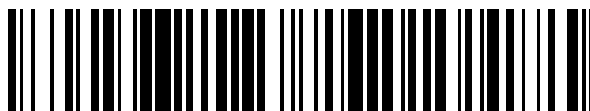


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 059**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04818605 .0**
96 Fecha de presentación: **27.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1687024**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **CONJUGADOS DE ANTIGENO-NANOPARTÍCULA DE CARBOHIDRATOS Y USOS DE LOS MISMO**
S COMO AGENTES ANTIMETASTÁSICOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.

30 Prioridad:
05.11.2003 WO PCT/US03/34897
22.03.2004 US 554994 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, 6011 EXECUTIVE BOULEVARD, SUITE 325 ROCKVILLE, MD 20852-3804, US y THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK

72 Inventor/es:
BARCHI, Jr., Joseph, J.; RITTENHOUSE-OLSON, Kate y SVAROVSKY, Sergei

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 375 059 T3

DESCRIPCIÓN

Conjugados de antígeno-nanopartícula de carbohidratos y usos de los mismos como agentes antimetastásicos en el tratamiento de cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la bionanotecnología. Más específicamente, la presente invención se refiere a conjugados de nanopartículas de carbohidratos. La presente invención también se refiere a procedimientos de síntesis de conjugados de nanopartículas de carbohidratos. La presente invención también se refiere a procedimientos de reducción de metástasis de células de carcinoma usando conjugados de nanopartículas de carbohidratos.

Antecedentes de la invención

10 Casi todos los organismos vivos tienen carbohidratos enlazados covalentemente a proteínas o lípidos sobre las superficies de sus células. Se ha demostrado que muchos de estos carbohidratos median en muchos fenómenos fisiológicos importantes, tales como la comunicación célula-célula/célula-matriz y la transducción de señal. Como resultado, se cree que los glicanos desempeñan funciones importantes en la patología de muchas enfermedades, por ejemplo, inflamación, restenosis, infecciones bacterianas/víricas y cáncer. Un rasgo característico establecido de tumorigénesis es la biosíntesis de cadenas de glicanos aberrantes debida a cambios en la expresión de enzimas de glico-procesamiento. Se cree que estas aberraciones se vuelven más marcadas cuando el tumor adquiere un fenotipo más agresivo. Muchos de estos glicanos son antígenos asociados a tumor conocidos que se han usado como haptenos en el desarrollo de vacunas tumorales.

20 Dos de los restos de carbohidratos de superficie celular asociados a cáncer más distribuidos son el antígeno disacárido de Thomsen-Friedenreich ("T" o "TF" o "T_F") asociado a tumor (Gal-β-1→3-GalNAc-α1-O-Ser/Thr) y su correspondiente antígeno monosacárido "TN" o "T_n" o "Tn" o "T nouvelle" (GalNAc-α1-O-Ser/Thr). Los antígenos TF y Tn son antígenos carbohidratos clásicos que están protegidos en tejidos sanos y con enfermedades benignas, pero están al descubierto aproximadamente en un 90 % de los carcinomas (por ejemplo, de mama, colon, próstata, vejiga, 25 ovárico y gástrico). Los epítomos Tn y T son moléculas de adhesión a células y tejidos, operativas en la invasión por y metástasis de carcinoma que incluye fases adherentes y proliferativas. Salmer, G. F., J. Mol. Med., 1997 Ag.; 75(8):594-602. Por ejemplo, durante la metástasis, se cree que las células de cáncer liberadas desde un tumor primario al sistema circulatorio segregan glucoproteínas que portan el antígeno TF. Se cree que estas glucoproteínas inducen células endoteliales para expresar la proteína de superficie celular galectina-3, que da lugar a la unión inicial de las células cancerígenas liberadas a las células endoteliales. Se cree que las interacciones proteína-proteína 30 posteriores entre células cancerígenas y células endoteliales están mediadas por integrina, que da lugar a la colonización de las células cancerígenas metastatizadas. En consecuencia, la disrupción de las interacciones de células tumorales-endoteliales mediadas por antígeno usando compuestos sintéticos que imitan o bien enmascaran la estructura de carbohidrato ha sido muy buscada. Glinksy, V. V., et al., Cancer Res., 2001, 61, 4851-4857. A este respecto, hay una necesidad continua de desarrollar compuestos sintéticos que inhiban la adhesión de células 35 tumorales para su uso en productos terapéuticos para cáncer antiadhesivos.

