

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/193520 A1

(43) Fecha de publicación internacional
8 de diciembre de 2016 (08.12.2016) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 47/18 (2006.01) *B82Y 5/00* (2011.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070410

(22) Fecha de presentación internacional:
31 de mayo de 2016 (31.05.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 201530765 1 de junio de 2015 (01.06.2015) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA** [ES/ES]; Campus Plz. San Fº (Edf. Interfacultades), C/ Pedro Cerbuna, 12, 50009 Zaragoza (ES). **UNIVERSITY OF SURREY** [GB/GB]; Surrey, Guildford GU2 7XH (GB).

(72) Inventores: **MUÑOZ DE MIGUEL, Edgar Manuel**; Instituto de Carboquímica (ICB), C/ Miguel Luesma Castan, 4, 50015 Zaragoza (ES). **CEBOLLA BURILLO, Vicente Luis**; Instituto de Carboquímica (ICB), C/ Miguel Luesma Castan, 4, 50015 Zaragoza (ES). **GARRIGA MATEO, Rosa**; Universidad de Zaragoza, Campus Plz. San Fº (Edf. Interfacultades), C/ Pedro Cerbuna, 12, 50009 Zaragoza (ES). **DALTON, Alan Brian**; University of Surrey, Surrey, Guildford GU2 7XH (GB). **JUREWICZ,**

Izabela; University of Surrey, Surrey, Guildford GU2 7XH (GB).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF OLIGOGLYCINE TECTOMERS AS MULTIFUNCTIONAL TRANSPORTERS

(54) Título : USO DE TECTÓMEROS DE OLIGOGLICINAS COMO TRANSPORTADORES MULTIFUNCIONALES

(57) Abstract: The present invention relates to the use of oligoglycine tectomers as a biocompatible vehicle for transporting hydrophobic and hydrophilic substances, characterised in that the substance is incorporated into the tectomer and released therefrom by means of pH changes in the medium. The hydrophilic substances include functionalised forms of carbon nanotubes, graphene, and graphene oxide.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas como vehículo biocompatible para el transporte de sustancias tanto con carácter hidrofóbico como hidrofílico, caracterizado por que esta sustancia se incorpora y libera del tectómero mediante cambios de pH del medio. Entre las sustancias con carácter hidrofílico se incluyen formas funcionalizadas de nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno.



WO 2016/193520 A1

USO DE TECTÓMEROS DE OLIGOGLICINAS COMO TRANSPORTADORES MULTIFUNCIONALES

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas como vehículo biocompatible para el transporte de sustancias tanto con carácter hidrofóbico como hidrofílico, caracterizado por que esta sustancia se incorpora y libera del tectómero mediante cambios de pH del medio. Entre las sustancias con carácter

10 hidrofílico se incluyen estructuras carbonadas como son las formas funcionalizadas de nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Los tectómeros son agregados supramoleculares singulares de moléculas de oligoglicina (ver, por ejemplo, ChemBioChem 2003, 4, 147–154; Nanotechnologies in Russia 2008, 3, 291–302; J. Org. Chem. 2014, 10, 1372–1382). La formación de tectómeros se ve favorecida al aumentar el pH hacia regiones básicas. Aunque la formación de tectómeros también tiene lugar en disolución, el ensamblaje se produce

20 dos órdenes de magnitud más rápido sobre superficie de mica (Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2011, 2, 91–97).

Los tectómeros son una nueva clase de biomateriales con claro interés como agentes terapéuticos (ver, por ejemplo, ChemBioChem 2003, 4, 147–154 y Glycoconjugate

25 Journal 2004, 21, 471–478). Se ha mostrado la actividad antiviral de tectómeros funcionalizados mediante la unión covalente de monosacáridos u oligosacáridos, por unión específica múltiple a las partículas virales. Así, la adsorción de placas de tectómero glicosilado sobre la superficie del virus de la gripe bloquea la adhesión del virus a las células. Por otro lado, los tectómeros son capaces de formar capas

30 perfectamente planas a nivel atómico y rígidas, lo que les hace potencialmente útiles en el diseño de nuevos materiales y plataformas para nanodispositivos (ver, por ejemplo, Nanotechnologies in Russia 2008, 3, 291–302.).

Por otro lado, estructuras tales como micelas, liposomas, polímeros, dendrímeros, hidrogeles, nanopartículas y algunos materiales de carbono se han descrito como transportadores biomoleculares.

- 5 Un problema que presentan los liposomas y micelas es su poca superficie de contacto con tejidos celulares y/o superficies debido a su forma esférica, lo que hace que su aplicación en el transporte y liberación de fármacos o materiales se vea dificultada (ver, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105, 11613–11618; y Nature Nanotechnology 2007, 2, 249–255).

10

Por otro lado, los liposomas muestran problemas de estabilidad pues con el tiempo tienden a agregarse y fusionarse, lo cual resulta en el inconveniente de producir fugas de carga y en la necesidad de emplear métodos que aumenten su estabilidad (ver, por ejemplo, Pharmanest, 2011, 2, 301–307; y Nano Letters 2006, 6, 694–698).

15

Los hidrogeles presentan con frecuencia tiempos de respuesta lentos al variar el pH (ver, por ejemplo, Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 53, 321–339).

- Además, se ha propuesto la hipótesis de que se podrían utilizar los tectómeros glicosilados para que queden unidos selectivamente, a través de la función glicosílica y por reconocimiento molecular, con la diana considerada (Nanotechnologies in Russia 2008, 3, 291–302), como se ha realizado con otros ejemplos de sistemas glicosilados distintos a los tectómeros (ver, por ejemplo, Advanced Drug Delivery Reviews 2000, 43, 225–244). Este procedimiento precisaría la previa glicosilación de los tectómeros.

25

Por tanto, sería deseable disponer de tectómeros como nuevos transportadores biocompatibles, altamente estables, para la eficiente y rápida carga y descarga de moléculas y materiales controlada por el pH, con forma plana que maximice la superficie de interacción con tejidos o superficies. Además, sería deseable que en el procedimiento de empleo no se precisase la etapa de glicosilación y que puedan ser utilizados, además de para transportar moléculas, para transportar estructuras carbonadas, como son las formas funcionalizadas de nanotubos de carbono o grafeno.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas como vehículos para el transporte de al menos una sustancia, caracterizado por que esta sustancia se incorpora y libera del tectómero mediante cambios de pH del medio.

5

Por tanto, la presente invención consiste en el transporte de cualquier tipo de entidad química que se pueda incorporar en la estructura de los tectómeros.

10 En la presente invención, el término "tectómero" se refiere a un agregado de moléculas de oligoglicina, que son capaces de autoensamblarse formando estructuras bidimensionales, estables tanto en disolución como sobre superficies. Estas estructuras están estabilizadas por la formación de enlaces de hidrógeno en dos dimensiones entre las glicinas que existen en los extremos de la molécula (llamados antenas). Así, se pueden clasificar los tectómeros en biantenarios, triantenarios y
15 tetraantenarios. A diferencia de la poliglicina, cuya estructura es helicoidal, en los tectómeros la formación de los enlaces de hidrógeno sucede en dos dimensiones.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, para el transporte de al menos una sustancia con
20 carácter hidrofóbico o de al menos una sustancia con carácter hidrofílico.

El término "sustancia con carácter hidrofóbico" se refiere a una sustancia cuya molécula contiene anillos aromáticos y/o heterociclos y/o largas cadenas hidrocarbonadas. Estas sustancias presentan marcado efecto hidrofóbico, que se
25 resume como el conjunto de factores termodinámicos que son responsables del agrupamiento de las partes no polares que contienen las moléculas y la tendencia a localizarse en entornos no polares si los hubiere al verse expuestas a un medio acuoso. Ejemplos de estas sustancias incluyen entre otros, coralina, beta-caroteno, retinol, nitidina, fagaronina, elipticina, acridina y derivados, con interés terapéutico o
30 tecnológico.

El término "sustancia con carácter hidrofílico" se refiere a una sustancia cuya molécula contiene grupos funcionales polares o con carga eléctrica neta, siendo el agua un buen disolvente de este tipo de sustancias. Entre las sustancias con carácter

hidrofílico se incluyen las estructuras carbonadas funcionalizadas con grupos polares o con carga eléctrica neta.

Por “estructura carbonada” se entiende materiales con alto contenido en carbono, entre los que se incluyen los nanotubos de carbono, grafeno y derivados de grafeno tales como el óxido de grafeno.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, donde la sustancia con carácter hidrofílico es una estructura carbonada.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, donde la estructura carbonada se selecciona de nanotubos de carbono, grafeno, derivados de grafeno y cualquier combinación de los mismos, caracterizados por estar funcionalizados con grupos hidrofílicos, y preferiblemente donde los grupos hidrofílicos son grupos carboxilo y el derivado de grafeno es óxido de grafeno.

Las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales con carga negativa de las estructuras carbonadas funcionalizadas y los grupos amino terminales protonados de los tectómeros son las responsables de la formación del complejo.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, donde la sustancia con carácter hidrofóbico se selecciona de un fármaco, una sustancia fluorescente, una sustancia insoluble en agua o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, donde el fármaco y/o la sustancia fluorescente es coralina.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, donde la sustancia insoluble en agua es beta-caroteno.

