacción y teniendo en cuenta que el ácido poliglútamico es la base polimérica de varios conjugados polímero-fármaco, la síntesis se escaló. Por ello, una vez que todos los anteriores resultados preliminares se evaluaron, la reacción se escaló cuatro veces, a 5 gramos, utilizando las condiciones optimizadas. En todos los casos, las PDI de los polímeros obtenidos estuvieron en el rango de 1,2-1,3 con rendimientos de reacción de entre 80-90% y pesos moleculares M_n : 31,47 KDa, PDI:1,26, ($[M]/[I]=333$); M_n :26,06 KDa, PDI:1,27, ($[M]/[I]=300$); M_n : 15,23 KDa PDI:1,18 ($[M]/[I]=200$) and M_n : 7,08 KDa PDI:1,19, ($[M]/[I]=50$) respectivamente como fueron determinados por GPC. En la Figura 5 se incluye espectro de $^1\text{H-RMN}$ del ácido n-butyl-alfa-poliglútamico correspondiente al lote de escalado de 5 gramos tras la desprotección. DP=252 como se confirma por RMN.

55 Métodos generales para la desprotección de poli(gamma-bencil-L-glutamatos)

Se estudiaron tres metodologías para la eliminación de los grupos bencilo protectores. La primera consiste en el uso de un medio ácido como HBr/TFA, la segunda utilizando hidróxido sódico en una mezcla de THF/agua a baja temperatura y la tercera, el uso de atmósfera de reducción de hidrógeno con $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ como catalizador. Los tres métodos dieron lugar a la completa desprotección de los grupos bencilo, sin embargo, la última opción está restringida a poliglutamatos de peso molecular menos de 10 kDa y además requiere de la eliminación del catalizador lo que conlleva a rendimientos bajos. Los polímeros fueron caracterizados mediante $^1\text{H-NMR}$ y por polarimetría

hasta conseguir valores constantes de $\sim 0,6$.

Desprotección de Poli(gamma-bencil-L-glutamato) con HBr en ácido trifluoroacético:

- 5 Se disolvieron 100 mg (0,0035 mmol, Mw: 28251 g/mol) de poli(gamma-bencil-L-glutamato) en 3 mL en ácido trifluoroacético (TFA) en un matraz de fondo redondo provisto con un tapón y un agitador magnético. Posteriormente, se añadieron 150 mg de HBr 48% (0,91 mmol, 2 equivalentes por grupo carboxilo), y la mezcla anaranjada se dejó agitar durante 5-8 horas.
- 10 Posteriormente, el producto se precipitó en un gran exceso de dietil-éter dando lugar a un sólido blanco que fue centrifugado eliminando la solución blanca. El producto se lavó tres veces con dietil-éter. Después, el producto se purificó por precipitación ácido-base (NaHCO_3 /HCl 6M), y se dializó para dar lugar a la forma sal sódica. Finalmente, para obtener la forma ácida, el producto se precipitó a pH 3 mediante la adición de algunas gotas de HCl 6M. Rendimiento: cuantitativo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D_2O) δ : 4,31-4,26 (m, 1H), 2,38-2,14 (m, 2H) 2,10-1,80 (m, 2H)

Desprotección de poli(gamma-bencil-L-glutamatos) con NaOH en THF/ H_2O

- Se disolvieron 100 mg (0.0035 mmol, Mw 28251 g/mol) de poli(gamma-bencil-L-glutamato) en 7 mL de THF a 4°C. Seguidamente se añadió gota a gota hidróxido sódico (27,36 mg, 0,684 mmol) disuelto en H_2O (1 mL) sobre la solución del polímero agitada vigorosamente y se dejó durante 16h. La solución se neutralizó con ácido acético, se evaporó el THF a vacío y el polímero resultante fue purificado directamente mediante dialysis. Rendimiento: cuantitativo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D_2O) δ : 4,31-4,26 (m, 1H), 2,38-2,14 (m, 2H) 2,10-1,80 (m, 2H)

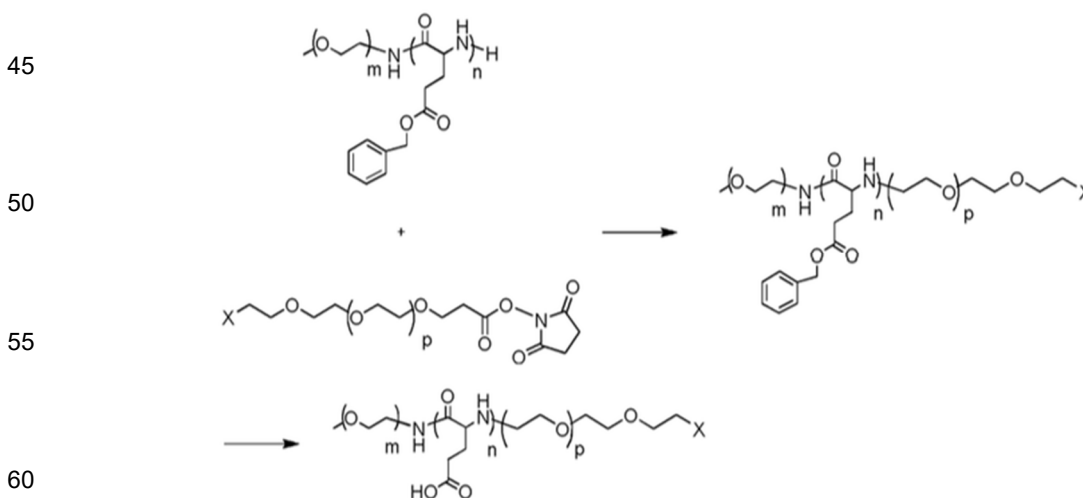
Desprotección de poli(gamma-bencil-L-glutamatos) reduciendo con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ sobre carbono en DMF:

- 25 Se disolvieron 100 mg (0,0035 mmol, Mw: 28251 g/mol) de poli(gamma-bencil-L-glutamato) en 15 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) absoluto, en un matraz de fondo redondo provisto de un septum y una agitador magnético. Seguidamente se añadió paladio sobre carbón activo al matraz que se purgó después con N_2 , y posteriormente con H_2 . La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante dos días en atmósfera inerte proporcionada por un globo de hidrógeno. El producto se precipitó sobre un gran exceso de dietil éter. Mediante centrifugación se obtuvo una mezcla de un sólido blanco con paladio/carbono. El sólido se redisolvió en agua ácida y se filtró a través de una columna de celita en una jeringa y unajeringa y un filtro. Como resultado, se obtuvo PGA como polvo blanco. Rendimiento: 40%.

Arquitecturas versátiles (Sistemas dibloque y tribloque).

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

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



donde:

- X representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales,

ácidos carboxílicos activados)

m representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG utilizado como primer bloque, de 1 a 500

n representa el número de unidades de γ -bencil glutamato del bloque peptídico. 1 a 1000

5 p representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG del tercer bloque, de 1 a 500

Para la obtención de TB50: se disolvieron 750 mg (0,058 mmol, Mw= 12854 g/mol) de DB50 en CH_2Cl_2 anhidro, el pH de la disolución fue ajustado a 8,0 con DIEA y a continuación se añadieron al matraz de reacción 209 mg (0,104 mmol, Mw= 2007 g/mol) de mPEG-NHS. La reacción se dejó bajo agitación toda la noche. Después, el producto fue
10 purificado mediante extracciones: primero con una disolución de NaOH 0,1N, seguida de una extracción con cloruro sódico y finalmente con HCl 0,1N. La fase orgánica fue recogida, secada sobre SO_4Na_2 , filtrada y concentrada mediante vacío. La solución concentrada fue precipitada sobre dietiléter frío. Tras 2h a -20°C , el polímero precipitado fue filtrado, lavado y secado a vacío.

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

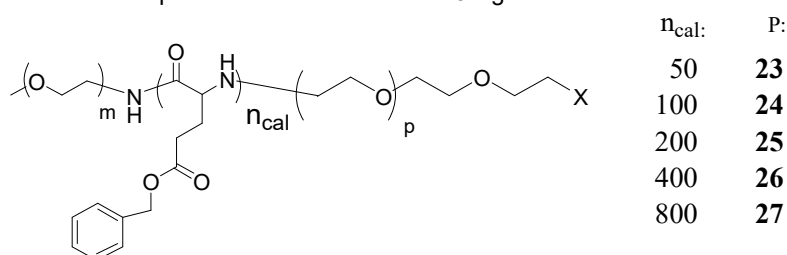


Tabla 5:

PRODUCTO	P	REACCIÓN		RENDIMIENTO
		mg DB/mmol	mg PEG/mmol	
TB50	23	750 / 0,058	209 / 0,104	90%
TB100	24	520 / 0,022	78 / 0,039	85,5 %
TB200	25	1572,4 / 0,034	123 / 0,061	96%
TB400	26	560 / 0,0062	22,3 / 0,011	88%
TB800	27	1260,2 / 0,0071	25,4 / 0,0126	82%

20 Los productos obtenidos con el procedimiento de síntesis general detallado previamente fueron caracterizados mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) y resonancia magnética nuclear $^1\text{H-NMR}$ en CDCl_3 .

Posteriormente, TB50 fue disuelto en 5-7mL de ácido trifluoroacético (TFA). Seguidamente, se añadió HBr 48% w/v en ácido acético y se dejó la reacción durante toda la noche. A continuación, el polímero fue precipitado sobre
25 dietiléter frío. Tras 2h a -20°C , el polímero precipitado fue recuperado tras centrifugar la mezcla a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y secado a vacío.

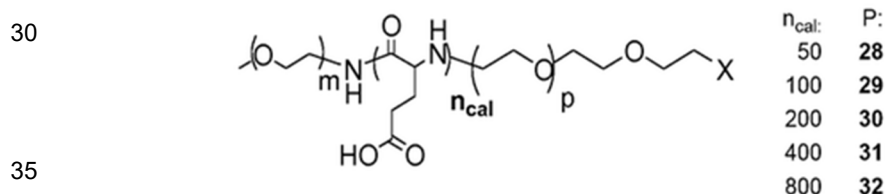


Tabla 6:

PRODUCTO	P	REACCIÓN		RENDIMIENTO
		mg DB/mmol	ml HBr/mmol	
TB50d	28	735 / 0,05	1,686 / 10	90%

TB100d	29	444 / 0,017	1,146 / 6,8	95%
TB200d	30	1503,5 / 0,031	4,256 / 6,31	90%
TB400d	31	481,7 / 0,0053	1,42 / 8,42	90%
TB800d	32	949,2 / 0,0053	2,858 / 16,9	90%

Los productos obtenidos se caracterizaron mediante GPC y $^1\text{H-NMR}$ en $\text{DMSO-}d_6$.

Finalmente, parte de los copolímeros de TBs desprotegidos se disolvieron en una cantidad calculada de bicarbonato y 1-3 ml de agua. Tras solubilizar el polímero, la disolución se cargó en una columna G25) y se eluyó con milliQ H_2O . Se recogieron 50 fracciones de 3mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuotas, de 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y posteriormente se analizaron por $^1\text{H-NMR}$ en D_2O .

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

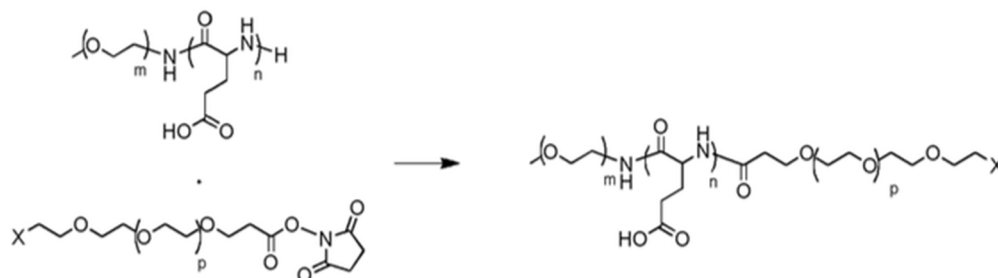
Como se cita anteriormente, PEG-PGA o n-BuPGA se obtienen mediante la reacción del monómero NCA-L-Glu-OBn con el iniciador $\text{MeO-PEG-NH}_3\text{BF}_4$ ó nBuBF_4 , respectivamente. Variando la proporción monómero:PEG equivalente, es posible obtener dibloques con diferentes unidades de ácido glutámico (teóricamente 200, 400 y 800).

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

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

25 **Protocolo experimental detallado**

Síntesis de PEG-PGA_n-PEG4TP (TB)



donde:

X representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados)

m representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG utilizado como primer bloque, de 1 a 500

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

p representa el número de unidades de etilenglicol en el fragmento polimérico PEG del tercer bloque de 1 a 500

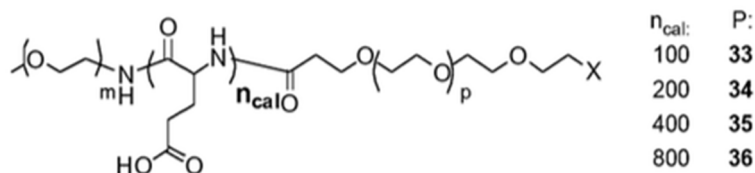
En un matraz de fondo redondo de 50mL, 1g de DB previamente desprotegido (como ejemplo, n=200 unidades de GA; 1eq, MW=27692 g/mol) se disolvió en 20mL de DMF anhidro y el sistema se purgó con N_2 . 1,3 eq de NHS-PEG-SS-4TP (163,4 mg; MW=3480 g/mol) se disolvieron en 3mL de DMF anhidro y se purgó con N_2 antes de añadirlo al matraz de reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 8,0 con DIEA (1,5mL en este ejemplo) y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente y atmósfera inerte durante 3 días. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se redisolvió en el mínimo volumen de NaHCO_3 1M (5 mL) y se purificó mediante columna SEC (Sephadex G25, ddH $_2\text{O}$). Se recolectaron 50 fracciones de 2 mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuota con 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y se analizaron por $^1\text{H-NMR}$ en D_2O . $^1\text{H-RMN}$. (CDCl_3 , 300 MHz): δ : 2,8-2,9 (4H, t, J=6,3 Hz, H_6), δ : 3,3-3,8 (m, $\text{H}_{3,4,5}$), δ : 7,4 (4H, d, J=4,5 Hz, $\text{H}_{2,2'}$), δ : 8,4 (4H, d, J=4,5 Hz, $\text{H}_{1,1'}$).