La publicación de patente de los EE.UU. N.º 2004/0052729A1 da a conocer materiales y procedimientos para estudiar y modular la interacción de restos que contienen carbohidratos con otras especies, por ejemplo, grupos de átomos metálicos o semiconductores, que se pueden emplear como un sustrato para inmovilizar varios ligandos que 40 comprenden grupos de carbohidratos. Aunque esta publicación de solicitud de patente describe varias nanopartículas de oro recubiertas con carbohidratos, no se cree que los carbohidratos dados a conocer (por ejemplo, lactosa) sean antígenos de carbohidratos asociados a tumor específicos que se expresan (es decir, se presentan) sobre las superficies del tumor. Por tanto, hay una necesidad continua de desarrollar compuestos sintéticos que tengan antígenos de carbohidratos asociados a tumor específicos que se expresan sobre la superficie de células tumorales.

Sumario de la invención

45 Para superar los problemas asociados con proporcionar compuestos sintéticos que inhiban la adhesión de células tumorales para su uso en productos terapéuticos para cáncer antiadhesivos, un aspecto de la presente invención proporciona, entre otros, procedimientos de preparación de conjugados antígeno-nanopartícula, que comprenden proporcionar una nanopartícula y conjugar varios antígenos de carbohidrato a la nanopartícula, en los que los antígenos de carbohidrato incluyen antígeno TF.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un conjugado antígeno-nanopartícula que comprende varios antígenos de carbohidrato conjugados con una nanopartícula, en el que los antígenos incluyen antígeno TF.

Otros aspectos de la presente invención incluyen el uso de conjugados antígeno-nanopartícula de la invención para la fabricación de un medicamento para inhibir la metástasis de células de carcinoma en un mamífero. Por ejemplo, los 55 procedimientos de sintetización de nanopartículas conjugadas incluyen enlazar varios antígenos TF a las superficies de nanopartículas de oro. Estas nanopartículas se han inyectado a mamíferos que portan tumores de mama y este

tratamiento ha demostrado que evita la metástasis en los pulmones.

Breve descripción de los dibujos

El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada, se entiende aún más cuando se lee conjuntamente con los dibujos anexos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones ejemplares de la invención; sin embargo, la invención no está limitada a los procedimientos, composiciones, y dispositivos específicos dados a conocer. En los dibujos:

Fig 1. (a) Estructura de antígeno de Thomsen Friedenreich, y (b) Estructura de antígeno Tn. Las líneas de las funciones amino y ácido designan la extensión de una cadena de proteína.

Fig 2. Implicación supuesta del antígeno T en metástasis de tumor de Glinskii, Cancer Res., 2001, 61, p. 4851.

Fig 3. Micrografía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro recubiertas de ag-T

Fig 4. Procedimiento de una etapa para la preparación nanopartículas de oro en solución acuosa.

Fig. 5 Síntesis de bloque de construcción de Tn para la preparación de nanopartículas de Au. Se muestran las condiciones. Adaptado de Carbohydr. Res. 2003, 338, 1925-1935.

Fig 6. Síntesis de bloque de construcción de TF para la preparación de nanopartículas de Au. Se muestran las condiciones. Adaptado de Carbohydr. Res. 2003, 338, 1925-1935.

Fig 7. Síntesis de nanopartículas de Au recubiertas con antígeno TF y Tn.

Fig 8. Caracterización de nanopartículas de oro recubiertas con TF. Se muestran los datos de TEM, RMN, ultrafiltración y análisis elemental.

Fig 9. Síntesis de un bloque de construcción de antígeno TF enlazado a PEG específico para la síntesis de nanopartículas de carbohidratos.

Fig 10. Nanopartículas recubiertas de azúcar adicionales preparadas en el estudio.