En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, caracterizado porque a un $\text{pH} \leq 3$, la sustancia con carácter hidrofóbico se libera por completo de los tectómeros.

- 5 En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, caracterizado porque a un $\text{pH} \leq 3$ o a un $\text{pH} \geq 7,4$, la sustancia con carácter hidrofílico se libera por completo de los tectómeros.

- 10 En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, caracterizado por que los tectómeros están funcionalizados, y preferiblemente glicosilados.

- 15 En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha definido anteriormente, como sensores de pH basados en la fluorescencia.

- 20 Así, se demuestra que los tectómeros son atractivos como transportadores biocompatibles de moléculas con considerable carácter hidrofóbico, y también de estructuras carbonadas, como son los nanotubos de carbono y/o grafeno funcionalizados con grupos hidrofílicos, y por ello presentan interés en aplicaciones terapéuticas, sensores fluorescentes, así como en un amplio rango de aplicaciones tecnológicas.

- 25 Por tanto, los tectómeros de la invención resultan útiles como vehículos cuya carga y liberación vienen controladas por el pH en ejemplos como: fármacos, vacunas, biodestoxificación, cosméticos, bioadhesivos, obtención de imágenes por fluorescencia, sensores y transporte en disolución acuosa de sustancias poco solubles en agua que, por ejemplo en el caso de retinol y otras vitaminas liposolubles, puede tener interés en el campo de nutrición o cosmética.

- 30 Asimismo, se pueden utilizar como transportadores sensibles al pH para la carga y liberación de nanotubos de carbono que lleven incorporados grupos funcionales. También, se pueden usar para inmovilizar nanotubos de carbono sobre virus, superficies, etc., donde los propios nanotubos funcionalizados pueden actuar como
35 sistemas de transporte de fármacos (ver, por ejemplo, Current Opinion in Chemical

Biology 2005, 9, 674–679). Y, también, como sensores de la inmovilización de nanotubos de carbono por los tectómeros tanto por funcionalización de los nanotubos de carbono con marcadores fluorescentes, como detectando las propiedades intrínsecas de los nanotubos de carbono. Y, ya que los tectómeros son biofuncionalizables, tanto en la etapa de oligoglicina monómero como ya ensamblado el tectómero, esto ofrece amplias perspectivas en cuanto a la inmovilización.

Finalmente, los tectómeros en la invención resultan útiles en la separación selectiva de formas funcionalizadas de grafeno de disoluciones acuosas, pudiendo estos materiales llevar unidos fármacos, ácidos nucleicos, etc [Small 2011, 7, 1569–1578.]. Las formas funcionalizadas de grafeno pueden ser liberadas del tectómero cambiando el pH. También, son útiles en la inmovilización de formas funcionalizadas de grafeno sobre superficies recubiertas de tectómero. La forma plana de los tectómeros favorece su interacción con las formas funcionalizadas de grafeno, que también poseen estructuras bidimensionales. Y, ya que los tectómeros son biofuncionalizables, tanto en la etapa de oligoglicina monómero como ya ensamblado el tectómero, esto ofrece amplias perspectivas en cuanto a la inmovilización.

Como también se ha mencionado, entre las ventajas de los tectómeros de la invención, cabe destacar su forma plana, que permite que se maximice la superficie de contacto entre el tectómero y tejidos celulares o superficies, lo cual es una ventaja respecto a la forma esférica de micelas y liposomas.

Además, los tectómeros son muy estables porque se pueden almacenar en disolución durante tiempos largos, particularmente durante al menos tres meses, y a temperatura ambiente. Además de uso en disolución, los tectómeros pueden utilizarse cubriendo superficies sólidas secas.

Los tectómeros permiten una carga y descarga rápida, eficiente y reversible mediante el control del pH.

La formación de tectómeros y su solubilidad en disolución acuosa depende del número de antenas, del número de unidades de glicina en las antenas, de la longitud de la parte hidrofóbica, de la concentración empleada, de la temperatura y del pH del medio.

Otra característica de los tectómeros es que son biodegradables.

La disolución de tectómeros cargados se puede liofilizar o depositarse formando films, lo que facilita su manipulación.

5

Ya que los tectómeros son biofuncionalizables, tanto en la etapa de oligoglicina monómero como ya ensamblado, esto ofrece amplias perspectivas en cuanto a la inmovilización selectiva en lugares de interés.

10 En otra realización, la invención se refiere al uso de los tectómeros de oligoglicinas tal y como se ha descrito anteriormente, como vehículos para el transporte de biomoléculas, y preferiblemente para el transporte de proteínas, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, metabolitos primarios, metabolitos secundarios y carbohidratos.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la
20 invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Fig. 1.** Caracterización estructural de los tectómeros. a) Imagen de microscopia electrónica de transmisión (TEM) correspondiente a una disolución de oligoglicina biantenaria $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua MilliQ (pH 6,3). b) Patrón de difracción de electrones mostrando la estructura cristalina del tectómero. c) Imagen de microscopía de fuerzas atómicas (AFM) de topografía, y perfil, mostrando estructura plana, con un grosor para
30 la placa individual de tectómero de oligoglicina biantenaria de $\sim 6 \text{ nm}$.

Fig. 2. a) Espectro de fluorescencia de emisión, mostrando los aumentos de la fluorescencia de la coralina en presencia de cantidades crecientes de oligoglicina en agua MilliQ (pH 6,3). b) Gráfica que permite el cálculo del coeficiente de reparto K_p de la coralina en los agregados tectoméricos en agua MilliQ.
35

Fig. 3. Estructura química de la coralina y la oligoglicina biantenaria, así como la imagen de microscopía confocal de fluorescencia, mostrando la incorporación de la molécula fluorescente coralina en el tectómero.

5

Fig. 4. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la coralina en disolución acuosa en ausencia (línea punteada) y en presencia (línea continua) de oligoglicina biantenaria. b) Espectros tras someter ambas muestras a daño fotoquímico, mostrando la protección de la coralina debido a su incorporación en los tectómeros (línea continua).

10

Fig. 5. Carga y descarga de coralina en los tectómeros, monitorizada por espectroscopía vis-UV. Se muestra cómo, partiendo de una disolución de coralina/oligoglicina biantenaria en agua MilliQ (pH 6,3) (figura A), si el pH aumenta al valor 7,4 (figura B), ocurre la agregación masiva de la oligoglicina, y los tectómeros formados precipitan (se muestra la imagen de microscopía TEM del precipitado). Observar, en los espectros vis-UV, la desaparición de cierta cantidad de coralina de la disolución al comparar los espectros A y B. Posteriormente, al cambiar el pH hasta el valor 3,0 (figura C), el precipitado es inmediata y completamente redissuelto, liberándose la coralina (espectro C).

15

20

Fig. 6. Demostración de la solubilidad de β -caroteno en fase acuosa conteniendo oligoglicina biantenaria. En la figura a) la capa acuosa (superior) es agua MilliQ y la fase inferior es diclorometano. En la figura b) la capa acuosa (superior) contiene oligoglicina, y puede observarse cómo se ha transferido una cantidad apreciable de beta-caroteno de la fase orgánica (inferior) a la fase acuosa conteniendo oligoglicina (superior). La coloración que aparece en la fase acuosa se debe al beta-caroteno transferido, puesto que la disolución de oligoglicina en agua sería incolora.

25

Fig. 7. a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y b) imagen de microscopía ambiental electrónica de barrido (ESEM), correspondientes a una disolución de oligoglicina biantenaria y nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo disueltos en agua MilliQ (pH 6,3). Ambas imágenes confirman la interacción entre los tectómeros y los nanotubos de carbono. c) Medidas de ángulo de contacto de disoluciones en agua MilliQ utilizando vidrio como soporte, que también

30

35

confirman la interacción, pues el aumento del ángulo de contacto indica la neutralización parcial de las cargas negativas de los grupos carboxilo de los nanotubos de carbono. En d) la imagen de TEM muestra el efecto de cambiar el pH al valor 3,0: el tectómero ha liberado a los nanotubos de carbono (comparar con la figura a). En e) se muestra la imagen TEM en la que se aprecia que también una oligoglicina tetraantenaria se une masivamente a los nanotubos carboxilados. En la figura f) se muestran películas de materiales compuestos de nanotubos de carbono carboxilados con oligoglicina biantenaria (i) u oligoglicina tetraantenaria (ii). (Notar que se forman películas notablemente más densas con la oligoglicina tetraantenaria).

10

Fig. 8. a) Precipitación del óxido de grafeno al añadir una disolución de oligoglicina biantenaria (i) o tetraantenaria (ii) en agua MilliQ (pH 6,3), debido a su interacción con los tectómeros. Se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de tectómeros de oligoglicina biantenaria b) y de los materiales compuestos formados con óxido de grafeno c). (Observar en c) la interfase en los complejos formados de tectómero/óxido de grafeno). Se muestran también las micrografías SEM de tectómeros de oligoglicina tetraantenaria d) y de los materiales compuestos formados con óxido de grafeno e).