El grupo SS-4TP permitirá conjugaciones adicionales con fracciones seleccionadas incluyendo péptidos, proteínas o anticuerpos a través de un enlace disulfuro. De nuevo, se evaluó el rendimiento de funcionalización con el ensayo Ellman y/o con el ensayo 4TP. El rendimiento del procedimiento se evaluó en alrededor de un 35%; la activación -SH alrededor del 90%.

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

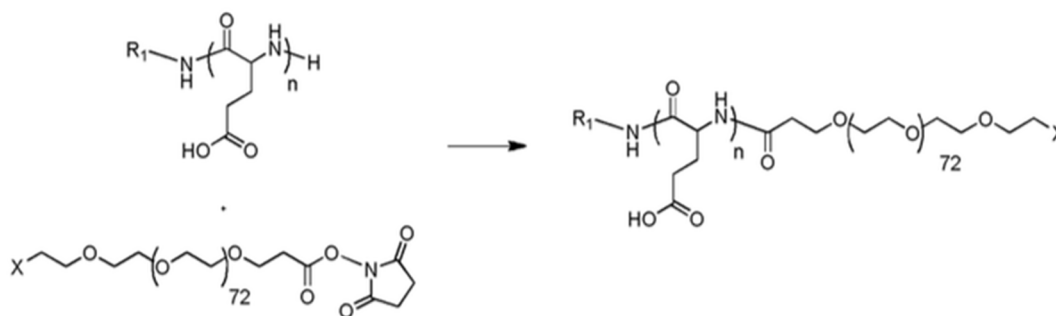
Tabla 7.

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



Síntesis de nBuPGA_n-PEG4TP (DB)

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



donde:

R1 representa un grupo alquilo, por ejemplo n-butil, neopentil; una cadena carbonada (saturada y/o insaturada) con y sin presencia de átomos electronegativos (i.e. O en PEG-NH2)

X representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales, ácidos carboxílicos activados).

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

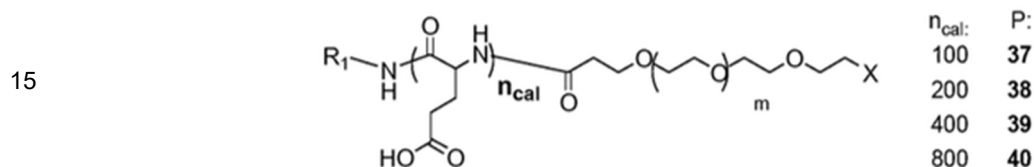
En un matraz de fondo redondo de 50mL, 100 mg de homopolímero desprotegido nBu-PGA con 200 unidades de ácido glutámico (1 g, 258,57 g/mol) se disolvió en 8 mL DMF anhidro a temperatura ambiente y el sistema se purgó con N₂. En un vial, 1,5 eq de NHS-PEG-SS-4TP (17 mg; 3357 g/mol) se disolvieron en 2mL DMF anhidro y se purgó con N₂ antes de añadirlo al matraz de reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 8,0 con DIEA y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente y atmósfera inerte durante 72h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se redisolvió en el mínimo volumen de NaHCO₃ 1M y se purificó mediante SEC (Sephadex G25, ddH₂O).

Se recolectaron 50 fracciones de 2mL cada una (a excepción de la primera y la segunda alícuota con 10mL cada una). Las fracciones se liofilizaron y se analizaron por ¹H-NMR en D₂O.

5 Para confirmar el porcentaje de grupos 4TP introducidos en la conjugación, se realizaron ensayos espectrofotométricos, uno de cuantificación directa (liberación del grupo 4TP) como indirecta (ensayo Ellman). El producto se almacenó para posteriores análisis y conjugaciones. Rendimiento: 64%, activación 90%, tal y como se muestra en la Tabla 8.

10 **Tabla 8:**

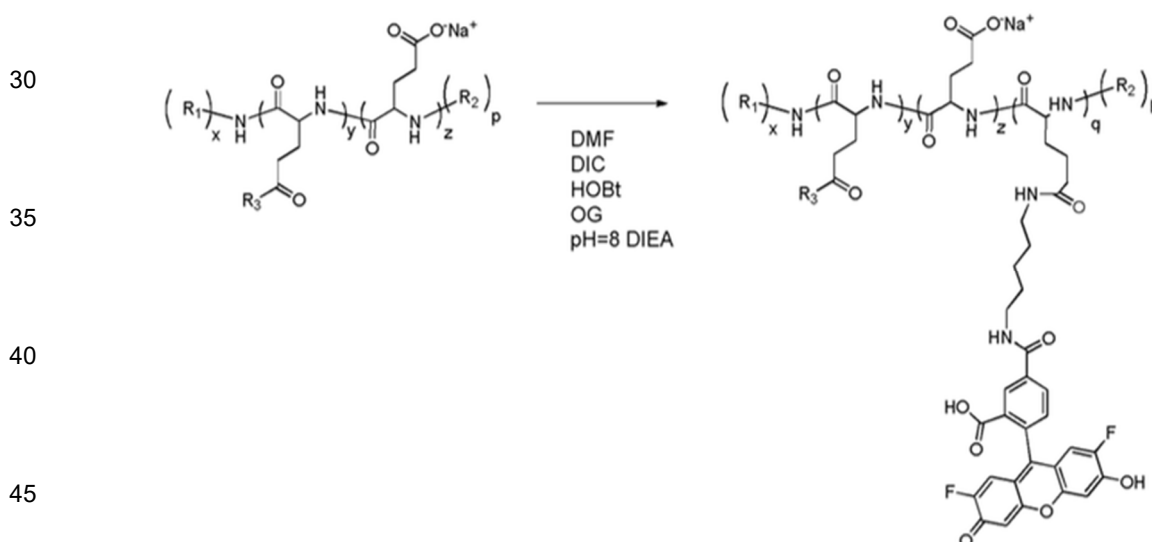
Producto		P	t (d)	4TP activación (%)	Rto (%)
nBuPGA ₁₀₀ -PEG4TP	DB100	37	3	90	64
nBuPGA ₂₀₀ -PEG4TP	DB200	38	-	-	-
nBuPGA ₄₀₀ -PEG4TP	DB400	39	-	-	-
nBuPGA ₈₀₀ -PEG4TP	DB800	40	-	-	-



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

Química de bioconjugación.

25 **Método general para etiquetado con Oregon Green cadaverina.**



donde:

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

55 R2 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido (alquino, azida, tioles, haluros, tioles activados, alquenos, ésteres activados, alcoholes activados, aminos protegidos, grupos maleimido, acetales,

ácidos carboxílicos activados), etilenglicol (EG) de diferentes pesos moleculares incluyendo polietilenglicol (PEG, desde 100 a 20000 g/mol), PEG-tiol, PEG-4TP.

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

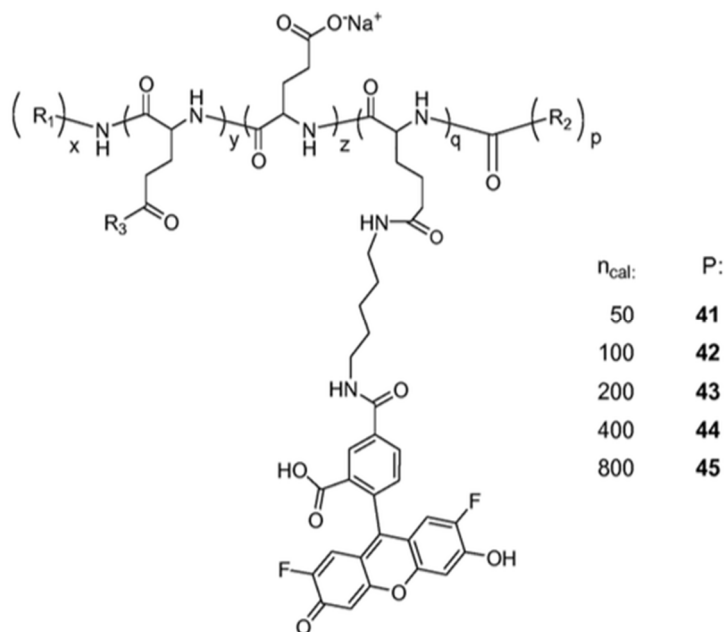
x representa unidades de monómeros incluidos en definición R1 de 1 a 500

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

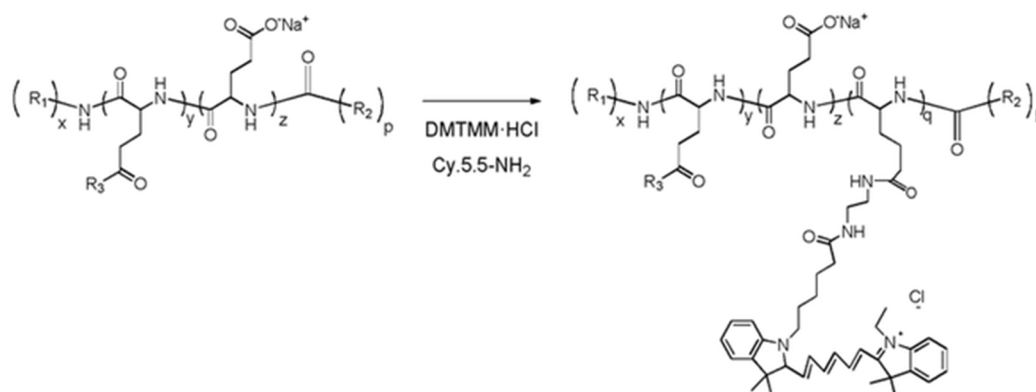
z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

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

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, se disolvieron 29 mg de ácido poliglutámico (0,225 mmol GA, 1eq) en 1,5 mL de DMF anhidro bajo flujo continuo de N₂. Se añadieron a la reacción 1,12 µL de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (0,85 mg, 0,00674 mmol, d=0,806 g/ml, Mw=126 g/mol, 0,03 eq) y tras 5 minutos de agitación, se añadió 1mg (0,00674 mmol, Mw=135,1 g/mol 0,03 eq) de hidroxibenzotriazol (HOBt) sólido. La reacción se dejó bajo agitación durante 10 minutos y después se añadió 1mg (2,01·10⁻³mmol, Mw=496,47g/mol, 0,0089eq) de Oregon Green cadaverina. El pH se ajustó a 8,0 con DIEA (100uL aprox.). La mezcla se dejó bajo agitación durante toda la noche protegida de la luz y bajo atmósfera inerte. Finalmente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 300uL de agua y 50uL de NaHCO₃ 1M. La disolución se purificó mediante SEC (Sephadex G25/PD10) utilizando agua milliQ como eluyente. La carga de OG se determinó por espectroscopia de fluorescencia (λ_{ex}=485nm, λ_{em}=535nm) monitorizando la señal de cada fracción de la columna. Eficiencia general de etiquetado: 80-90%. Rendimiento de la reacción: 80-85%.



Método general para etiquetado con Cyane5.5.



donde:

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

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, 59,6 mg de DB200 (0,355 mmol COOH) se disolvieron en 8 mL de ddH₂O y se dejó bajo agitación. En un vial aparte, se disolvieron 3,8 mg de Cy5.5-NH₂ (1,8% mol, Mw=588,36 g/mol) en 13 mL de ddH₂O que posteriormente se añadieron a la reacción. A continuación 2,9 mg de DMTMM·HCl (Mw= 276,72g/mol, 1,5eq) se añadieron a la reacción. La mezcla se dejó bajo agitación 48h protegida de la luz a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. La reacción se monitorizó por cromatografía de capa fina (metanol:ácido acético). Finalmente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 300 uL de agua y se purificó mediante SEC (Sephadex G25/PD10) utilizando H₂O destilada como eluyente. La carga de Cy5.5 se determinó mediante fluorímetro (λ_{exc} 598 nm, λ_{em} 655 nm) monitorizando la señal de cada fracción de la columna. Eficiencia general de etiquetado: 90,86% (1,63%mol Cy5.5). Rendimiento de la reacción: 60%.

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

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

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

Método general para las técnicas de modificación post-polimerización.