Fig 11. Esquema del ensayo de cromatografía de afinidad de lectina que prueba la estereoespecificidad de la interacción de oro con ag-T con la aglutinina del cacahuete (PNA).

Fig 12. Comparación de unión de partículas de oro con ag-T a aglutinina del cacahuete conjugada con rodamina o lectina de *Pisum sativum*. Las partículas de ag-T forman agregados transparentes con la PNA-rodamina pero no con PSA rodamina.

Fig. 13. Pulmones del grupo de PBS. Número de lesiones metastásicas contadas manifiestamente visibles, +++>20, ++ (10-20), + (1-9), - (0).

Fig. 14. Pulmones del grupo de Ag T. Número de lesiones metastásicas contadas manifiestamente visibles, +++>20, ++ (10-20), + (1-9), - (0).

Fig 15. Tabla que resume los niveles de metástasis en pulmones.

Fig 16. Tasas de metástasis presentadas como gráficas de barras, grupos tratados con PBS, JAA-F11 y tratados con oro T-Ag, +++ >20, ++ (10-20), + (1-9), - (0).

Fig. 17. Curva de Kaplan-Meier de experimento *in vivo*. (Grupo 1: control con PBS; Grupo 2: tratamiento de oro con Ag T).

Fig.18. Resultados de distribución de tamaño de partícula para la muestra TF-HEXPEG-AuNP.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

La presente invención se puede entender más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención tomada conjuntamente con las figuras y ejemplos adjuntos, que forman una parte de esta divulgación. Se ha de entender que esta invención no está limitada a los dispositivos, procedimientos, condiciones o parámetros específicos descritos y/o mostrados en el presente documento, y que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares sólo a modo de ejemplo y no se pretende que limite la invención reivindicada. Además, tal como se usa en la memoria descriptiva que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen el plural y la referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan en forma de aproximaciones, mediante el uso del anterior "aproximadamente", se entenderá que

el valor particular forma otra realización. Todos los intervalos están incluidos y se pueden combinar.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" ("Ag") se refiere a una sustancia que provoca una respuesta de anticuerpo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" se refiere a parte de una molécula de antígeno que se une a un sitio de combinación de anticuerpo o a un receptor de linfocitos T ("TCR").

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a un término alternativo para un determinante antigénico. Éstos son grupos químicos particulares en una molécula que son antigénicos, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica.

10 Como se usa en el presente documento, el término "hapteno" se refiere a un compuesto, normalmente de peso molecular bajo, que no es inmunógeno por sí mismo pero, cuando se une a una proteína o célula vehículo, se vuelve inmunógeno e induce anticuerpos, que se pueden unir al hapteno solo o bien en presencia de un vehículo.

Como se usa en el presente documento, el término "expresable" se refiere a la capacidad de un antígeno o molécula para ser expresada por una célula.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "antígenos de carbohidrato específicamente expresables sobre una superficie de célula de tumor" se refiere a la capacidad de las células de tumor para expresar antígenos de carbohidrato particulares en mayor abundancia en comparación con células normales. En consecuencia, la expresión "antígenos de carbohidrato específicamente expresables sobre una superficie de célula de tumor" es descriptiva del género de los antígenos de carbohidrato que se expresan en superficies de célula de tumor en mayor abundancia en comparación con células normales. En consecuencia, no se pretende que la expresión "antígenos de carbohidrato específicamente expresables sobre una superficie de célula de tumor" limite las invenciones divulgadas respecto al origen de los antígenos de carbohidrato. De hecho, como se describe además en el presente documento, los antígenos de carbohidrato se puede proporcionar por varios procedimientos, incluyendo tanto fuentes procedentes de forma natural así como vías químicas sintéticas.

25 Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula de sustancia que tiene una dimensión, tal como su diámetro si la partícula es esférica, más pequeño que aproximadamente 100 nanómetros ("nm").

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a una entidad más grande compuesta de dos o más entidades más pequeñas que están enlazadas juntas, conectadas juntas, asociadas juntas, o cualquier combinación de las mismas.