Fig. 9. Imagen mostrando que las películas de nanotubos de carbono carboxilados sobre un soporte de vidrio se destruyen en contacto con agua (a), y sin embargo, se observa que, con tectómeros de oligoglicina bi-antenaria, éstos inmovilizan eficazmente y protegen la película de nanotubos de carbono frente al agua (b).

Fig. 10. Estudios de viabilidad celular que muestran la aplicación como andamiaje (scaffolds) de los nanotubos de carbono carboxilados y óxido de grafeno inmovilizados mediante tectómeros de oligoglicinas bi- y tetra-antenarias para los cultivos celulares in vitro, demostrando su biocompatibilidad. Las tres líneas celulares empleadas han sido BXPC_3 (a), PANC_1 (b) y ASPC_1 (c).

30

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35

Los estudios de microscopía electrónica, difracción de electrones y de fuerzas atómicas indican que los tectómeros correspondientes a disoluciones $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ presentan estructura cristalina y bidimensional cuyo tamaño es del orden de varias micras, y de espesor $\sim 6 \text{ nm}$ para una placa individual de tectómero de oligoglicina biantenaria (Figura 1).

Ejemplo 1. Carga y descarga rápida, eficiente y reversible, controlada por el pH, de moléculas con considerable carácter hidrofóbico, utilizando oligoglicinas biantenarias.

10

Mediante este ejemplo se demuestra la eficiente carga y descarga de coralina en tectómeros. La molécula elegida en este estudio como fármaco modelo para transportar es la coralina (cloruro de 2,3,10,11-tetrametoxi-8-metilisoquino[3,2-a]isoquinolinio, 38989-38-7 CAS). Dicha molécula tiene propiedades anticancerígenas (WO1997029106) y, además, presenta fluorescencia.

15

Los aumentos de intensidad de fluorescencia obtenidos (Figura 2), las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 3), las medidas de potencial Z y la protección que se han observado respecto al daño fotoquímico (Figura 4) confirman que la coralina se encuentra incorporada dentro de los tectómeros. Se ha calculado, por medio de medidas de intensidad de fluorescencia, un valor de coeficiente de partición de 1×10^4 en agua MilliQ (Figura 2).

20

El proceso de carga de la molécula por el tectómero se realiza a $\text{pH} > 7,4$. A este pH, se precipita el 98% de la oligoglicina, según se ha determinado por medidas de espectroscopía visible-UV. La descarga de coralina de los tectómeros se puede lograr variando el pH a valores ácidos, debido a la inmediata destrucción de los tectómeros, liberando de este modo su contenido. Los tectómeros no son estables a pH ácidos debido a la repulsión electrostática provocada por la protonación de los grupos amino terminales. Se ha comprobado por espectroscopía visible-UV que la liberación de coralina es completa a pH 3,0, siendo los procesos de carga y descarga completamente reversibles (Figura 5). Las disoluciones de tectómero/coralina pueden ser depositadas como películas sobre varios sustratos o liofilizadas (y después redisueltas si se requiere), lo que favorece su manipulación.

30

35

Los resultados también indican que, al cargar los tectómeros con moléculas fluorescentes, es posible considerar a dichos tectómeros como un sensor de pH, pues podemos observar la formación o destrucción de las placas de tectómeros según el pH, mediante imágenes de microscopía confocal de fluorescencia (Figura 3). Así por ejemplo, se podría distinguir tejido normal frente células tumorales, frecuentemente a pH ácido.

Por otro lado, también sería posible trabajar con tectómeros funcionalizados de forma que se vieran imágenes de su colocación selectiva en lugares de interés; por ejemplo los tectómeros cargados con moléculas fluorescentes podrían actuar como sensores de la presencia de virus, dada la capacidad de los tectómeros que se ha descrito de adherirse a virus.

La propiedad esencial en el transporte de moléculas con carácter hidrofóbico por los tectómeros biantenarios radica en la presencia de una cadena hidrocarbonada en la parte central de la molécula de oligoglicina (Figura 3). El efecto hidrofóbico es el responsable del transporte de estas moléculas, como se muestra en el caso de la coralina. Este apartado de la presente invención se refiere pues a tectómeros de oligoglicinas biantenarias, pudiendo variar el número de unidades de glicina en las antenas y con diversas longitudes de cadena hidrocarbonada en la parte central de su estructura, con un número de grupos $-CH_2 > n$ (siendo $n \geq 2$).

Los resultados muestran también que la propiedad de transporte de moléculas con carácter hidrofóbico por los tectómeros puede ser útil para el transporte en agua de moléculas altamente hidrofóbicas e insolubles en agua: por ejemplo, se ha transferido beta-caroteno, que muestra solubilidad nula en agua, de la fase orgánica (diclorometano) a la fase acuosa empleando los tectómeros disueltos en fase acuosa como vehículos (Figura 6). Es posible mantenerlos en disolución acuosa o precipitarlos según el pH.

30

Ejemplo 2. Carga y descarga rápida, eficiente y reversible, controlada por el pH, de nanotubos de carbono.

Se ha demostrado que los tectómeros de oligoglicinas bi-y tetra-antenarias se unen eficientemente a nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo en agua

35

MilliQ (Figura 7), siendo el complejo completamente soluble. Además se ha observado que, cambiando el pH a valores ≤ 3.0 o bien ≥ 7.4 , los nanotubos de carbono son liberados de los vehículos tectómicos. Además se han fabricado películas de tectómero/nanotubos de carbono sobre una variedad de sustratos por deposición de disoluciones conteniendo tectómero/nanotubos de carbono. Estas películas se deshacen inmediatamente cambiando el pH. De forma similar se han fabricado películas de tectómero (cargado con coralina)/nanotubos de carbono. Las disoluciones empleadas pueden ser liofilizadas, lo que facilita su manipulación.

Las interacciones electrostáticas entre los grupo amino terminales protonados de los tectómeros y los grupos funcionales cargados negativamente de los nanotubos de carbono son los responsables de la formación del complejo tectómeros/nanotubos de carbono. Por ello este procedimiento resulta válido para diferentes formas funcionalizadas de nanotubos de carbono.

Cambiando el pH a valores $\leq 3,0$ o bien $\geq 7,4$ se ha observado que los nanotubos de carbono funcionalizados son liberados completamente del tectómero, ya que a estos valores de pH o bien los grupos funcionales de los nanotubos de carbono no llevan carga negativa o bien los tectómeros no llevan carga positiva.

Ejemplo 3. Carga y descarga rápida, eficiente y reversible de grafeno, controlada por el pH.

Se ha demostrado que los tectómeros de oligoglicinas bi- y tetra-antenarias se unen eficazmente a óxido de grafeno en agua MilliQ (Figura 8). El complejo precipita, lo que es un resultado muy interesante, ya que el óxido de grafeno es altamente soluble en agua MilliQ. Mediante medidas de espectroscopía vis-UV se cuantificó que la desaparición del óxido de grafeno de la disolución es completa tras producirse la precipitación, demostrando la interacción con los tectómeros.

Las interacciones electrostáticas entre los grupos amino terminal de los tectómeros y los grupos funcionales con carga negativa del óxido de grafeno son responsables de la formación del complejo. Por ello este principio se puede aplicar a otras formas funcionalizadas de grafeno.

Cambiando el pH a valores $\leq 3,0$ o bien $\geq 7,4$ se ha observado que el óxido de grafeno es liberado completamente del tectómero y puesto de nuevo en la disolución, ya que a estos valores de pH o bien los grupos funcionales del óxido de grafeno no llevan carga negativa o bien los tectómeros no llevan carga positiva.

5

Ejemplo 4. Inmovilización de nanotubos de carbono funcionalizados (carboxilados) sobre superficies tales como vidrio o mica mediante los tectómeros de oligoglicinas bi- y tetra-antenarias.

10 Se han obtenido películas (films) por deposición y posterior evaporación, sobre mica o vidrio, de una disolución de nanotubos de carbono carboxilados, así como una disolución de nanotubos de carbono carboxilados/tectómeros. Los resultados muestran que las películas de nanotubos de carbono carboxilados/tectómeros permanecen inalteradas al ser sometidas al contacto con agua. Sin embargo, las
15 películas de nanotubos sin tectómeros se deterioran y despegan de la superficie (Figura 9), por lo que los tectómeros muestran una acción protectora bioadhesiva. Las películas que incluyen tectómeros se eliminan fácilmente por lavado con tampón pH 2,2.

20 Asimismo, se han fabricado películas de tectómeros cargados con el fluoróforo coralina y películas de nanotubos de carbono carboxilados/tectómeros cargado con el fluoróforo coralina, de interés para fabricar sensores.