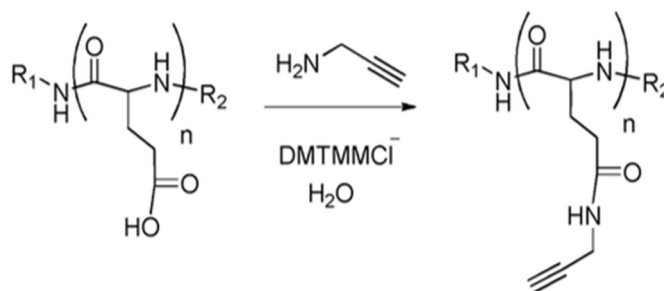
En un matraz de fondo redondo provisto de un agitador magnético y un tapón de vidrio, se suspendieron 200 mg de ácido poliglutámico (1,55 mmol de unidades de ácido glutámico) en 10 mL de agua milliQ. Posteriormente, se añadieron 128,7 mg de DMTMMCl- disueltos en 5 mL de agua milliQ. Tras 10 minutos de reacción se añadió la cantidad (0,93 mmol 0,6 eq) de la correspondiente amina y el pH de la reacción se ajustó a 8 mediante la adición de algunas gotas de una disolución 1M de NaHCO₃. La reacción se dejó agitar durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, debido a que todos los subproductos son solubles en agua, el producto se purificó o por ultrafiltración (utilizando una membrana de tamaño de peso molecular 3000) o SEC (cromatografía por exclusión de tamaño) a través de columna de sephadex G25. Alternativamente el producto puede purificarse por precipitación ácido/base. Tras liofilizar la muestra en cualquiera de los casos, se obtuvo un sólido incoloro amorfo.

Rendimiento: 80-90%. $^1\text{H-NMR}$ PGA modificado con propargilo (300 MHz, D_2O) δ : 4,30 – 4,02 (m, 1H), 3,81 (s)*, 2,48 (s)*, 2,35 – 2,02 (m, 2H), 2,01 – 1,65 (m, 2H). $^1\text{H-NMR}$ PGA modificado con PEG-azida (300 MHz, D_2O) δ : 4,28 – 4,07 (m, 1H), 3,65 – 3,51 (m)*, 3,48 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$)*, 3,40 – 3,30 (m)*, 3,25 (d, $J = 4,9 \text{ Hz}$)*, 2,29 – 2,00 (m, 2H), 1,98 – 1,65 (m, 2H). $^1\text{H-NMR}$ PGA modificado con PEG-oMe (300 MHz, D_2O) δ : 4,33–4,19 (m, 1H), 3,95 – 3,78 (m)*, 3,77 – 3,49 (m)*, 3,34 (s)*, 2,41 – 1,76 (m, 4H)

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

Modificación post-polimerización con propargilamina.

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



donde

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

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

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

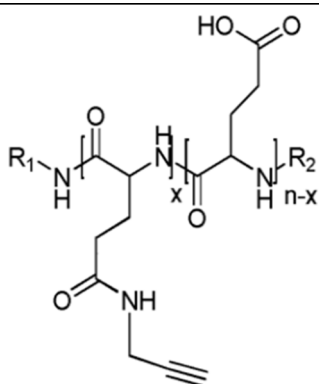
a) Uno de ellos se basa en la precipitación ácido/base del polímero de PGA. Este método tiene su fundamento en el hecho de que PGA es insoluble en agua cuando se encuentra protonado como ácido carboxílico, y es completamente soluble cuando se encuentra formando la sal sódica. Por lo tanto, puesto que todos los subproductos de reacción son solubles en agua, el polímero puede purificarse por precipitación en agua ácida (pH~3-4) y redisolución por basificación con una disolución de bicarbonato sódico. El proceso se repite tres veces para dar lugar a un polímero blanco tras liofilizar la muestra.

b) Ultrafiltración, usando una membrana con corte de peso molecular de 3,000 dio lugar también al compuesto puro tras liofilizar la muestra.

c) El uso de columnas sephadex G25 de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) también se probó para la purificación del producto dando lugar a una correcta separación por peso molecular del polímero correspondiente. El compuesto se obtuvo puro en las primeras fracciones tras liofilizar la muestra.

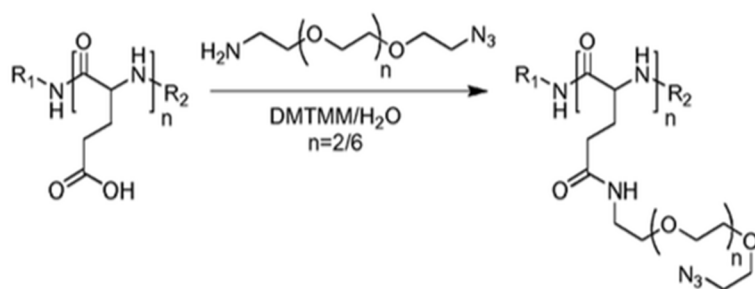
En todos los casos el producto se obtuvo puro con rendimientos comparables de entorno al 80%. Debe ser mencionado que el método de ultrafiltración es preferible cuando se preparan grandes cantidades del compuesto y Sephadex G25 (columnas comerciales PD10) son preferibles cuando se preparan pequeñas cantidades de producto. Sin embargo, los tres métodos son completamente válidos como ha sido comprobado en este trabajo. Una vez purificado, el contenido de grupos alquino en el polímero se determinó mediante la integración de las correspondientes señales de propargilamina en el espectro de $^1\text{H-NMR}$ en agua deuterada en comparación con las correspondientes señales de PGA. En concreto, el pico situado a 3,81 ppm se corresponde con los dos protones de los grupos CH_2 del residuo de propargilamina y la señal a 2,48 ppm se corresponde con el protón acetilénico del residuo de propargilamina en el polímero. Así, en comparación con las señales correspondientes al polímero de PGA puede calcularse el % de sustitución en cada polímero. Como ejemplo de $^1\text{H-RMN}$ se adjunta la Figura 6. Se sintetizaron diferentes polímeros con diferentes grados de sustitución. El grado de sustitución de acuerdo con las señales de H-RMN fue de aproximadamente un 60% del esperado por los equivalentes añadidos. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla inferior.

Tabla 9: Polímeros modificados con grupos alquino.

Polímero		Contenido alquino (calc.) (%)	Contenido alquino (¹ H-RMN) (%)	Mn	Mw	PDI
	46	50	31	19250	25020	1,3
	47	30	18	18590	24170	1,3
	48	20	11	18230	23700	1,3
	49	10	6	17980	23370	1,3

El Mw resultante del polímero se calculó teniendo en cuenta el % de unidades de ácido glutámico (GA). Por ejemplo:

Modificación Post-polimerización con NH₂-PEG(2)-N₃ y NH₂-PEG(6)-N₃.



donde

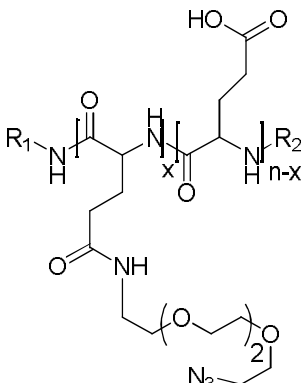
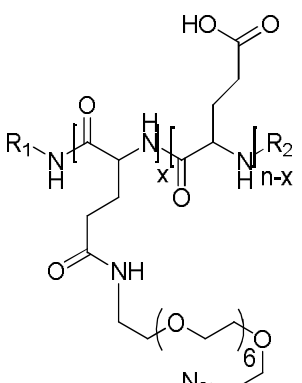
n representa el número de unidades de glutámico, 1 a 1000

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

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la incorporación de unidades oligoetilenglicol azida en la cadena polimérica de PGA. Una vez purificados los polímeros modificados, el contenido de oligoetilenglicol en los mismos se determinó a través de la integración de las correspondientes señales de etilenglicol en el espectro de ¹H-NMR registrado en agua deuterada. En comparación con las señales de PGA. En concreto, los picos a desplazamientos químicos 3,26, 3,35 y 3,48 ppm se corresponden con los protones CH₂ cercanos al grupo amida y azida. La señal mayor a 3,55 ppm se corresponde con los grupos CH₂ localizados en el interior de la cadena de oligoetilenglicol más un triplete exterior correspondiente a dos protones CH₂. La integral de esta última señal varía en función de si la modificación se realiza con EG₂ (dos unidades de etilenglicol en el interior de la cadena, lo que se corresponde con 10 protones) o si es EG₆ (en cuyo caso se correspondería con 50 protones). Por lo tanto, el % de sustitución en cada polímero fue calculada de igual forma, comparando las integrales correspondientes a los grupos EG con las señales de PGA. Como ejemplo de espectro de ¹H-RMN véase la Figura 7.

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

Tabla 10. Poliglutamatos modificados con unidades oligoEG azida

Polímero		Contenido azida (calc.)	Contenido azida (¹ H-RMN)	Mn	Mw	PDI
	50	15	11	23500	30500	1,3
	51	20	16	24700	32100	1,3
	52	60	30	22500	29200	1,3
	53	20	16	26000	33800	1,3
	54	30	18	26500	34400	1,3
	55	50	34	27200	35400	1,3

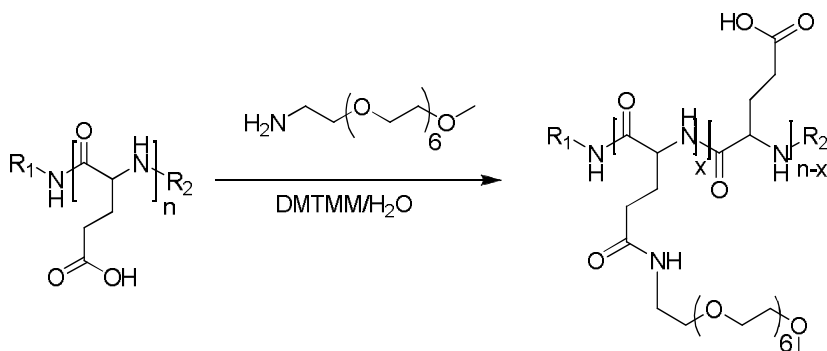
El Mw de los copolímeros resultantes se calculó en base al peso molecular de las unidades de oligoetilenglicol en cada caso.

5

PEGilación de PGA.

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

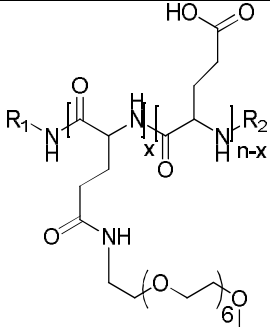
10



15 donde

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

Tabla 11. Poliglutamatos modificados con metoxioligoEG

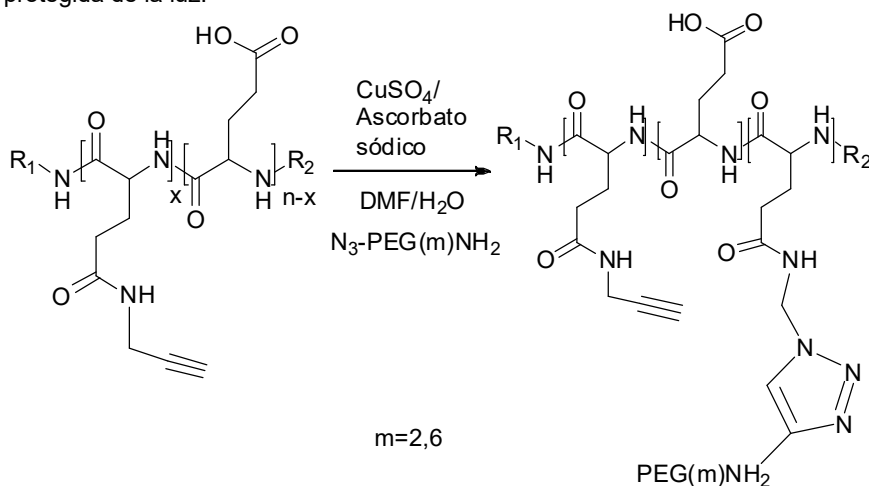
Polímero		Contenido en Oligo EG (%) (calc.)	Contenido en Oligo EG (¹ H-RMN) (%)	Mn	Mw	PDI
	56	200	87	56000	72700	1,3
	57	140	73	49800	64700	1,3
	58	100	49	39200	51000	1,3
	59	60	30	30900	40200	1,3
	60	20	8	21200	27600	1,3
	61	75	50	21200	25000	1,18
	62	50	33	17400	22600	1,18
	63	25	24	15600	1840	1,18

5

Modificación post-polimerización por Química Click

Acoplamiento modelo por Química Click

- 10 En un matraz de dos bocas de fondo redondo provisto de un agitador magnético, 1 equivalente de copolímero (PGA y EG(2)N₃, EG(6)N₃ o propargilamina en cada caso) en forma de sal sódica se disolvió en agua milliQ. Posteriormente, se añadió la correspondiente cantidad para la introducción del porcentaje deseado del correspondiente compuesto azida/alquino en su caso en DMF absoluto. Posteriormente, se añadió cinco equivalentes de ascorbato sódico (Mw=198,11 g/mol) en disolución de agua milliQ. Tras ello, la mezcla se
- 15 desgasificó mediante dos ciclos de congelación y descongelación a vacío. Posteriormente, se añadió un equivalente de CuSO₄ (Mw= 249,68 g/mol) (pesado bajo atmósfera de N₂) a la mezcla de reacción cuya proporción final de mezcla de disolventes debe DMF/H₂O 4:1. La mezcla completa se volvió a desgasificar con un ciclo más de congelación y descongelación a vacío y se dejó reaccionar en un baño de aceite durante 40 °C durante tres días, protegida de la luz.