30 Como se usa en el presente documento, el término "conjugación" se refiere al proceso de enlazar, conectar, asociar, o cualquier combinación de los mismos, dos o más entidades más pequeñas para formar una entidad más grande.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado antígeno-nanopartícula" se refiere a un conjugado de una nanopartícula y uno o más antígenos.

35 Como se usa en el presente documento, el término "pluralidad" se refiere a una colección de dos o más entidades, las entidades caracterizadas por ser iguales o diferentes.

40 En diversas realizaciones de la presente invención, el conjugado antígeno-nanopartícula incluye varios antígenos de carbohidrato conjugados con una o más nanopartículas, en el que los antígenos incluyen antígeno TF. Se sabe de una gran variedad de antígenos de carbohidrato que se pueden expresar específicamente sobre una superficie de célula de tumor que se puede conjugar con una gran variedad de nanopartículas. Los antígenos de carbohidrato adecuados se presentan normalmente al sistema inmunitario en carcinomas humanos durante el crecimiento y la progresión del tumor. Los antígenos de carbohidrato adecuados también se pueden seleccionar de carbohidratos que son indicadores de pronóstico para cáncer, marcadores de células de carcinoma metastatizadas, moléculas de adhesión implicadas en metástasis, así como cualquier combinación de los mismos. Los antígenos de carbohidrato adecuados que se pueden expresar específicamente sobre una superficie de célula de tumor se proporcionan convenientemente en una revisión por Hakomori, "Aberrant Glycosylation in Tumors and Tumor-Associated Carbohydrate Antigens", Adv. Cancer Res. 1989, 52, 257-331. Esta revisión proporciona dos esquemas de clasificación de antígenos de carbohidrato asociados a tumor, muchos de los cuales son adecuados en diversas realizaciones de la presente invención. Estos esquemas de clasificación se reproducen de Hakomori, p. 262-263 en el párrafo y tabla siguientes:

50 "Los antígenos de carbohidrato asociados a tumor se pueden dividir en cinco clases de acuerdo con su asociación con moléculas vehículo: (1) estructuras de epítipos claramente identificadas y expresadas tanto en glicoesfingolípidos y glicoproteínas; (2) las expresadas sólo en glicoesfingolípidos; (3) las expresadas sólo en glicoproteínas; (4) epítipos de polipéptidos cuya antigenicidad sólo se mantiene cuando uno solo o múltiples residuos de treonina o serina está glicosilado; (5) antígenos cuyo epítipo está mal definido o no definido. La primera clase de antígenos se caracteriza por cadena de tipo 1 o de tipo 2 de serie lacto (clase 1; tabla I,A). La segunda clase de antígenos es principalmente

- 5 glicosfingolípidos de series globo o ganglio (clase 2; tabla I,A). Las clases tercera, cuarta y quinta están asociadas con glicoproteínas, en particular glicoproteínas de tipo mucina (clases 3-5; tabla I,A). Por otro lado, los antígenos de carbohidrato asociados con tumor también se pueden clasificar de acuerdo con su especificidad de expresión, es decir, (1) antígenos altamente expresados en células de tumor, no expresados en las células de progenitor, pero expresados en otros tipos de células y tejidos normales (clase 1; tabla I,B); (2) los expresados altamente en células de tumor pero expresados débilmente en sus homólogos normales (clase 2; tabla I,B); y (3) los expresados exclusivamente en células de tumor, y no en células normales (clase 3; tabla I,B). La mayoría de los antígenos asociados a tumor pertenecen a la categoría (1) o (2), y sólo raramente a la (3)."