**Ejemplo 5. Utilización de películas de tectómeros, nanotubos de carbono carboxilados/tectómeros y óxido de grafeno/tectómeros de oligoglicinas bi- y
25 tetra-antenarias para cultivo celular in vitro.**

Se han realizado estudios de viabilidad celular que muestran la aplicación como andamiaje (scaffolds) de los nanotubos de carbono carboxilados y óxido de grafeno inmovilizados mediante tectómeros de oligoglicinas bi- y tetra-antenarias para los
30 cultivos celulares in vitro, demostrando su biocompatibilidad. Así, se han formado películas por secado gota a gota durante 24 horas (drop-casting) sobre placas de 96 pocillos y después se han esterilizado durante 30 minutos mediante irradiación vis-UV. El test de viabilidad utilizado ha sido: CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell
35 Proliferation Assay. Se han elegido líneas de células cancerosas, ya que es muy activa la investigación realizada sobre el comportamiento de las células cancerosas in vitro

frente a tratamientos como radioterapia, quimioterapia, influencia del entorno, etc., así como la comprensión del crecimiento tumoral. Se han empleado tres líneas celulares: BXPC_3: Adenocarcinoma pancreático primario humano; PANC_1: Carcinoma pancreático humano, línea celular tipo epitelial; ASPC_1: Metastasis de páncreas (ascitis).

Según los resultados obtenidos (Figura 10), la presencia de nanotubos de carbono carboxilados afectó significativamente el crecimiento celular, observándose que el crecimiento celular disminuye gradualmente con el tiempo para las tres líneas celulares crecidas sobre estas películas de nanotubos, pudiéndose incluso decir que los nanotubos de carbono son tóxicos para las células en el caso de la línea celular BXPC_3. Sin embargo, se observó que la viabilidad celular es superior cuando los cultivos celulares fueron realizados sobre películas de nanotubos de carbono carboxilados/oligoglicinas bi- y tetra-antenarias, lo cual demuestra su biocompatibilidad. En el caso de los ensayos realizados con óxido de grafeno/oligoglicina biantenaria se obtienen respuestas muy similares a los casos con nanotubos de carbono/oligoglicina biantenaria. Finalmente, en los experimentos realizados en películas de oligoglicina bi- y tetra-antenarias sin nanotubos carboxilados ni óxido de grafeno, para todas las líneas celulares estudiadas, se observa que el crecimiento celular no se ve alterado si se compara con las células de los ensayos control (sólo se ralentiza el crecimiento los días 2 y 3 de la línea BXPC_3). Estos resultados demuestran por tanto la biocompatibilidad de los tectómeros de oligoglicina así como de los materiales compuestos consistentes en nanotubos carboxilados y óxido de grafeno inmovilizados en tectómeros de oligoglicina.

La biocompatibilización de nanotubos de carbono y óxido de grafeno es interesante para el empleo de dispositivos electrónicos, sensores, etc. basados en nanotubos de carbono en sistemas biológicos. Asimismo posibilitan el empleo de nanotubos de carbono en estudios de cultivos celulares, que también se utilizan para simular a escala nanométrica la estructura de la matriz extracelular

REIVINDICACIONES

1. Uso de los tectómeros de oligoglicinas como vehículos para el transporte de al menos una sustancia, caracterizado por que esta sustancia se incorpora y libera
5 del tectómero mediante cambios de pH del medio.
2. El uso según la reivindicación 1, para el transporte de al menos una sustancia con carácter hidrofóbico o de al menos una sustancia con carácter hidrofílico.
- 10 3. El uso según la reivindicación 2, donde la sustancia con carácter hidrofílico es una estructura carbonada.
4. El uso según la reivindicación 3, donde la estructura carbonada se selecciona de nanotubos de carbono, grafeno, derivados de grafeno y cualquier combinación de
15 los mismos, caracterizados por estar funcionalizados con grupos hidrofílicos.
5. El uso según la reivindicación 4, donde los grupos hidrofílicos son grupos carboxilo y el derivado de grafeno es óxido de grafeno.
- 20 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde la sustancia con carácter hidrofóbico se selecciona de un fármaco, una sustancia fluorescente, una sustancia insoluble en agua o cualquier combinación de los mismos.
7. El uso según la reivindicación 6, donde el fármaco y/o la sustancia fluorescente es
25 coralina.
8. El uso según la reivindicación 6, donde la sustancia insoluble en agua es beta-caroteno.
- 30 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 6 a 8, caracterizado porque a un $\text{pH} \leq 3$, la sustancia con carácter hidrofóbico se libera por completo de los tectómeros.
10. El uso según las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque a un $\text{pH} \leq 3$ o a un
35 $\text{pH} \geq 7,4$, la sustancia con carácter hidrofílico se libera por completo de los tectómeros.

11. El uso según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que los tectómeros están funcionalizados.
- 5 12. El uso de los tectómeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, como sensores de pH basados en la fluorescencia.