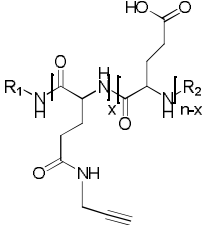
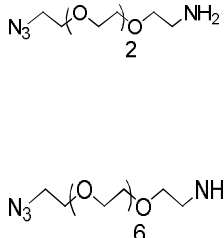
20

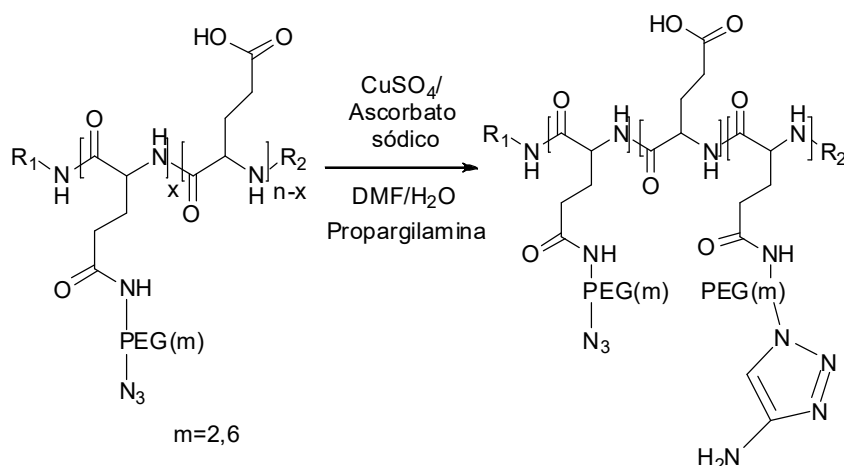
donde

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

25

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

Experimento		Disolvente	T° °C	Sistema catalítico	Eq. por unidad	Eficacia
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (0,3/0,5)	3 (20%)	88 %
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	97 %
		DMF/ H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico(0,3/0,5)	6 (40%)	48 %
		DMF/ H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	2 (9%)	67 %
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	96 %

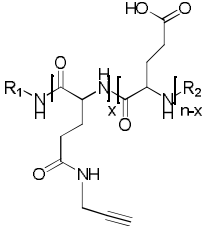
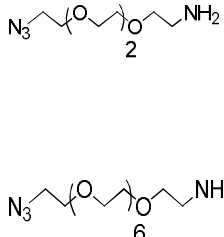


5 donde

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

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

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

Experimento		Disolvente	T° °C	Sistema catalítico	Eq. por unidad	Eficacia
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (0,3/0,5)	3 (20%)	88 %
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	97 %
		DMF/ H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico(0,3/0,5)	6 (40%)	48 %
		DMF/ H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	2 (9%)	67 %
		H ₂ O	40	CuSO ₄ /Ascorbato sódico (1/5)	6 (40%)	96 %

De los resultados obtenidos pueden establecerse las siguientes conclusiones:

-Las condiciones óptimas de reacción en disolución acuosa son: el uso del sistema catalítico CuSO_4 / Ascorbato sódico (1/5) a 40 °C dando lugar a una eficacia de conjugación de 96-97%.

-El uso de CuBr /PMDTA (1:1) en mezclas de DMF no funciona ni a temperatura ambiente ni a 40°C. Probablemente se podría solucionar añadiendo una cantidad adicional de ascorbato sódico para evitar la oxidación de Cu(I) . Por cierto, el uso de mezclas DMF/ H_2O (4:1) con CuSO_4 /Ascorbato sódico (1/5) como catalizador permite la posibilidad de conjugación de moléculas hidrofóbicas. La eficacia de conjugación es siempre inferior cuando se usan mezclas DMF/ H_2O pero es aceptable y predecible.

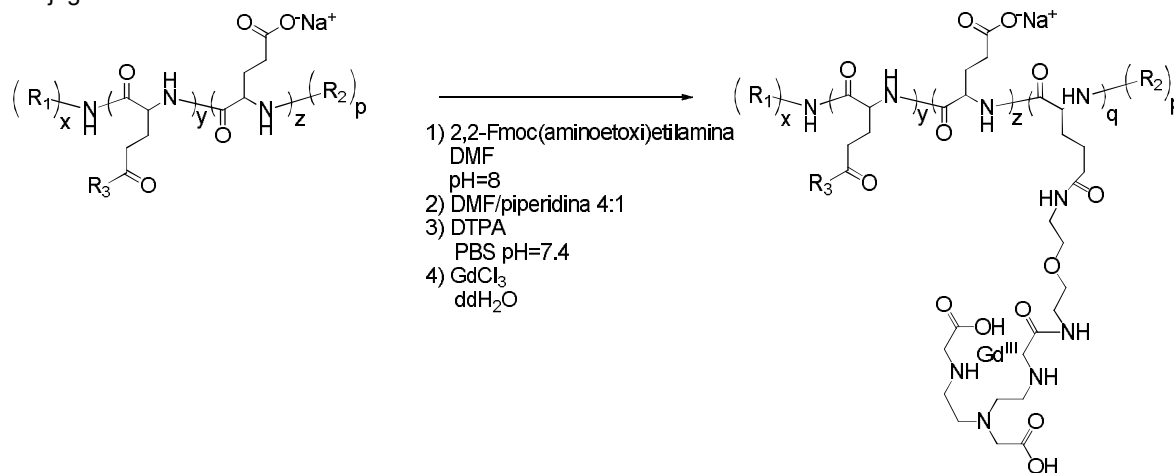
Modificación de post-polimerización mediante enlaces amida

10 Conjugación de DTPA/DOTA

Los complejos de gadolinio/galio como por ejemplo Gd-DTPA, Ga-DOTA o sus derivados se emplean de manera habitual como agentes de contraste en la técnica MRI (MRI, Magnetic Resonance Imaging) o PET (PET, Positron Emission Tomography), respectivamente. El porcentaje de Gd o Ga introducido depende directamente del número de unidades de glutámico del bloque peptídico. Para su complejación es necesario introducir unidades complejantes, como el DTPA (ácido dietilentriaminopentacético) o DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido teraacético). Los grupos carboxilo del PGA se funcionalizan con una diamina monoprotectida, con el objetivo de tener un grupo NH_2 disponible (tras la desprotección) para la formación de enlaces amida con el DTPA dianhidrido o DOTA. La di-amina monoprotectida evita procesos de entrecruzamiento.

Teniendo en cuenta que el número de grupos carboxílicos puede variar, el porcentaje de Gd o Ga puede ser optimizado. El acoplamiento de la diamina a los grupos carboxilos del tribloque, seguido de la conjugación del agente quelante DTPA/DOTA para la final complejación de gadolinio, fue realizado siguiendo el protocolo detallado a continuación, obteniendo porcentajes de diamina injertada variables.

En primer lugar, tras obtener el TB en su forma de sal sódica debe ser acidificado para ser soluble en DMF. La acidificación se lleva a cabo disolviendo el polímero en el mínimo volumen de agua y se añade gota a gota HCl 6N controlando el pH. Después de centrifugar, el *pellet* y el sobrenadante se liofilizan. El análisis detallado de la conjugación se detallada a continuación.



donde:

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

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

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

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

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

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

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

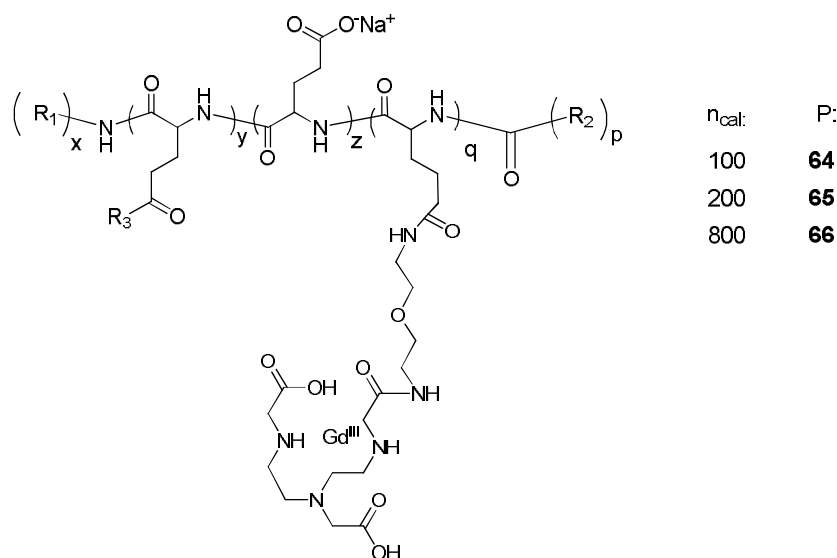
TB200 (34,5mg; 31044g/ml, $1,11 \cdot 10^{-6}$ mol) se disolvió en 5 mL de DMF anhidro a temperatura ambiente y bajo flujo continuo de N_2 . Tras su disolución completa, 1,5 eq de DIC fueron añadidos (por 200 residuos de GA). Después de 5 minutos, se añadieron 1,5 eq de HOBt (por 200 residuos de GA). La reacción se dejó bajo agitación durante 10 minutos y después se añadió la Fmoc-diamina protegida (59 mg; 362,85 g/ml; $1,62 \cdot 10^{-4}$ mol; 200 eq) en la reacción. El pH se ajustó a 8,0 con DIEA (300uL aprox.) y la reacción se llevó a cabo durante 24 h y se monitorizó mediante TLC.. Se evaporó la DMF bajo presión reducida y la Fmoc-diamina no reaccionada se eliminó mediante el lavado del residuo con 8-10mL de una mezcla cloroformo:acetona (4:1) y se cuantificó por análisis de absorbancia a 290nm. La etapa siguiente es la desprotección de la Fmoc-diamina unida al polímero. La desprotección se llevó a cabo en DMF:piperidina (4:1) a temperatura ambiente, atmósfera de N_2 durante 1h. El Fmoc liberado fue separado del producto mediante lavados con la mezcla cloroformo: acetona (4:1). Seguidamente, se secó el sobrenadante y se resuspendió en MeOH para su análisis a 290 nm (para cuantificar los grupos Fmoc) mientras que la pastilla se secó bajo N_2 para las etapas siguientes. Con el análisis espectrofotométrico, se comprobó el porcentaje de acoplamiento de diamina¹.

Quelación del ion Gadolinio (Gd^{3+})

Para la complejación con el ion gadolinio, se consideró una proporción de 1 eq DTPA:1 eq $GdCl_3$, y se supuso una eficiencia de conjugación del DTPA del 50%. El TB liofilizado se resuspendió en un volumen de agua apropiado (para conseguir una concentración final de PBS 1X) mientras se añadía $GdCl_3$ (263,61g/mol, $1,14 \cdot 10^{-4}$ mmol) en agua (concentración=100 mg/mL solución) y se añadió gota a gota a la solución acuosa de TB-DTPA. Tras cada adición debe comprobarse el pH, manteniéndolo constante a 8 añadiendo NaOH. La presencia de trazas de iones Gd^{3+} no quelados en la mezcla se comprobó mediante el indicador 4-(2-piridilazo)resorcinol si existía gadolinio libre en el medio. El viraje de amarillo a naranja denota la existencia de ligando libre.

Tras 4,5 h de reacción, no se detectó Gd^{3+} libre y la reacción se detuvo liofilizando el agua. El producto se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en una columna Pd-10 para su desalación. Está previsto determinar la cantidad de Gd^{3+} en el compuesto por absorción atómica. Rendimiento=50%.

El mismo procedimiento, con cantidades adecuadas, se llevó a cabo también con una muestra de TB800 para tener la posibilidad de aumentar la cantidad de Gd^{3+} en el portador.



Donde

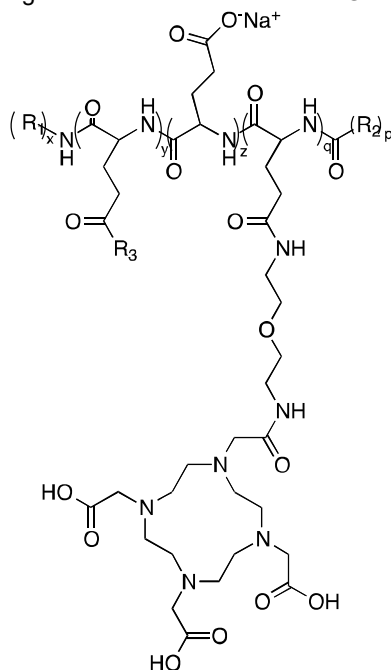
- 35 x representa el número de unidades de monómero incluido en definición R1, de 1 a 500
 y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R3 en el polímero, de 1 a 1000
 z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000

¹ Los ensayos de absorbancia variaron cada vez que se llevó a cabo este análisis.