TABLA 1	
Clasificación antígenos de carbohidrato asociados a tumor	
A. Clasificación de acuerdo con la diferencia en el vehículo de epítipo	
Clase 1: "A1"	Asociados tanto con glicolípido como con glicoproteína (mayoritariamente cadena de tipo 1 o tipo 2 de serie lacto)
Clase 2: "A2"	Asociados exclusivamente con glicolípido (mayoritariamente estructura de serie globo o de serie ganglio)
Clase 3: "A3"	Asociados exclusivamente con glicoproteína (mayoritariamente relacionado con cadenas enlazadas a O de tipo mucina, tales como T, Tn, y Tn sialilo)
Clase 4: "A4"	Asociados exclusivamente con glicoproteína cuya estructura está mal definida
Clase 5: "A5"	Epítipos de polipéptidos cuya antigenicidad está influenciada por O-glicosilación
B. Clasificación de acuerdo con la especificidad de expresión de antígeno	
Clase 1: "B1"	Estructuras novedosas altamente expresadas en células de tumor, ausentes en sus células progenitoras, pero expresadas en un número limitado en otras células normales. Ejemplos: Le ^x di o trimérico, Le ^x dimérico de sialilo en diversos adenocarcinomas gastrointestinales y pulmonares, y gangliósidos GD ₂ y GD ₃ en melanoma y neuroblastoma
Clase 2: "B2"	Estructuras comunes altamente expresadas en células de tumor, pero presentes en menor cantidad en diversos tipos de células y tejidos normales. Ejemplos: Gangliósidos GM ₃ y GM ₂ en melanoma, y Gb ₃ en linfoma de Burkitt
Clase 3: "B3"	Exclusivamente expresados en células de tumor, pero ausentes (o presentes en niveles inmunológicamente indetectables) en células normales. Ejemplos: Antígenos de grupo sanguíneo incompatible, tales como antígeno A puro y antígeno similar a A expresado en tumores O. La mayoría de los antígenos similares a A se identifican ahora como antígeno Tn (véase la clase A3 anterior; véase también la tabla V)

- 10 Los antígenos de carbohidrato adicionales adecuados usados en la presente invención se seleccionan normalmente de una o más de las clases de antígenos A2, A3, A4, A5, B2, y B3 de la tabla 1.
- 15 Los antígenos de carbohidrato adicionales preferidos incluyen la parte polisacárida de antígeno T_n, antígeno Gb1, antígeno GM1, antígeno GM3, y otros carbohidratos glicosfingolípidos, tetrasacárido de Lewis Y, así como sus modificaciones, y cualquier combinación de estos antígenos. Un antígeno de carbohidrato más preferido es antígeno T_n. Aunque los conjugados antígeno-nanopartícula se preparan preferentemente usando exclusivamente uno de estos antígenos de carbohidrato, los antígeno-nanopartículas de la presente invención pueden incluir de forma adecuada al menos un antígeno de carbohidrato diferente además del antígeno TF. En consecuencia, se pueden conjugar varios antígenos de carbohidrato diferentes a cada nanopartícula en diversas realizaciones de la presente invención, y se prefieren normalmente que la pluralidad de antígenos de carbohidrato sea idéntica entre sí.
- 20 Los antígenos de carbohidrato adecuados usados en la presente invención se caracterizan normalmente por estar compuestos de al menos un disacárido. En determinadas realizaciones de la presente invención, el al menos un disacárido incluye normalmente al menos un grupo de amino azúcar. Los grupos de amino azúcar adecuados incluyen normalmente un azúcar de anillo de seis miembros que tiene un grupo de amina, cuyos ejemplos incluyen glucosamina y galactosamina.
- 25 Los antígenos de carbohidrato adecuados se seleccionan preferentemente por su capacidad para inducir o inhibir la expresión de una proteína o carbohidrato particular en células sanas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los

antígenos de carbohidrato que pueden inducir la expresión en la superficie de galectina-3 en células endoteliales se usan de forma adecuada, especialmente para proporcionar conjugados antígeno-nanopartícula que ayudan a inhibir la adhesión de células cancerígenas metastatizantes a células sanas.