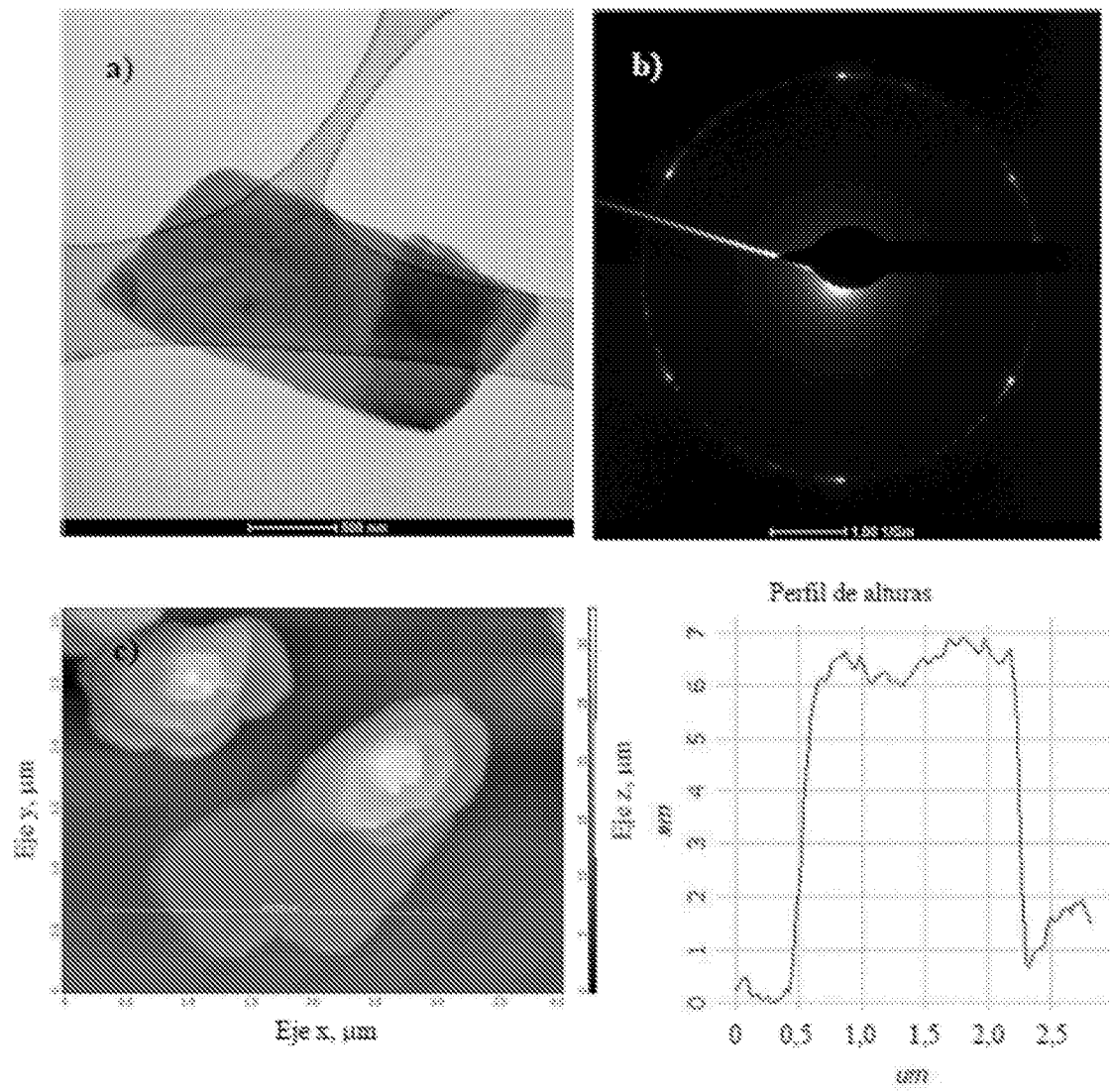


FIG. 1

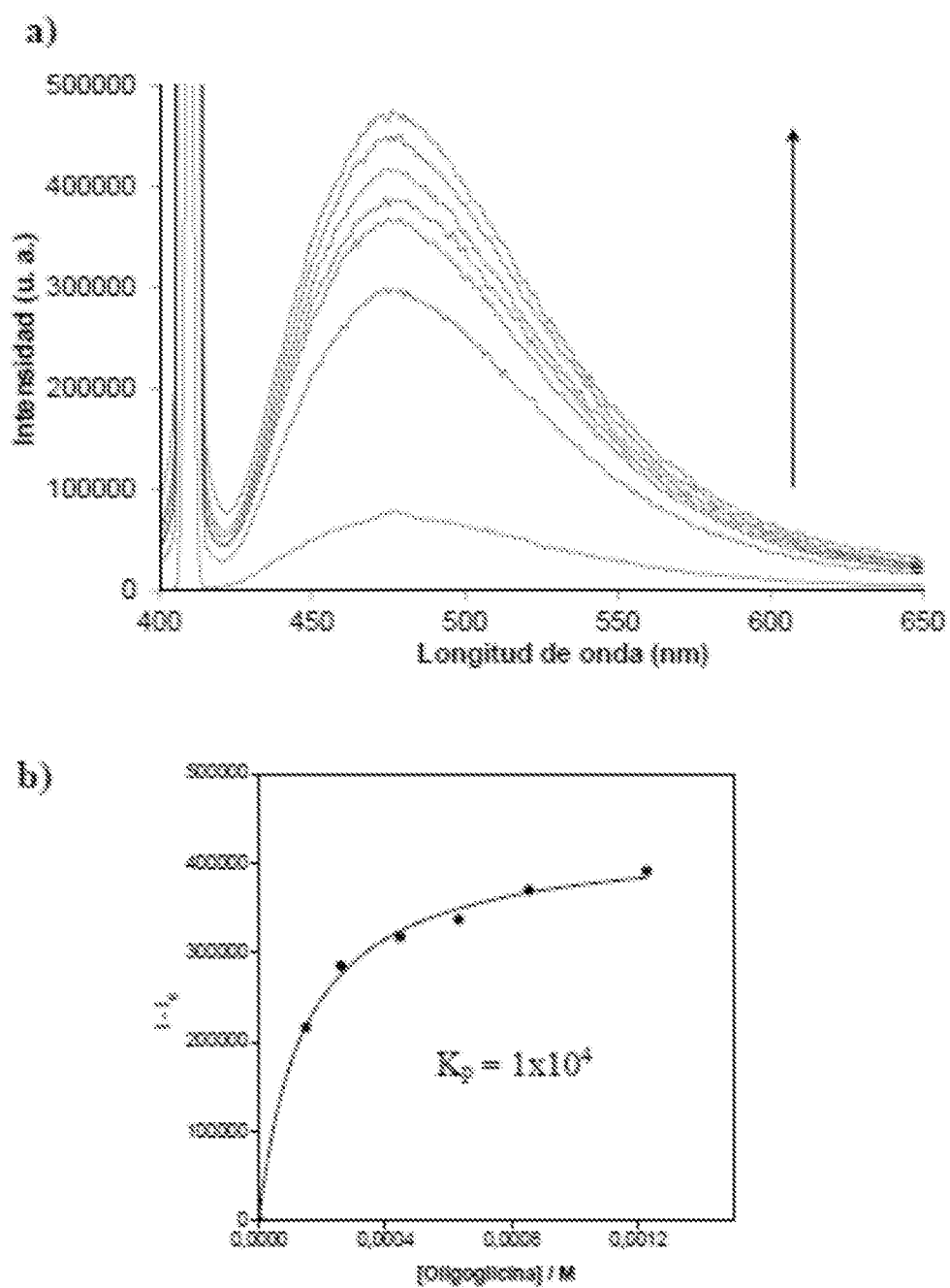


FIG. 2

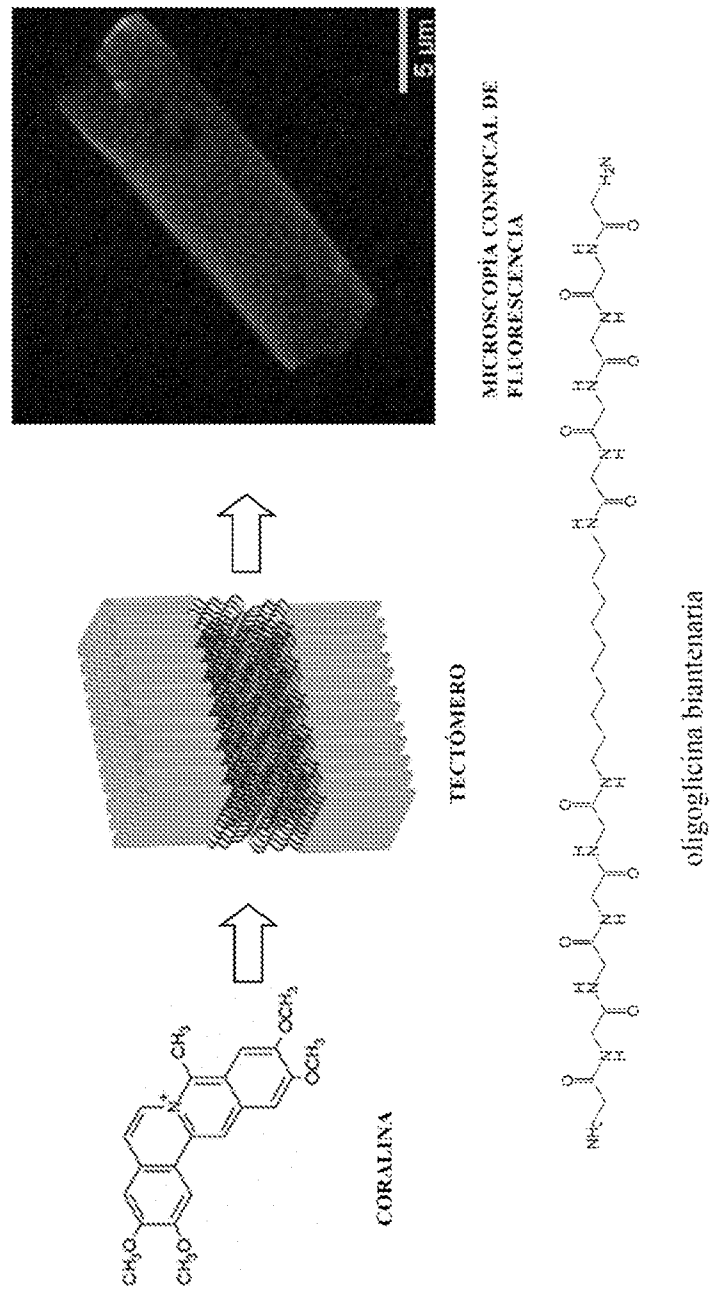


FIG. 3

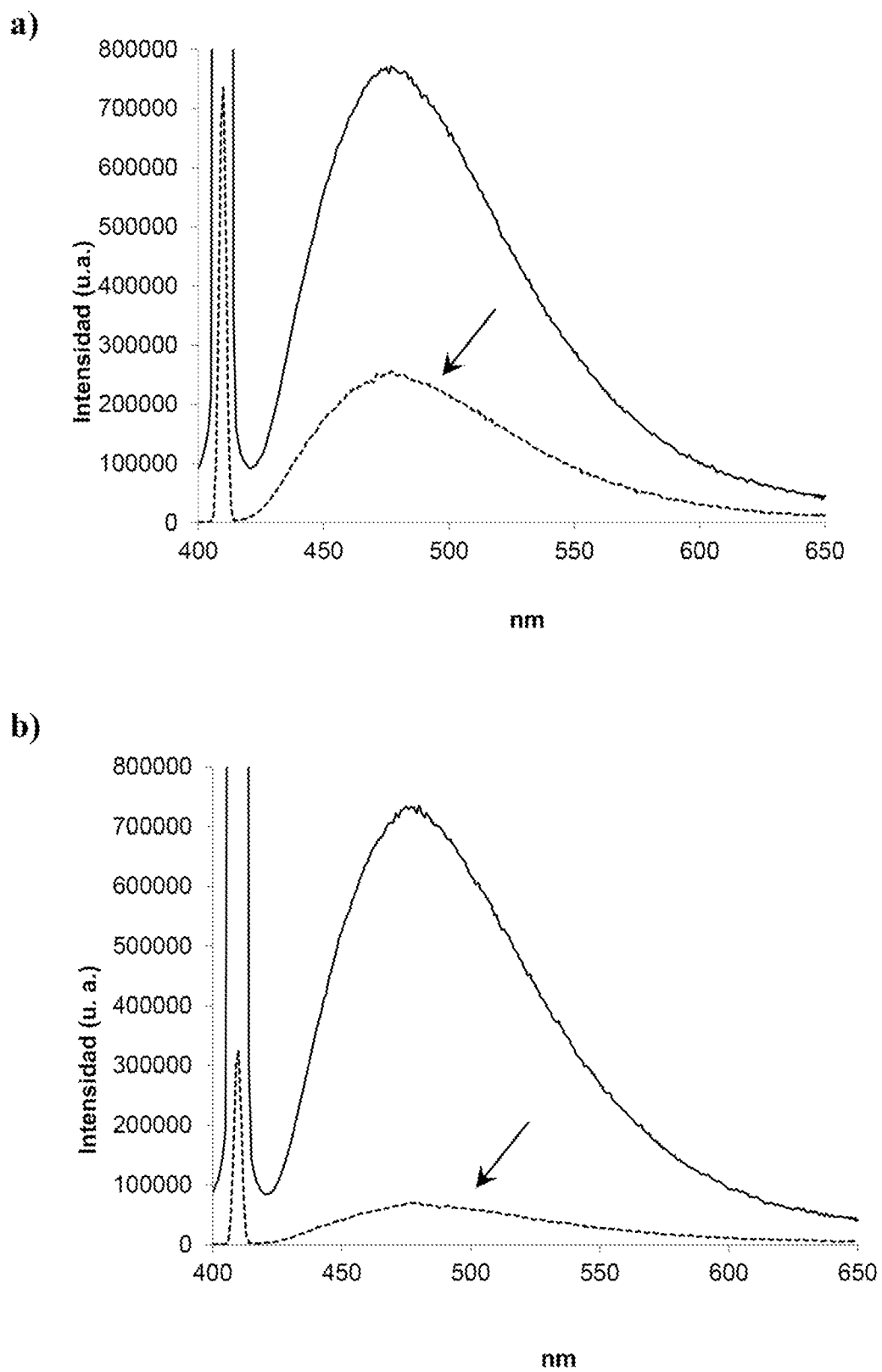


FIG. 4

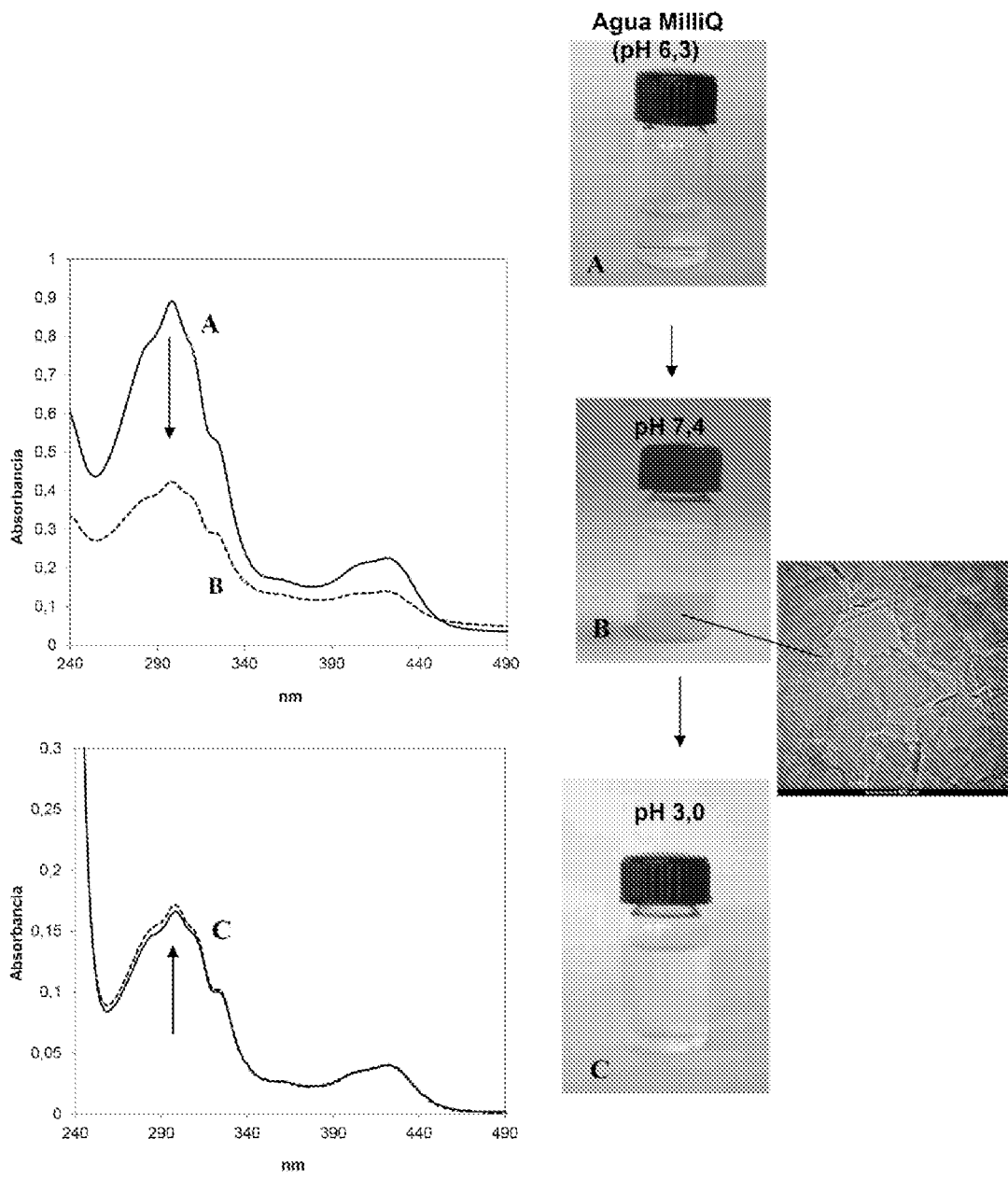


FIG. 5

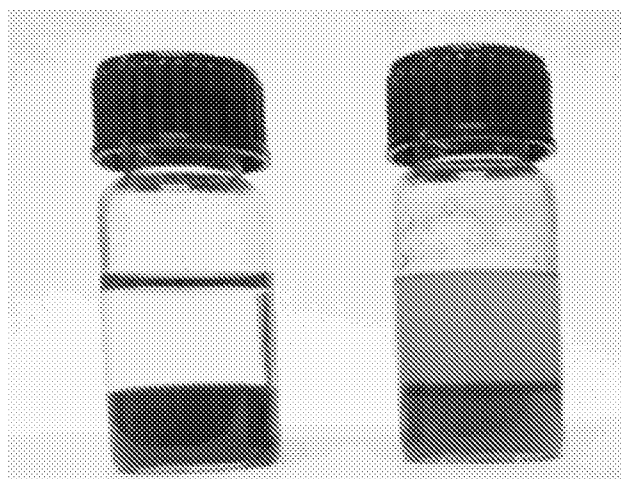


FIG. 6

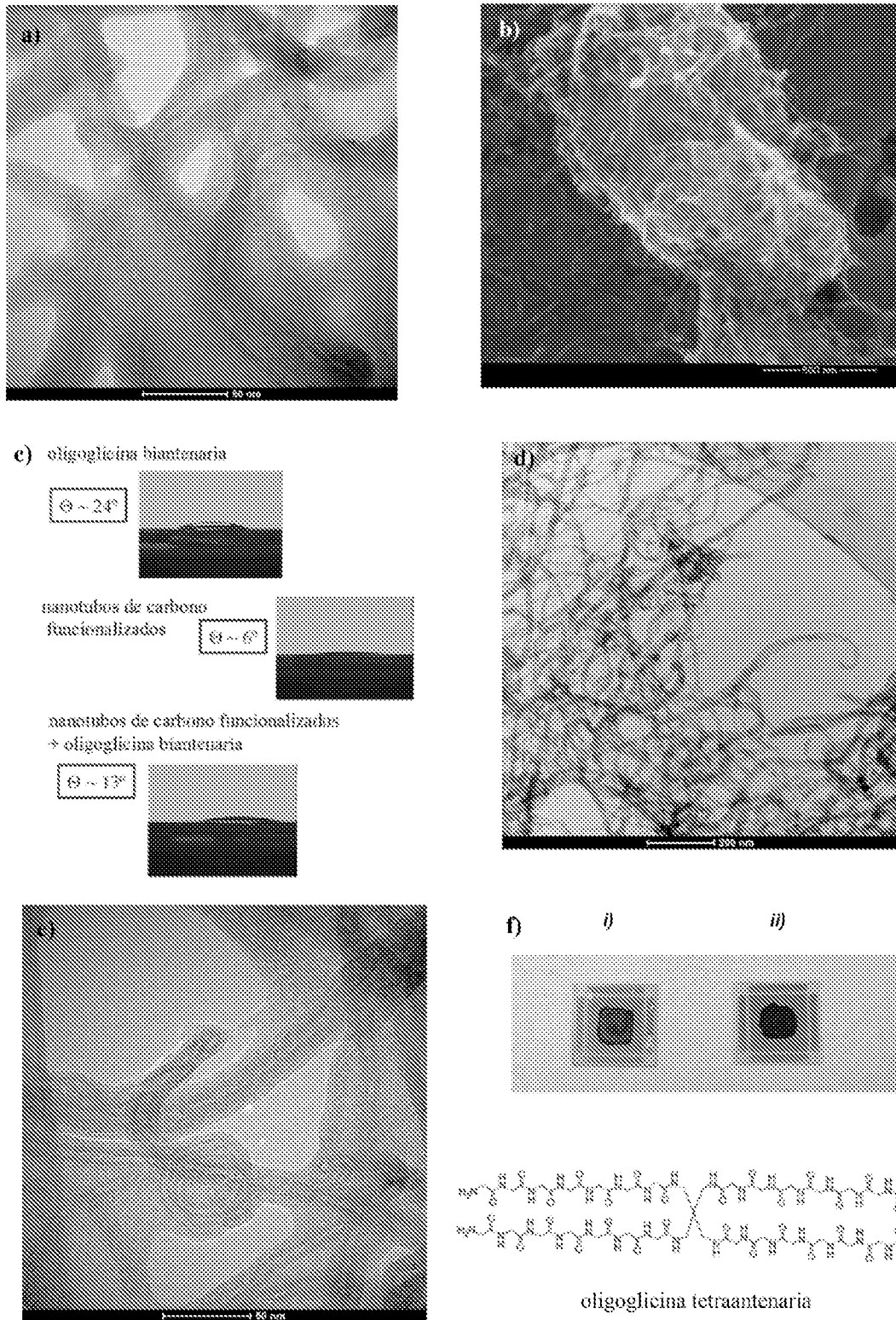


FIG. 7

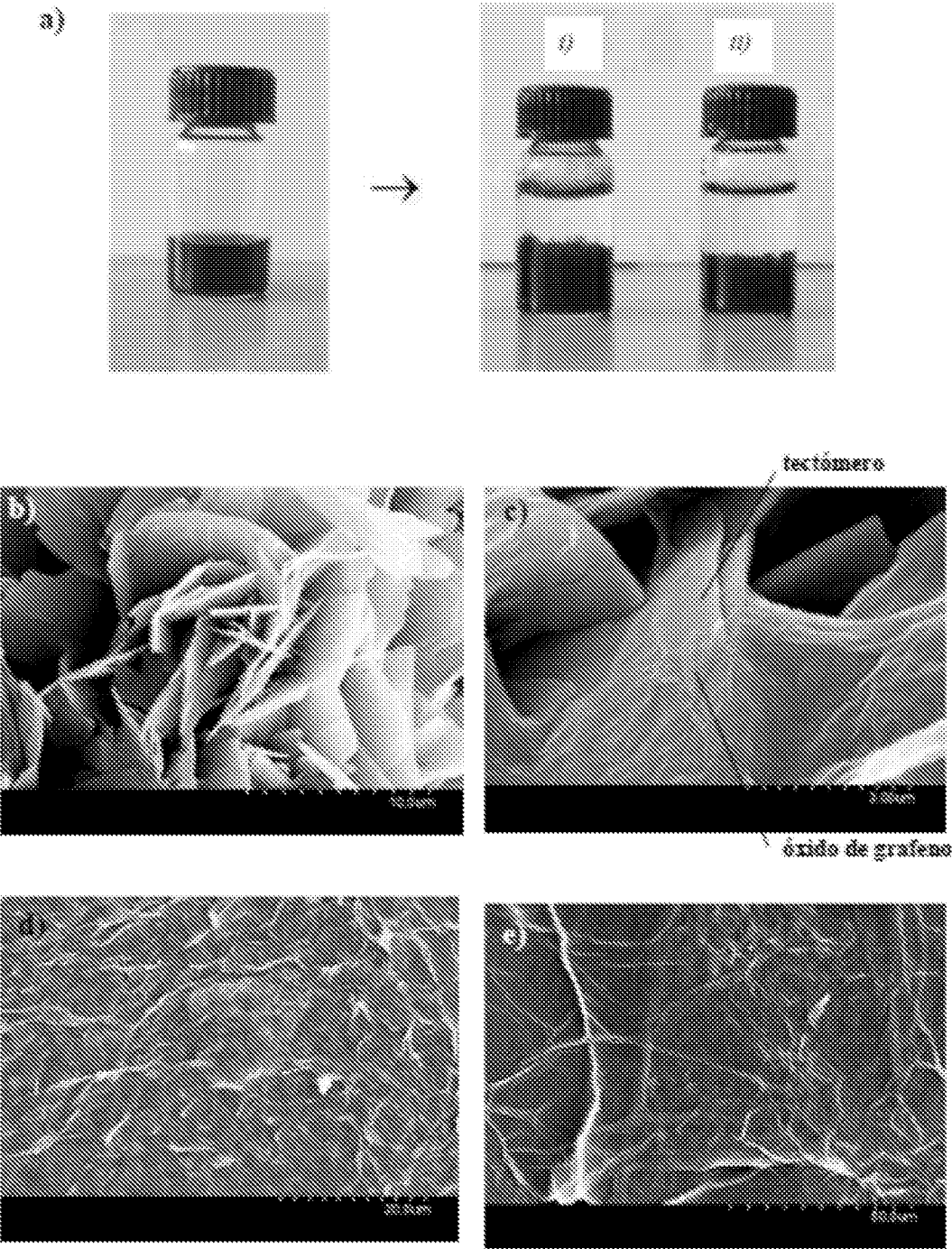


FIG. 8

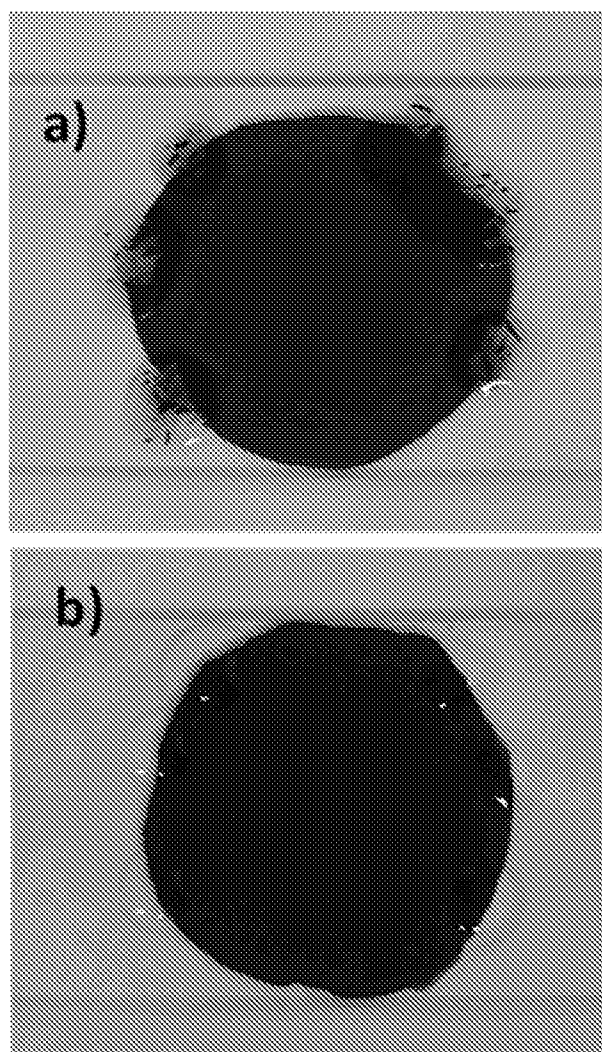


FIG. 9

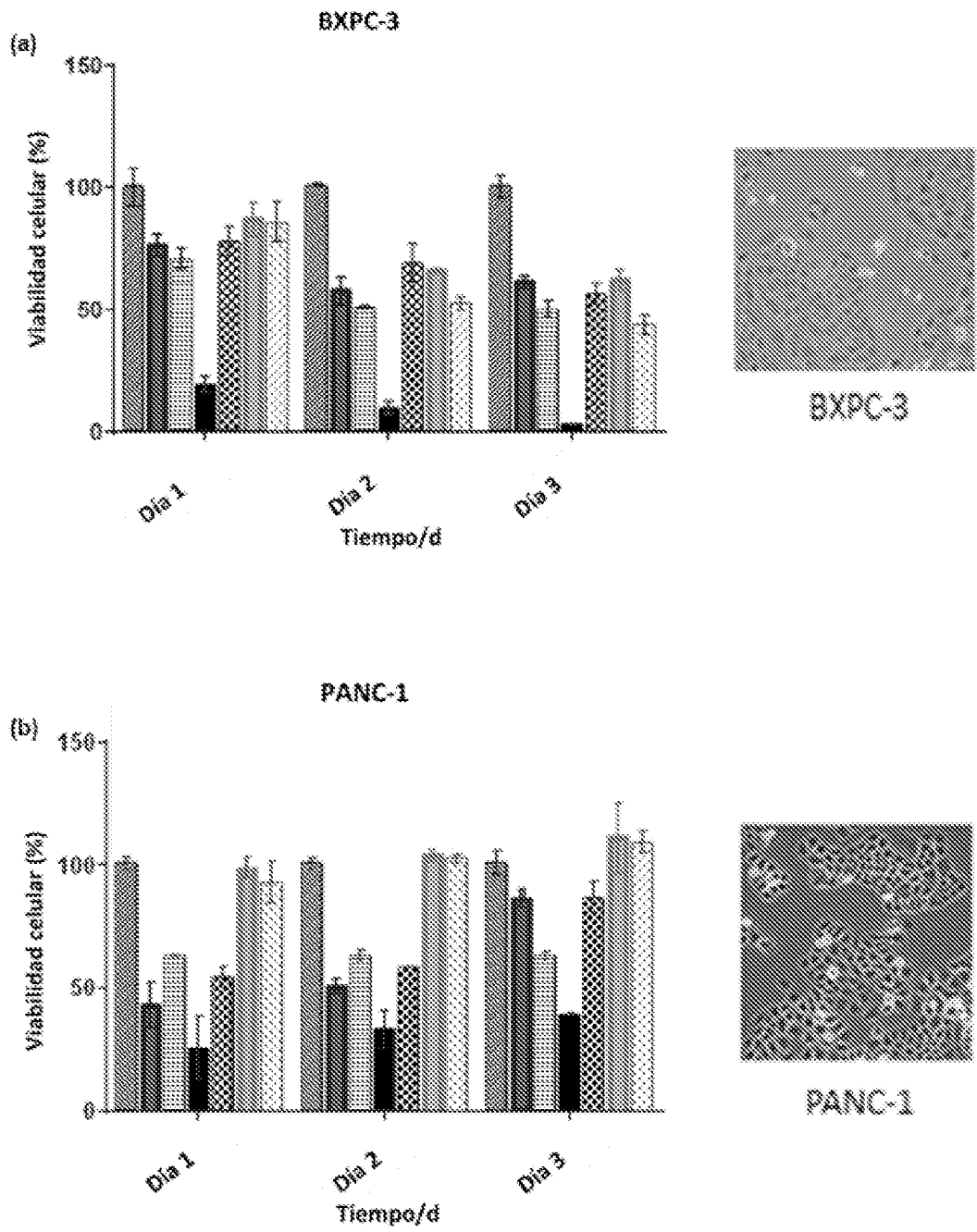


FIG. 10

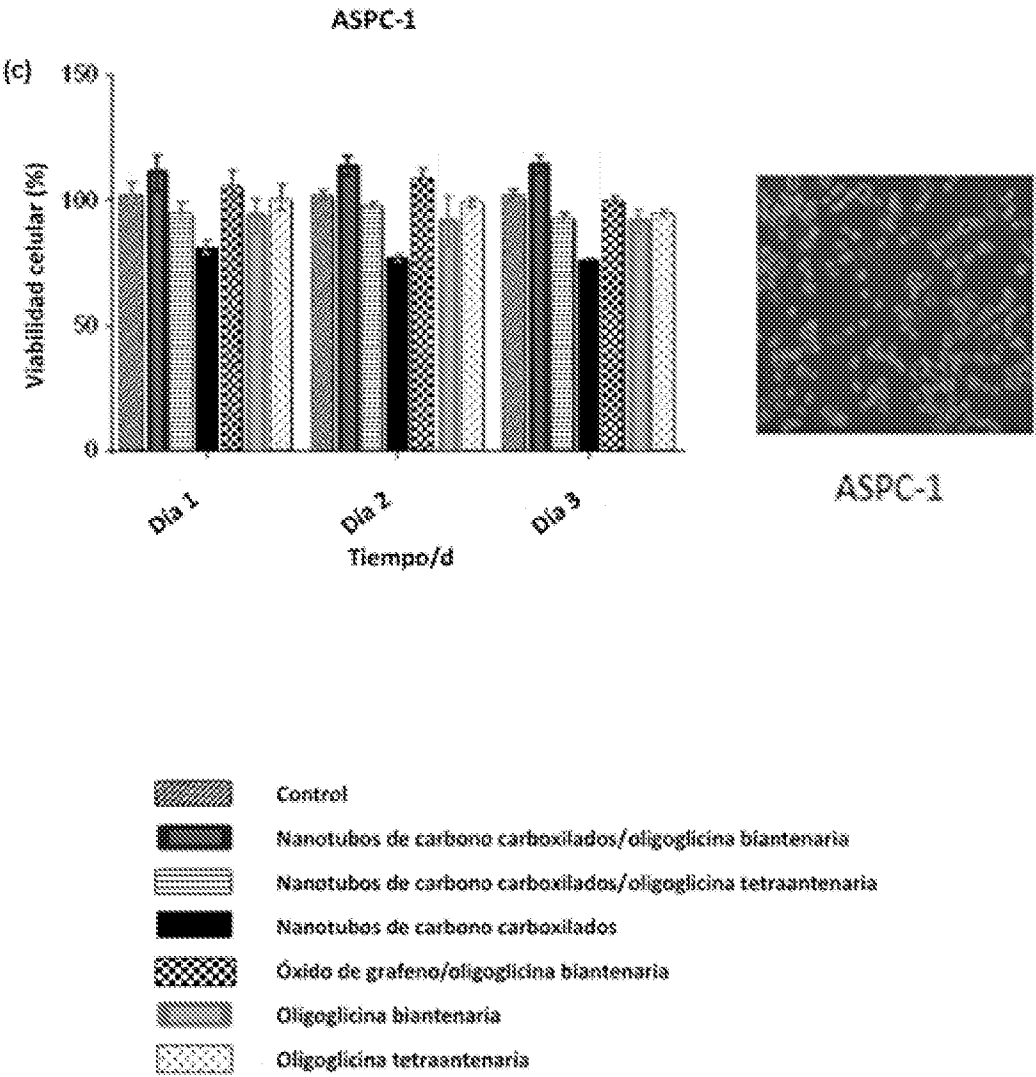


FIG. 10 (cont.)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, B82Y

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GARRIGA ROSA <i>et al.</i> Two-Dimensional, pH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. ACS applied materials & interfaces United States 27 Jan 2016 27/01/2016 VOL: 8 No: 3 Pgs: 1913 - 1921 ISSN 1944-8252 (Electronic) doi:10.1021/acsami.5b10077 pubmed:26730704. Abstract.	1-12
A	TSYGANKOVA SVETLANA V <i>et al.</i> Biantennary oligoglycines and glyco-oligoglycines self-associating in aqueous medium..Beilstein journal of organic chemistry Germany 2014 00/00/2014 VOL: 10 Pags: 1372 - 1382 ISSN 1860-5397 (Electronic) Doi: doi:10.3762/bjoc.10.140 pubmed:24991291. Abstract, pg. 1379, col. 1, paragraph 3, col. 2 paragraphs 2 and 4.	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29/08/2016