Producto		% Fmoc-diamina libre	%Fmoc (=diamina injertada)
GI-21	TB200	138%	6%
GI-24	TB200	70%	30%
GI-40	TB800	107%	8%
GI-40bis	Tb800	71%	30%

- q representa el número de unidades de glutámico modificadas con DTPA, de 1 a 1000
 p representa el número de unidades de monómero incluido en definición R2, de 1 a 500
 n_{cal} representa el número de unidades de glutámico teóricas en el polímero, de 1 a 1000

5 En el caso de DOTA-Ga, tras obtener el polyglutamato en su forma soluble en DMF (previa precipitación mediante adición de ácido hasta pH=4) se procede a la conjugación detallada a continuación que permite la obtención de la siguiente familia de derivados PGA-DOTA.



donde:

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

En un matraz de fondo redondo, se pesó PGA (1eq, average MW GA unit=129g/mol) y el sistema fue purgado con una corriente continua de nitrógeno. El polímero se disolvió en 20 mL DMF anh, posteriormente DIC (1,5eq, 0,836g/cm³, 126,20g/mol) se introdujo en la reacción y 5 min después HOBt (1,5eq, 135,10g/mol) también fue añadido como sólido. A los 10min, el derivado DOTA-NH₂ (tert-butil 2,2',2''-(10-(2-(2-aminoethylamino)-2oxoethyl)-1,4,7-tetrazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (eq. dependiendo de la derivatización requerida 0,02-0,1 eq. 614,82/mol) se disolvió en DMF anh y fue añadido gota a gota sobre el polímero activado. El pH se ajustó a 8 con DIEA. Después de 48 h agitando a temperatura ambiente la solución se concentró a vacío. El conjugado se purificó por precipitación en un exceso de acetona. Después de a centrifugación (2600rpm, 4°C, 10min) un sólido ligeramente amarillento fue recogido y secado a vacío. El porcentaje de DOTA en el polímero fue determinado por análisis NMR-¹H (D₂O) (entre 2-10 mol%).

Alternativamente, en un matraz de fondo redondo DB200 (0,7166mmol, 1eq, average MW GA unit (salt form) =171,31g/mol) se disolvió en 5mL ddH₂O. A continuación, DMTMM·Cl (0,0717mmol, 0,115eq, 0,836g/cm³, 126,20g/mol) se añadió a la reacción y después de 10min, DOTA-NH₂ (para 11,5%mol, 0,0717mmol, 0,115eq, 614,82/mol) previamente disuelto en anh. DMF (1mL) se añadió gota a gota a la reacción. El pH se ajustó a 8 con DIEA. Después de 48 h agitando a temperatura ambiente la solución se concentró a vacío. El conjugado se purificó

por precipitación en un exceso de acetona. Después de la centrifugación (2600rpm, 4°C, 10min) un sólido ligeramente amarillento fue recogido y secado a vacío. El porcentaje de DOTA en el polímero fue determinado por análisis NMR-¹H (D₂O) (entre 2-12 mol%). Rendimiento de la reacción >70%.

Para evitar reacciones de entrecruzamiento, los grupos carboxilo están normalmente protegidos, por ejemplo como ter-butilo. Estos carboxilos son desprotegidos antes de la complejación de ⁶⁸Ga en una mezcla CH₂Cl₂ /TFA (3:2, v/v) en agitación durante 15 h a temperatura ambiente o en una mezcla TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5 v/v) durante 3h a temperatura ambiente. EL conjugado se aisló mediante precipitación en exceso de éter dietílico frío, fue lavado y secado a vacío. Rendimiento cuantitativo. La completa desprotección se ratificó por NMR-¹H.

10 Toxicidad y recuperación celular a través del ensayo de MTT

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

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

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

Estudios de internalización celular

Se ha estudiado de forma comparativa los polímeros sintetizados con diferentes pesos moleculares y conformación en solución en células HeLa y HUVEC. Se han utilizado técnicas de citometría de flujo (Figura 2A) y microscopía confocal de fluorescencia de célula viva (Figura 2Ab) con polímeros marcados fluorescentemente con oregon green (OG-cadaverine). El polímero sintetizado con los grupos -COOH desprotegidos (P-COOH, 1 equiv.) se disuelve en DMF anhidro bajo atmósfera de N₂, posteriormente el fluoróforo (OG-NH₂ 0,1 equiv.) en DMF anhidro se añade junto con trietilamina (hasta pH 8). La reacción se monitoriza por TLC, una vez finalizada el polímero se purifica mediante SEC (columnas PD10, Sephadex) y la carga fluorescente se determina con el fluorímetro (cuantificación de fluorescencia del crudo y del polímero purificado). TB10 se halló fuera de los límites de detección del sistema por tanto TB-OG50, TB-OG100 y TB-OG200 fueron analizados. Los estudios de internalización celular se llevaron a cabo en presencia de leupeptina (inhibidor de tiol proteasas) para evitar la degradación del portador polimérico.

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

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

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

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

Degradación a distintos pH

Los polímeros fueron disueltos en tampón PBS a pH 5,5, 6,5 y 7,5 a una concentración de 3mg/mL. Las disoluciones fueron incubadas a 37°C, se tomaron alícuotas de 100uL a distintos tiempos que fueron congeladas para su posterior análisis.

Degradación en plasma

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

5

Degradación enzimática (catepsina B)

Los polímeros fueron disueltos en tampón de acetato sódico 20mM pH 6,0 a una concentración de 3mg/mL, en presencia de EDTA 2 mM, DTT 5 mM y 6,25 unidades de catepsina B (disueltas en tampón acetato). Las disoluciones fueron incubadas a 37°C y se tomaron alícuotas de 100 uL a distintos tiempos que fueron congeladas para su posterior análisis.

10

Estudios de biodistribución

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

15

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

Estudios *in vivo* con Oregon Green

Para el estudio de la biodistribución, se llevaron a cabo análisis *ex vivo* de la acumulación del tri-bloque fluorescente en los distintos órganos de rata mediante HPLC y un espectrofotómetro de fluorescencia.

25

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

30

Inmediatamente tras el sacrificio, se recolectó la sangre y los órganos se pesaron siendo rápidamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Los tejidos a analizar fueron cerebro, cerebelo, corazón, hígado, riñón, vejiga, estómago, intestino y tejido muscular. Cada uno fue tratado con una solución de lisis compuesta por 40%EtOH/6%HClO₄ (4mL por gramo de tejido). También se trató suero con el mismo protocolo: viales de sangre se centrifugaron para eliminar el suero (sobrenadante); el mismo volumen recogido se añadió a la solución de ácido perclórico. La suspensión se centrifugó durante 60min a 4000g a 4°C, recuperando el sobrenadante para el posterior análisis y el *pellet* se liofilizó.

35

Para mejorar la extracción del polímero de la mezcla, los *pellets* obtenidos se sometieron a ultrasonidos durante 1h tras añadir 2mL ddH₂O y 1mL de una solución 1M NaHCO₃. Después se centrifugaron las muestras con las condiciones nombradas previamente y el sobrenadante se guardó para analizarlo.

40

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

45

El suero de los animales se separó de la sangre recogida mediante centrifugación y se mezcló con un volumen igual de HClO₄ 6%/EtOH 40%.

50

Todas las muestras obtenidas tanto de tejidos como de suero, (sobrenadantes de los tratamientos con la mezcla perclórica, sobrenadantes de la mezcla perclórica basificados y sobrenadantes del tratamiento con NaHCO₃) fueron analizadas mediante HPLC y espectrofotómetro de fluorescencia. Algunos resultados preliminares se resumen a continuación. Las conclusiones deberían analizarse en profundidad junto con los cromatogramas de fluorescencia HPLC (datos no mostrados).

55

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

60

El suero siguió un tratamiento similar: después de la centrifugación de la sangre, el sobrenadante se recogió y se

65

añadió el mismo volumen de solución de ácido perclórico. Después de centrifugar la muestra (10 min, 12000 rpm, 4°C) se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

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

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

Inmediatamente tras el sacrificio, se recolectó la sangre y los órganos se pesaron siendo rápidamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Los órganos a analizar fueron cerebro, cerebelo, corazón, hígado, riñón, vejiga, estómago, intestino y tejido muscular. Cada uno fue tratado con una solución de lisis compuesta por 40%EtOH/6%HClO₄ (4mL por gramo de tejido). A continuación se homogeneizó la muestra con Ultraturrax (aprox. 1min, 13000rpm). La suspensión se centrifugó durante 60min a 4000g a 4°C, recuperando el sobrenadante para el posterior análisis. El suero siguió un tratamiento similar: tras centrifugar la sangre, el sobrenadante se recolectó y se le añadió el mismo volumen de la disolución de ácido perclórico. Tras centrifugar la muestra (10 min, 12000 rpm, 4°C), se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

Para mejorar la extracción del polímero de la mezcla, los *pellets* obtenidos se sometieron a ultrasonidos durante 1h tras añadir 2mL ddH₂O y 1mL de una solución 1M NaHCO₃. Después se centrifugaron las muestras con las condiciones nombradas previamente y el sobrenadante se guardó para analizarlo.

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

Todas las muestras obtenidas tanto de tejidos como de suero, (sobrenadantes de los tratamientos con la mezcla perclórica, sobrenadantes de la mezcla perclórica basificados y sobrenadantes del tratamiento con CO₃HNa fueron estudiadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrofotómetro de fluorescencia. Los resultados preliminares del presente análisis se muestran en los gráficos de las Figura 12A y 12B.

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

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

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

En este estudio se utilizó la metodología de análisis de la fluorescencia descrita anteriormente para el caso del marcaje fluorescente con OG. Como ejemplo preliminar de la presente invención se detalla a continuación el experimento realizado con DB100 etiquetado con Cy5.5. La única excepción es que la sensibilidad de la sonda Cy5.5 al pH no fue la misma que el OG por lo que el lavado de los pellets con NaHCO₃ 1M no fue necesario ya que no aportaron más datos. Un ejemplo de las imágenes obtenidas se muestra en la Figura 13.

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

La Imagen por Resonancia Magnética (MRI) es una técnica no invasiva y no ionizante que utiliza el fenómeno de la resonancia magnética para obtener información sobre la estructura y composición el cuerpo analizado. Constituye

una herramienta única para contrastes entre tejidos, siendo capaz de distinguir entre tejidos sanos y enfermos.

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

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

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

Los estudios preliminares *in vivo* empleando esta técnica fueron llevados a cabo para determinar la biodistribución de los nuevos polímeros mediante otra técnica alternativa a los métodos por fluorescencia previamente descritos en la presente memoria y a su vez comparar cuál de ellos ofrece mejores características para la posterior conjugación a fármaco. Los tribloques (TB200-DTPA y TB800-DTPA) marcados con Gd se inyectaron en ratas por vía intravenosa, administrando una dosis de 0,2 mmol Gd³⁺ por kg animal, y se monitorizaron mediante resonancia magnética por imagen (MRI). Los experimentos fueron realizados en un sistema Bruker Pharmascan (Bruker Medical GmbH R, Ettlingen, Alemania). El agente de contraste se administró a través de la vena de la cola como un bolo 9 minutos después de iniciar la adquisición.

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

Estudios de biodistribución mediante imagen por tomografía de emisión de positrons (PET)

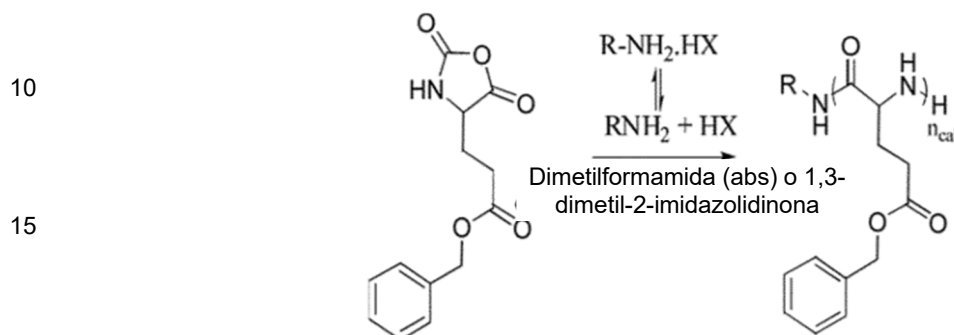
Positron Emission Tomography (PET) es una técnica para determinar cuantitativamente la concentración *in vivo* de compuestos marcados con emisores de positrones. La cantidad que es medida por PET es la concentración regional *in vivo* de emisores de positrones que incluso permite el estudio de procesos metabólicos.

En la presente invención se ha utilizado el metal galio (⁶⁸Ga) como radioisótopo debido a su tiempo de vida media (68 min) y a sus necesidades de complejación (DOTA). Además este radiotrazador está descrito como el más adecuado para tumores neuroendocrinos por el reconocimiento de somatostatinas. La monitorización se ha llevado a cabo en un equipo PET-CT. Los equipos de PET-CT tienen la gran ventaja de que en caso de duda diagnostic, es posible la correlación anatómica directa.

Estudios preliminares de biodistribución por PET se han llevado a cabo (Figura 15). Estos estudios permitieron detectar la presencia de los conjugados en circulación sin observar acumulación en tejidos específicos, como por ejemplo el cerebro, hígado, pulmones y una clara eliminación renal (ver la Figura 15). No se observaron efectos de toxicidad en ningún caso estudiado.

REINVINDICACIONES

1. Método de obtención de poliglutamatos por medio de la polimerización controlada de N-carboxianhidridos (NCAs) de alfa-aminoácidos mediante la utilización de una sal de amonio de tetrafluoroborato no nucleofílico como iniciador de acuerdo con la reacción:



20 donde:

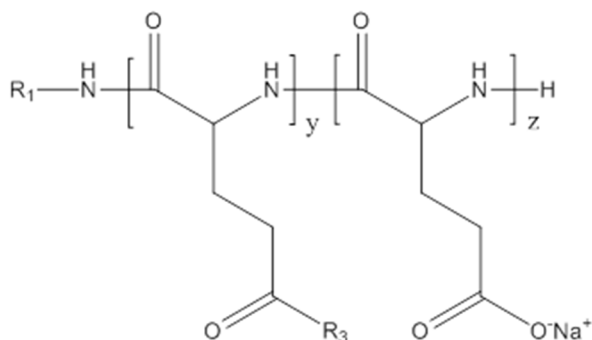
R representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de un peso molecular de 100 a 20000 g/mol);

25 n_{cal} representa un número de unidades de gamma-bencilglutamato en el polímero de 2 a 1000; y

X representa BF_4 .