En diversas realizaciones de la presente invención, es deseable para al menos uno de la pluralidad de antígenos de carbohidrato asociados a tumor que esté conjugado con un grupo espaciador, y que el grupo espaciador esté conjugado con la nanopartícula. Los grupos espaciadores adecuados incluyen varios grupos de repetición, tales como etilenglicol, para formar una cadena oligomérica o polimérica. Cada extremo de la cadena oligomérica o polimérica se conjuga normalmente, de forma respectiva, a la nanopartícula y a uno de los antígenos de carbohidrato. En consecuencia, los grupos espaciadores adecuados incluyen cadenas de polietilenglicol, ("PEG"), es decir, $-\text{[OCH}_2\text{CH}_2\text{]}_n$, en las que n es de 2 a aproximadamente 100, así como una cadena de carbono, una cadena de carbono que incluye azufre, nitrógeno u oxígeno en el esqueleto, incluyendo los polímeros poli(acrilamida), una cadena de péptidos compuesta toda de unidades de glicina o alanina, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones que incluyen grupos espaciadores, se usa normalmente PEG con n en el intervalo de aproximadamente 4 a 16.

En determinadas realizaciones de la presente invención, se pueden proporcionar las nanopartículas con grupos de enlace. En consecuencia, los conjugados antígeno-nanopartícula pueden incluir además uno o más antígenos de carbohidrato que se conjugan con uno o más grupos de enlace, en los que los grupos de enlace se conjugan con la nanopartícula. Los grupos de enlace adecuados incluyen uno o más átomos de azufre, grupos carboxilato, amida, carbamato, carbonato, tiocarbamato, tiocarbonato, tioéter, succinimida y n -hidroxisuccinimida, o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, los conjugados antígeno-nanopartícula incluyen antígenos de carbohidrato que están cada uno enlazados covalentemente a uno o más átomos de azufre. Preferentemente, los conjugados antígeno-nanopartícula de la presente invención incluyen antígenos de carbohidrato que están cada uno enlazados, individualmente, a uno o más átomos de azufre. Los antígenos de carbohidrato se pueden enlazar a uno o más átomos de azufre, como se proporciona en el presente documento. Preferentemente, al menos dos átomos de azufre se enlazan covalentemente entre sí. Determinados conjugados antígeno-nanopartícula de la presente invención incluyen al menos uno de los átomos de azufre unido a la nanopartícula. Los enlaces adecuados entre los átomos de azufre y la nanopartícula incluyen enlaces covalentes, y preferentemente incluyen van der Waals (es decir, enlaces dispersivos), o cualquier combinación de los mismos.

Los conjugados antígeno-nanopartícula de la presente invención también pueden incluir uno o más grupos químicos diferentes, tales como ácidos nucleicos y aminoácidos. En estas realizaciones, el uno o más grupos químicos diferentes se enlazan normalmente a la nanopartícula, a través de conjugación directa con la superficie de la nanopartícula, o bien indirectamente a través del uso de un espaciador, un enlazador o cualquier combinación de los mismos. Las realizaciones normales pueden incluir antígenos de carbohidrato que son glicoproteínas, es decir, antígenos de carbohidrato conjugados con uno o más aminoácidos.

Los conjugados antígeno-nanopartícula de la presente invención también pueden incluir una combinación de grupos de enlace y grupos espaciadores. Por tanto, determinadas realizaciones de la presente invención incluyen uno o más antígenos de carbohidrato que se conjugan con uno o más grupos espaciadores, los grupos espaciadores se conjugan con uno o más grupos de enlace, y el uno o más grupos de enlace se conjugan con la nanopartícula. Aunque cualquiera de los grupos de enlace mencionados anteriormente sean adecuados en estas realizaciones, se prefiere que los grupos de enlace incluyan uno o más átomos de azufre.

Las nanopartículas adecuadas usadas en la presente invención están compuestas de varios átomos que pueden formar una partícula que tiene una dimensión de aproximadamente 100 nm o menor. Se conoce una amplia variedad de nanopartículas que se pueden usar en la presente invención, aunque las nanopartículas adecuadas de la presente invención pueden estar compuestas de cualquier combinación de átomos en la tabla periódica, los átomos se seleccionan normalmente de uno o más de los grupos 1 a 17, más normalmente de uno o más de los grupos 3 a 16, aún más normalmente de los grupos 4 a 15, y aún más normalmente de los grupos 5 a 14. Las nanopartículas preferidas están compuestas de elementos metálicos o semiconductores, tales como los que se encuentran en los grupos 8 a 14, y de éstos, siendo más preferidos los átomos metálicos de los grupos 10 a 12, siendo los átomos más preferidos cobre, oro, plata, platino, rodio y paladio que, así como cualquier combinación de los mismos.