Date of mailing of the international search report
(01/09/2016)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Serriñá Ramírez

Telephone No. 91 3493072

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070410

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5876748 A (SHIMIZU TOSHIMI ET AL.) 02/03/1999, pág. 1, col. 1, líneas 22-30; pág. 2 col. 4, líneas 10-12.	1-12
A	BOVIN N V <i>et al.</i> Multimeric glycotherapeutics: New paradigm. Glycoconjugate Journal 2004/08/00 nl VOL: 21 No: 8-9 Pgs: 471 - 478 ISSN 0282-0080 (print) ISSN 1573-4986 (electronic) Doi:10.1007/s10719-004-5537-3. Abstract, pg. 300, col. 2, paragraph 2.	1-12
A	GYUROVA ANNA Y <i>et al.</i> Interaction of four-antennary oligoglycines and lipopolysaccharides in aqueous media. COLLOIDS AND SURFACES. A, PHYSICACHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 12/02/2014 VOL: 460 Pgs: 130 - 136 ISSN 0927-7757 Doi: 10.1016/j.colsurfa.2014/01/79 Neimark Alexander V; Thommes Matthias. Abstract, pg. 136, col. 1, paragraphs 5-6.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070410

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US5876748 A	02.03.1999	US5910565 A	08.06.1999
		US6030640 A	29.02.2000
		JPH1072721 A	17.03.1998
		JP2796613B B2	10.09.1998