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde R es n-butil.

30 3. El método de acuerdo con cualquier reivindicación 1 a 2, obteniéndose un producto final en forma de dibloque, con la fórmula:



donde

35 R_1 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de un peso molecular de 100 a 20000 g/mol);

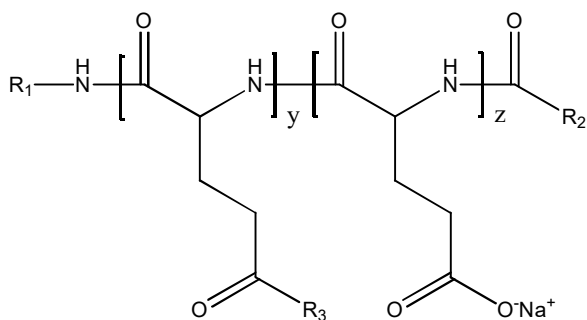
R_3 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de $n=2$ a $n=16$, un aminoácido o un grupo amino secundario o terciario;

y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R_3 en el polímero, de 1 a 1000; y

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

45

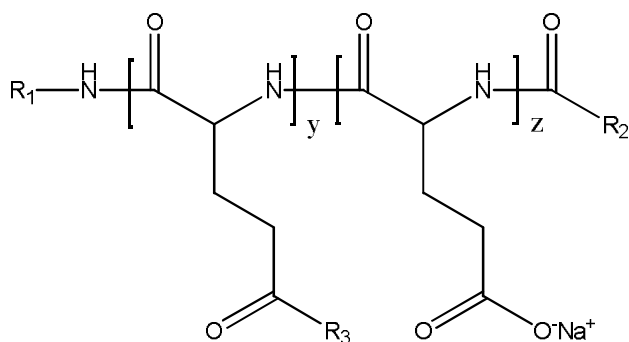
4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación 1 a 3, obteniéndose un producto final en forma de tribloque, con la fórmula:



donde:

- R_1 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de un peso molecular de 100 a 20000 g/mol);
- R_2 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, im tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol, polietilenglicol con un peso molecular de 100 a 20000 g/mol, PEG-tiol o PEG-4-tiopiridil;
- R_3 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de $n=2$ a $n=16$, un aminoácido o un grupo amino secundario o terciario;
- y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R_3 en el polímero, de 1 a 500; y
- z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, mediante la reacción entre los dibloques de polietilenglicol-ácido poliglutámico (PEG-PGA) previamente obtenidos y un derivado de PEG funcionalizado con un grupo carboxilo activado, obteniéndose los sistemas tri-bloque según se muestra en la fórmula siguiente:

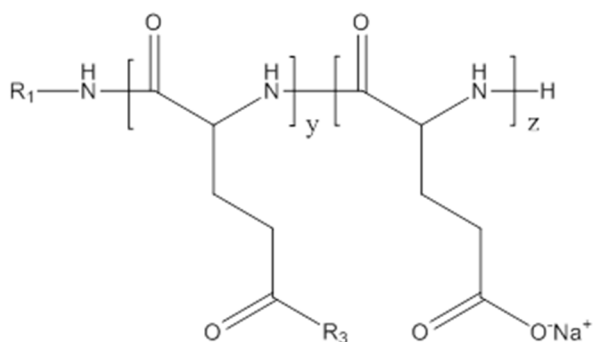


donde:

- R_1 representa un polietilenglicol con un peso molecular de 100 a 20000 g/mol
- R_2 representa un polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 100 a 20000 g, PEG-tiol, o PEG-4-tiopiridil.
- R_3 representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol, polietilenglicol desde $n=2$ a $n=16$, un aminoácido o un grupo amino secundarios o terciarios;
- y representa el número de unidades de glutámico modificadas con el grupo R_3 en el polímero, de 1 a 500;
- z representa el número de unidades de glutámico sin modificar en el polímero, de 1 a 1000; y
- R_2 y R_3 pueden usarse para la unión de agentes bioactivos (incluyendo fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos), sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, complejos de coordinación para MRI, PET y sondas SPECT.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde R_3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina y cisteína.

7. Un poliglutamato obtenido en forma dibloque, con la fórmula siguiente:



donde:

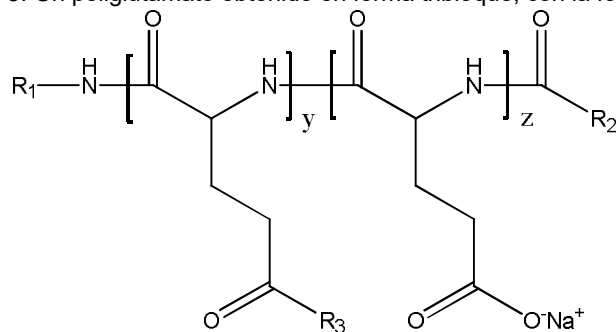
R₁ representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol con un peso molecular de 100 a 20000 g/mol;

R₃ representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de n=2 a n=16, un aminoácido o un grupo amino secundario o terciario;

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

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

8. Un poliglutamato obtenido en forma tribloque, con la fórmula siguiente:



donde:

R₁ representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido (seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol con un peso molecular de 100 a 20000 g/mol.

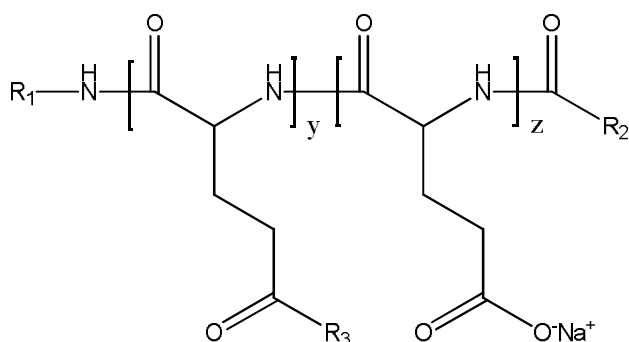
R₂ representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 100 a 20000 g/mol, PEG-tiol o PEG-4-tiopiridil.

R₃ representa un grupo alquilo, un grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol o polietilenglicol de n=2 a n=16, un aminoácido o un grupo amino secundario o terciario;

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

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

9. Un poliglutamato obtenido por medio de la reacción entre los dibloques PEG-PGA previamente obtenidos y un derivado de PEG funcionalizado con un grupo carboxilo activado, obteniéndose los sistemas tri-bloque según se muestra en la formula siguiente:



donde

R₁ representa un polietilenglicol de 100 a 20.000 g/mol.

R₂ representa un polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 100 a 20.000 g/mol, PEG-tiol o PEG-4-tiopridil.

R₃ representa un grupo alquilo, grupo de unión C-terminal definido seleccionado entre un alquino, una azida, un tiol, un haluro, un tiol activado, un alqueno, un éster activado, un alcohol activado, una amina protegida, un grupo maleimido, un acetal y un ácido carboxílico activado, etilenglicol, polietilenglicol, desde n=2 a n=16, un aminoácido o un grupos amino secundarios o terciarios;

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

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

10. El poliglutamato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el aminoácido de R₃ se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina y cisteína.

15

11. Un conjugado que comprende fármacos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, anticuerpos, sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, complejos de coordinación para MRI, PET y sondas SPECT, y el poliglutamato tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde los fármacos de bajo peso molecular, los péptidos, las proteínas, los anticuerpos, las sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, los complejos de coordinación para MRI, PET o las sondas SPECT están conjugadas a través de R₂ y/o R₃

20

12. Un poliglutamato como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso como sistema de liberación y administración de fármacos.

25 13. Un poliglutamato como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso como agente de diagnóstico por imagen molecular.