Se pueden preparar varias nanopartículas usando técnicas conocidas o se pueden adquirir de fuentes comerciales. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.879.715 describe procedimientos y sistemas para la producción de nanopartículas inorgánicas, la patente de los EE.UU. N.º 6.361.944 describe la preparación de nanopartículas de oro que tienen oligonucleótidos unidas a ellas, la patente de los EE.UU. N.º 6.530.944 describe varias nanopartículas ópticamente activas, por ejemplo nanopartículas de oro y nanocáscaras, para su uso en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, la patente de los EE.UU. N.º 6.602.932 describe compuestos de nanopartículas y nanocápsulas para encapsulación de huésped y procedimientos para sintetizar los mismos, y la patente de los EE.UU. N.º 6.780.301 procedimientos de fabricación de partículas en varillas coloidales como nano códigos de barras. Las diversas composiciones coloidales también incluyen nanopartículas que son adecuadas para su uso en la presente invención.

La patente de los EE.UU. N.º 4.853.335 describe que se pueden preparar partículas de oro coloidales de varias formas a través de la reducción de ácido cloro áurico que produce varios tamaños de partícula que varían de desde 5 nm hasta 100 nm. Esta patente también describe que las partículas coloidales pueden tener un engarce intermedio (es decir, un enlazador) absorbido en su superficie.

5 Las nanopartículas adecuadas usadas en la presente invención tienen cada una normalmente de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 10.000 átomos, más normalmente de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 átomos; y aún más normalmente de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 800 átomos. Así mismo, las nanopartículas adecuadas normalmente tienen una dimensión en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 200 nm, aún más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 100 nm, y aún más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 10 nm. Las nanopartículas que están compuestas de una colección de 50 a 10.000 átomos unidos de varias maneras pueden dar lugar a una variedad de formas. En consecuencia, las nanopartículas adecuadas de la presente invención pueden incluir cualquiera de uno o más de los siguientes tipos de formas: icosaédrica, similar a varilla, cúbica, rómbica, hexagonal, fullereno, y normalmente esferoide, así como versiones llenas, huecas, a capas y similares a cáscara de estas formas, así como cualquier combinación de las mismas.

En diversas realizaciones de la presente invención, el número de antígenos de carbohidrato conjugados con cada una de las nanopartículas normalmente está en el intervalo de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 1000, más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 10 hasta 500, y aún más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 30 hasta 200. Aunque se pueden producir varios conjugados antígeno-nanopartículas en los que cada uno tiene el mismo número de antígenos de carbohidrato conjugados, normalmente los conjugados antígeno-nanopartícula tienen una distribución del número de antígenos de carbohidrato conjugados. En consecuencia, se caracterizan adecuadamente varios conjugados antígeno-nanopartícula por tener una distribución de antígenos conjugados que se pueden expresar además en términos estadísticos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, el número medio de antígenos conjugados. Así mismo, la pluralidad de nanopartículas también se caracterizará adecuadamente en términos de una o más distribuciones, por ejemplo, tamaño de partícula, número de átomos, composición atómica, o cualquier combinación de las mismas. En consecuencia, los conjugados antígeno-nanopartícula adecuados de la presente invención normalmente tendrán un peso molecular en el intervalo de de desde aproximadamente 1.000 Dalton hasta aproximadamente 1 millón de Dalton, más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 10.000 Dalton hasta aproximadamente 500.000 Dalton, y aún más normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 25.000 Dalton hasta aproximadamente 150.000 Dalton. En consecuencia, normalmente se caracterizarán varios conjugados antígeno-nanopartícula por tener una distribución de pesos moleculares, tales como un peso molecular promedio en peso o en términos de un peso molecular promedio en número.