		DE19737245 A1	05.03.1998
		DE19737245 B4	05.08.2004
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070410

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/18 (2006.01)

A61K9/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070410

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, B82Y

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	GARRIGA ROSA <i>et al.</i> Two-Dimensional, pH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. ACS applied materials & interfaces United States 27 Jan 2016 27/01/2016 VOL: 8 No: 3 Págs: 1913 - 1921 ISSN 1944-8252 (Electrónico) doi:10.1021/acsami.5b10077 pubmed:26730704. Resumen.	1-12
A	TSYGANKOVA SVETLANA V <i>et al.</i> Biantennary oligoglycines and glyco-oligoglycines self-associating in aqueous medium. Beilstein journal of organic chemistry Germany 2014, 00/00/2014 VOL: 10 Págs: 1372 - 1382 ISSN 1860-5397 (Electrónico) doi: 10.3762/bjoc.10.140 pubmed:24991291. Resumen, pág. 1379, col. 1, párrafo 3, col. 2 párrafos 2 y 4.	1-12

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
29/08/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
01 de setiembre de 2016 (01/09/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Serriñá Ramírez
Nº de teléfono 91 3493072

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/070410

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	US 5876748 A (SHIMIZU TOSHIMI ET AL.) 02/03/1999, pág. 1, col. 1, líneas 22-30; pág. 2 col. 4, líneas 10-12.	1-12
A	BOVIN N V et al. Multimeric glycotherapeutics: New paradigm. Glycoconjugate Journal nl 00/08/2004 VOL: 21 No: 8-9 Págs: 471 - 478 ISSN 0282-0080 (impreso) ISSN 1573-4986 (electrónico) Doi:10.1007/s10719-004-5537-3. Resumen, pág. 300, col. 2, párrafo 2.	1-12
A	GYUROVA ANNA Y <i>et al.</i> Interaction of four-antennary oligoglycines and lipopolysaccharides in aqueous media. COLLOIDS AND SURFACES. A, PHYSICACHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, 20140212 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 12/02/2014 VOL: 460 Págs: 130 - 136 ISSN 0927-7757 Doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.01.079 Neimark Alexander V; Thommes Matthias. Resumen, pág. 136, col. 1, párrafos 5-6.	1-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070410

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US5876748 A	02.03.1999	US5910565 A	08.06.1999
		US6030640 A	29.02.2000
		JPH1072721 A	17.03.1998
		JP2796613B B2	10.09.1998
		DE19737245 A1	05.03.1998
		DE19737245 B4	05.08.2004
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K47/18 (2006.01)

A61K9/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)