FIGURA 1

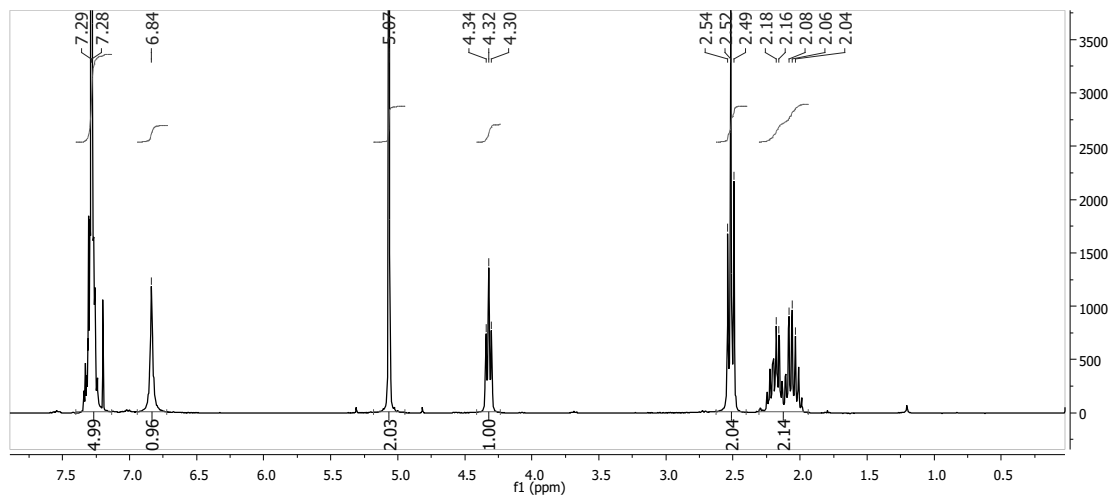


FIGURA 2

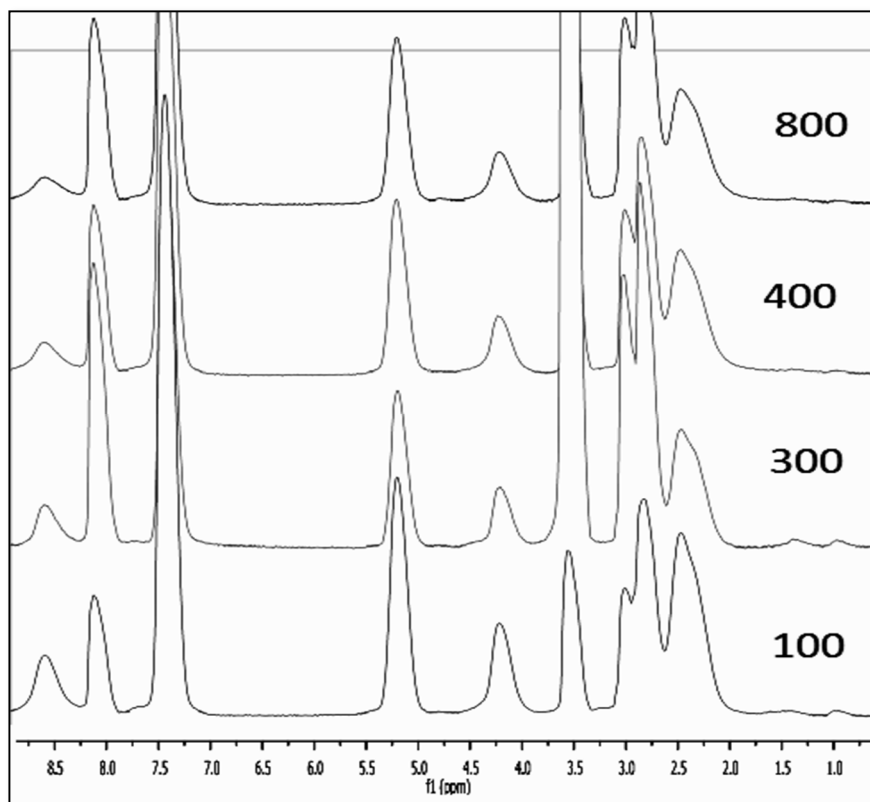


FIGURA 3

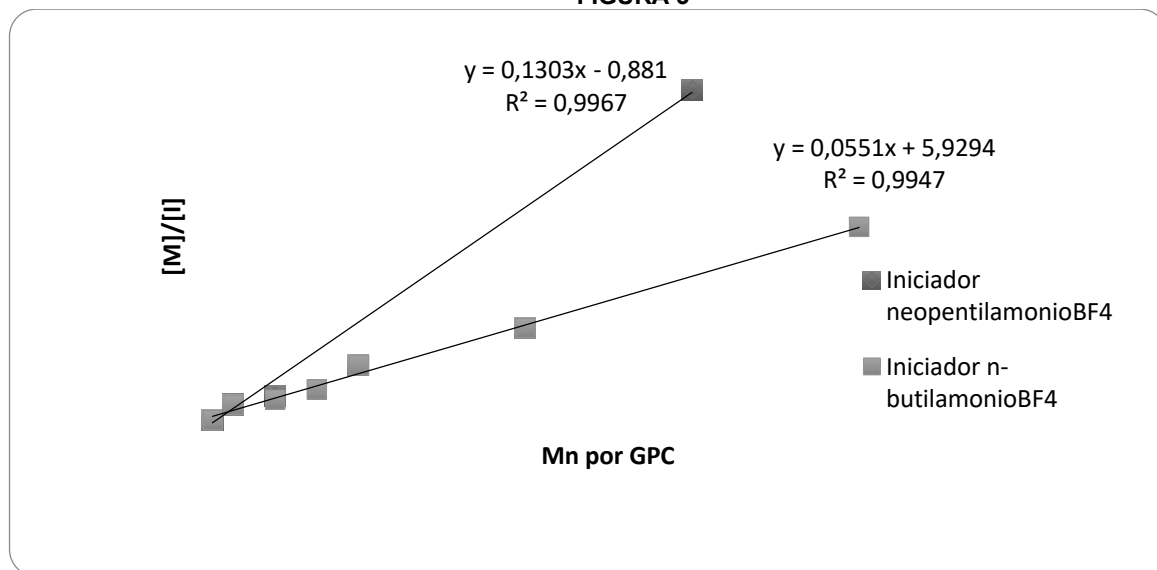


FIGURA 4

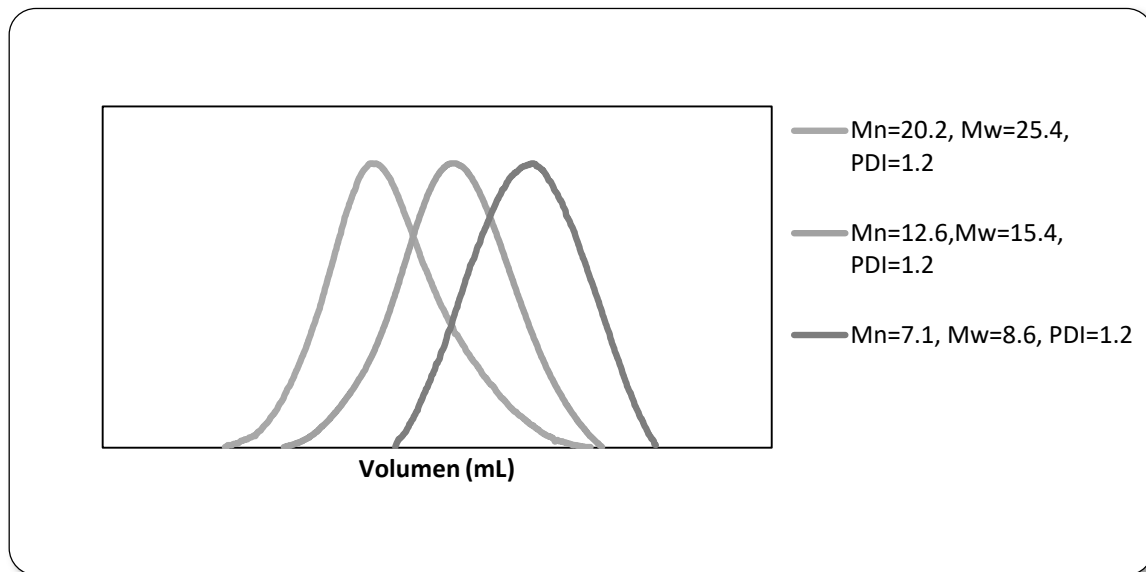


FIGURA 5

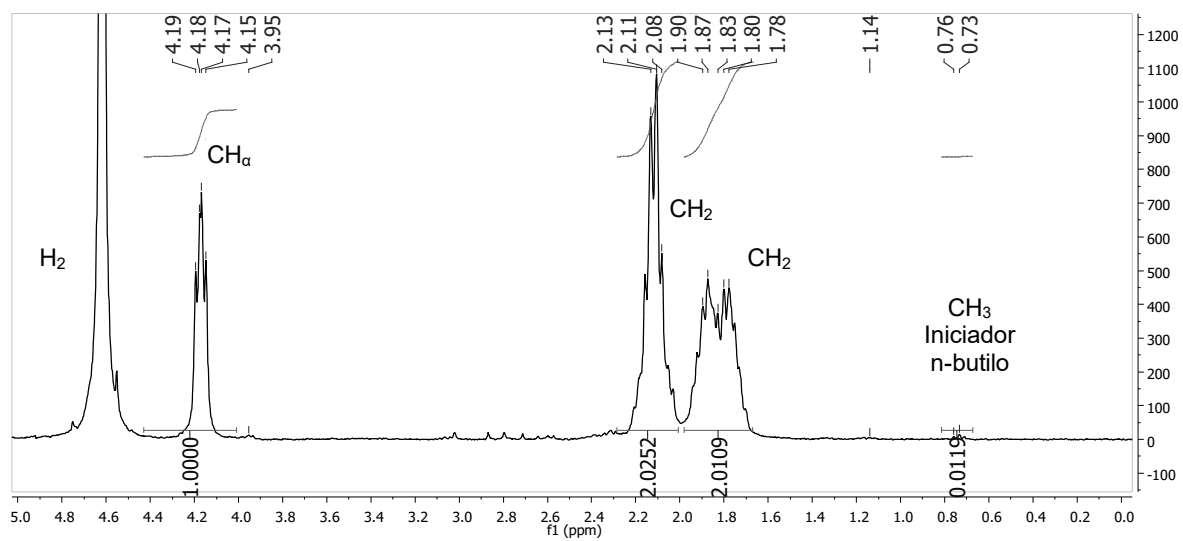


FIGURA 6

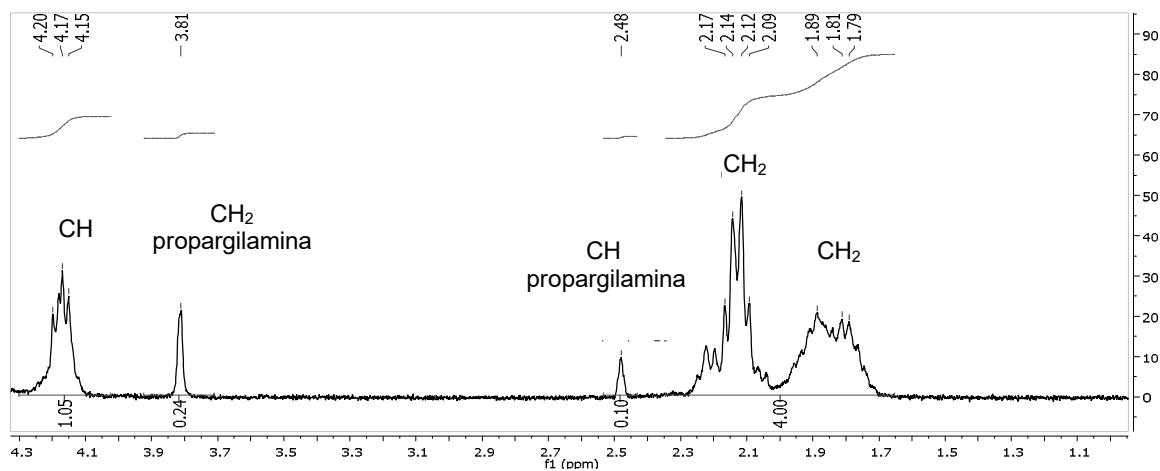


FIGURA 7

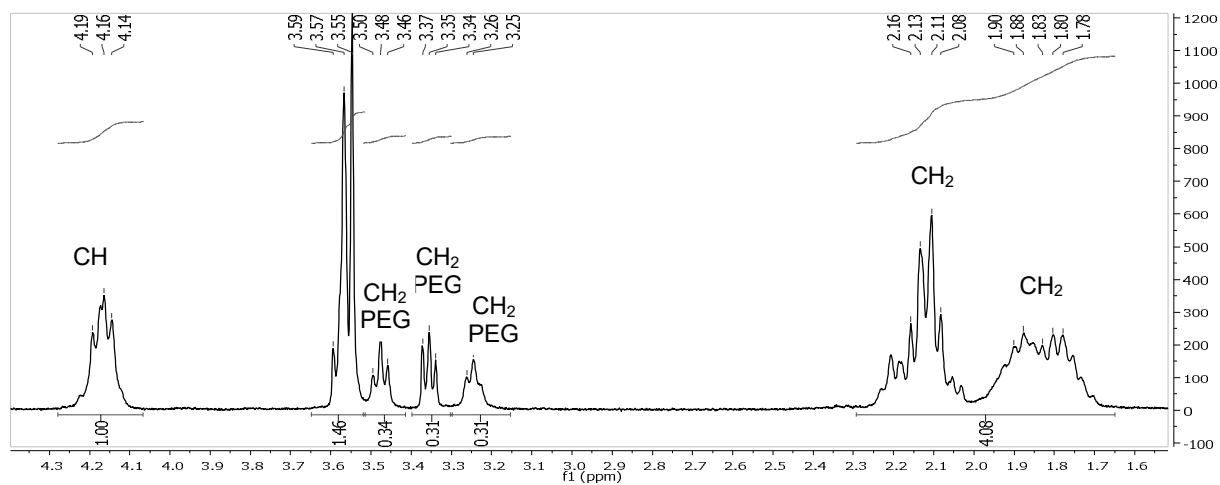


FIGURA 8

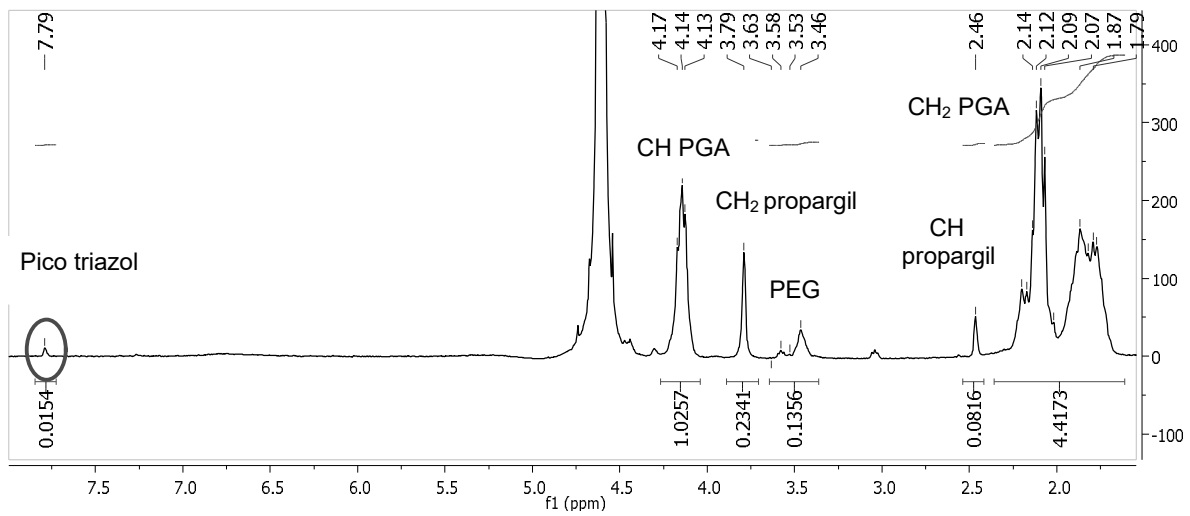
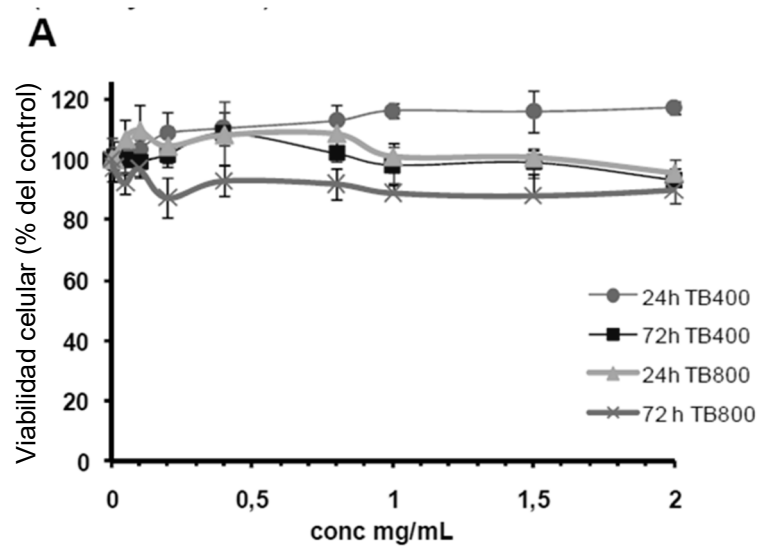


FIGURA 9



B

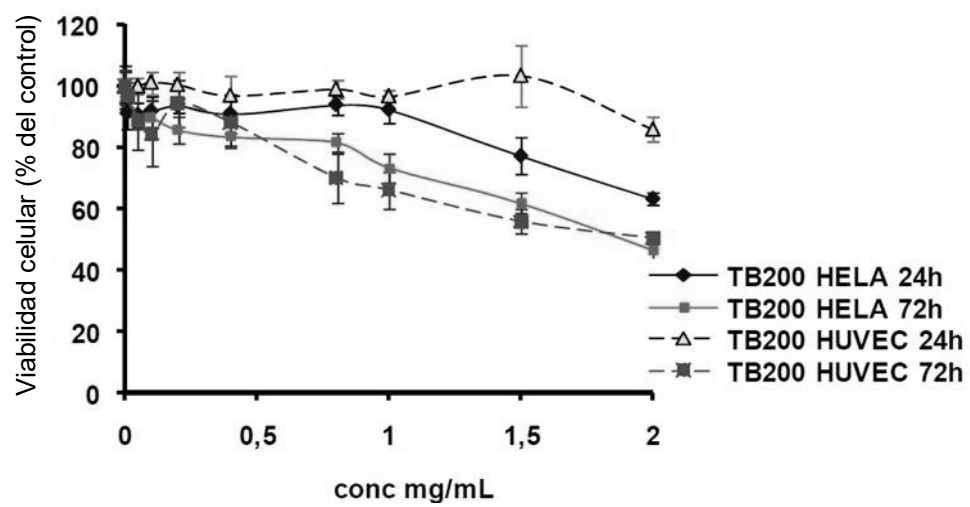


FIGURA 10

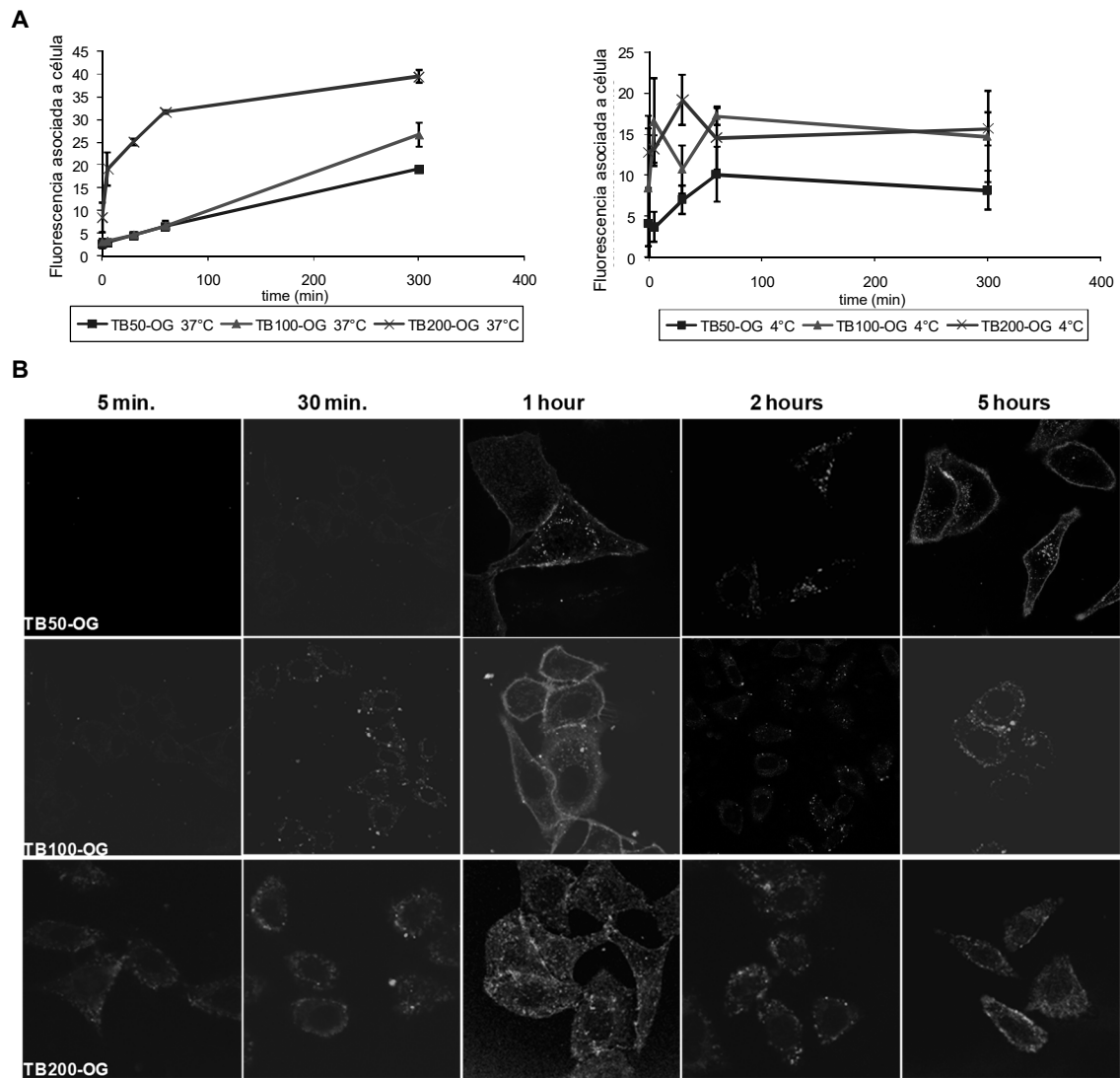
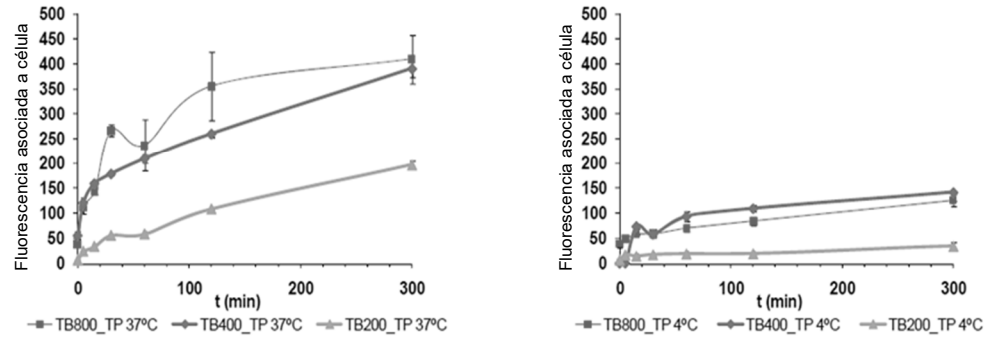


FIGURA 11

A)



B)

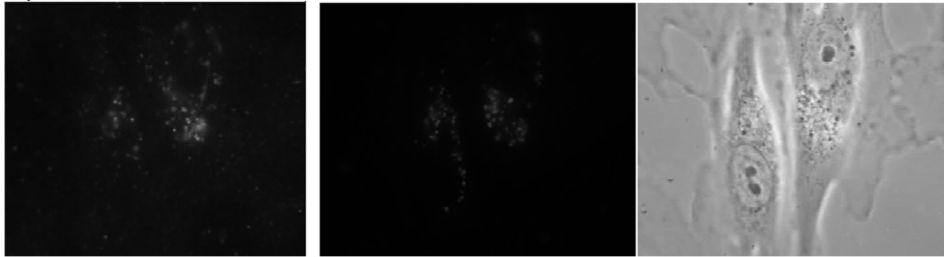


FIGURA 12A

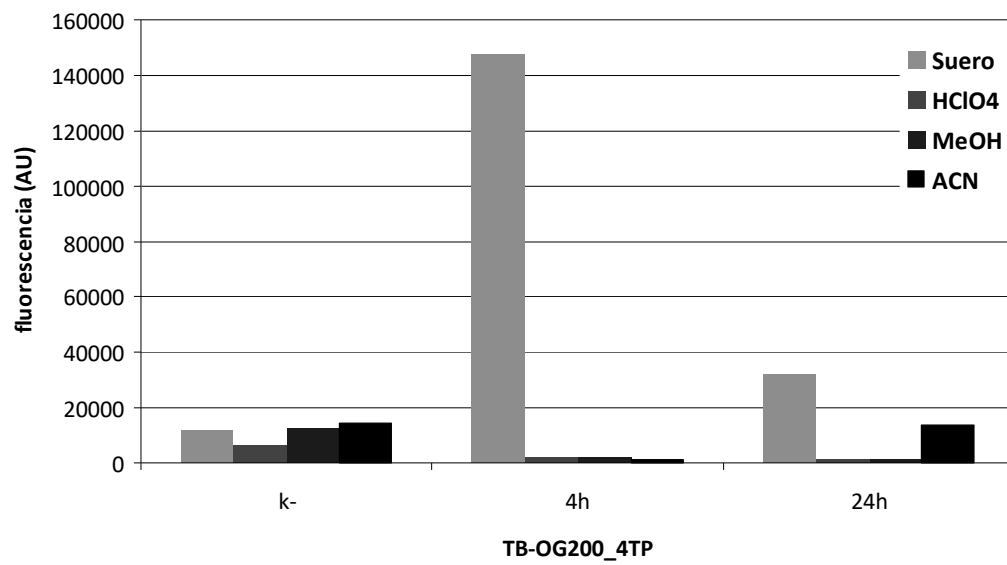


FIGURA 12B

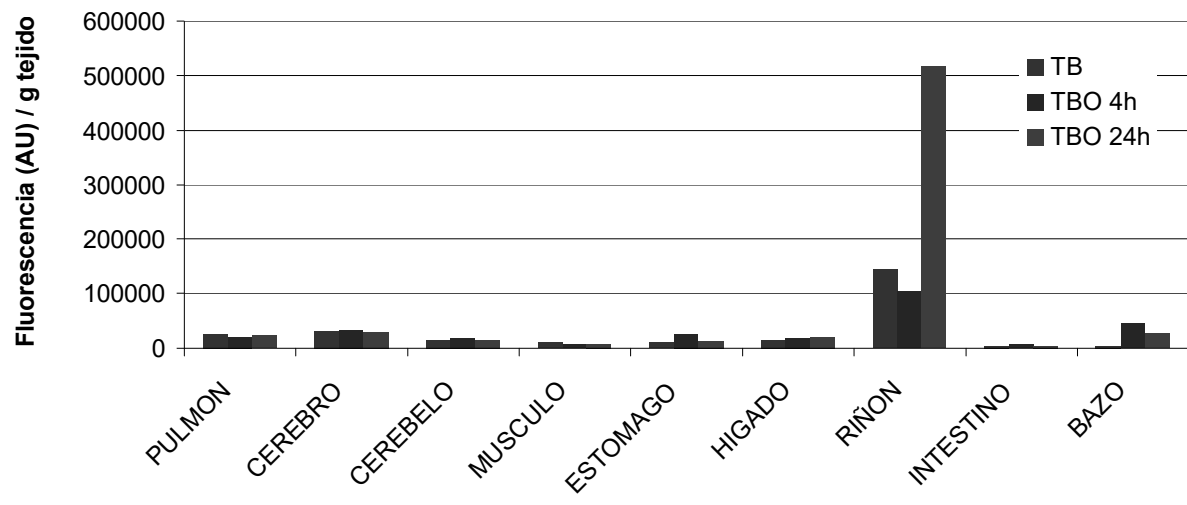
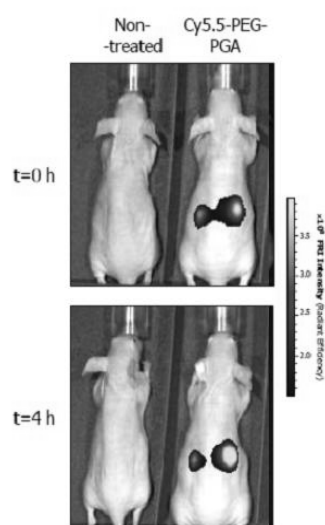


FIGURA 13

(A)



(B)

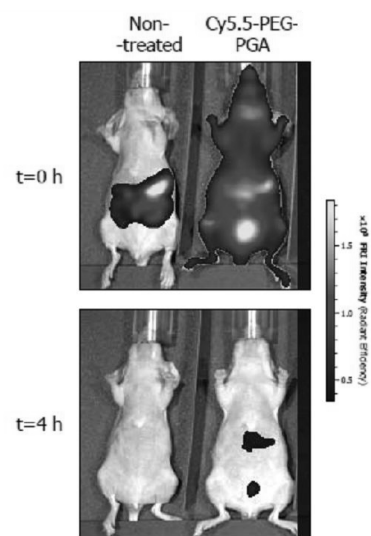


FIGURA 14

A

B

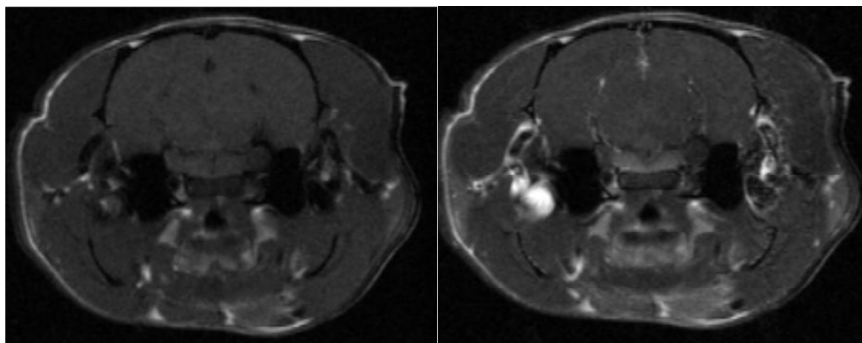
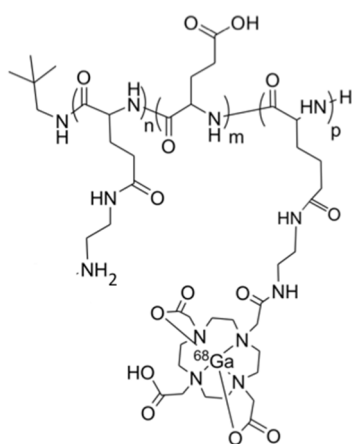
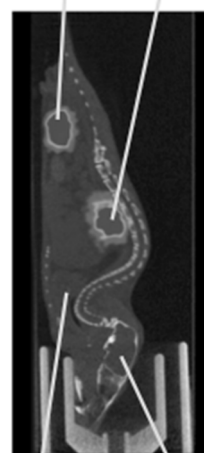


FIGURA 15

(A)



VEJIGA RIÑÓN



CORAZÓN CEREBRO

(B)