En diversas realizaciones de la presente invención para preparar conjugados antígeno-nanopartícula, los procedimientos normalmente incluyen proporcionar al menos una nanopartícula y conjugar varios antígenos de carbohidrato con la nanopartícula, en los que los antígenos de carbohidrato se pueden expresar específicamente sobre una superficie de célula de tumor. Las nanopartículas adecuadas y los antígenos de carbohidrato adecuados se describen anteriormente. Durante la conjugación, se proporcionan varias nanopartículas en un sitio de reacción adecuado, y normalmente se conjugan varios antígenos de carbohidrato con al menos una porción de nanopartículas dentro del sitio de reacción. Los sitios de reacción adecuados incluyen un recipiente, una cámara o un conducto adecuado para llevar a cabo reacciones químicas. Aunque es normal que una porción de los antígenos de carbohidrato permanezcan sin conjugarse con las nanopartículas en el sitio de reacción, se prefiere que sustancialmente todos los antígenos de carbohidrato se conjuguen con cada una de las nanopartículas.

En otras realizaciones del procedimiento de preparación de conjugados antígeno-nanopartícula, antes de conjugar los antígenos de carbohidrato con las nanopartículas, se pueden conjugar los antígenos de carbohidrato con un grupo de enlace. Anteriormente se proporcionan ejemplos de grupos de enlace, con ejemplos específicos proporcionados a continuación.

En otras realizaciones del procedimiento de preparación de conjugados antígeno-nanopartícula, las nanopartículas se pueden enlazar con uno o más grupos de enlace. A este respecto, se pueden proporcionar grupos de enlace sobre la superficie de las nanopartículas haciendo reaccionar cualquiera de uno o más de los grupos de enlace anteriormente mencionados con varias nanopartículas en un sitio de reacción.

En determinadas realizaciones preferidas de la presente invención, el procedimiento de conjugar los antígenos de carbohidrato con la nanopartículas usa un procedimiento de autoensamblaje. Los procedimientos de autoensamblaje se describen en la pub. de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2004/0018633A1, que da a conocer nanogrupos de oro cubiertos de oligómero de óxido de etileno monodisperso acabado con tiol (es decir, nanopartículas). Preferentemente, los antígenos de carbohidrato acabados con uno o más átomos de azufre de grupos de enlace se autoensamblan sobre al menos una superficie de la nanopartícula.

En determinadas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, los grupos de enlace se conjugan con

la nanopartícula y al menos uno de los antígenos de carbohidrato se conjuga con al menos uno de los grupos de enlace de nanopartícula. Además, determinadas realizaciones de la presente invención también incluyen conjugar uno o más grupos espaciadores con los antígenos de carbohidrato y con la nanopartícula. En estos procedimientos se puede usar cualquiera de la variedad de grupos espaciadores proporcionados en el presente documento.

5 Preferentemente, como se proporciona con más detalle en los ejemplos a continuación, los grupos espaciadores incluyen PEG.

También se pueden incluir etapas de procedimiento adicionales en los procedimientos de la presente invención. En particular, es deseable en determinadas realizaciones, para purificar los conjugados antígeno-nanopartícula resultantes. Los procedimientos adecuados de purificación de nanopartículas incluyen filtración, centrifugación, electroforesis, cromatografía, cristalización, o cualquier combinación de las mismas.

10

En otros aspectos de la presente divulgación se proporcionan procedimientos para inhibir la metástasis de células de carcinoma en un mamífero. Estos procedimientos normalmente incluyen administrar a un mamífero o células del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los conjugados antígeno-nanopartícula descritos en el presente documento. En consecuencia, en un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan procedimientos para inhibir la metástasis de células de carcinoma en un mamífero, que incluyen administrar a un mamífero o células del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de conjugados antígeno-nanopartícula, comprendiendo los conjugados de nanopartículas varios antígenos de carbohidrato conjugados con varias nanopartículas, en los que los antígenos de carbohidrato se pueden expresar específicamente sobre una superficie de célula de tumor. Basándose en los estudios de ratones *in vivo* proporcionados en el presente documento, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los regímenes de dosificación adecuados para evitar la metástasis en otros mamíferos, tales como seres humanos. En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación implica administrar a un mamífero o células del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de conjugados antígeno-nanopartícula, comprendiendo los conjugados de nanopartículas varios antígenos de carbohidrato conjugados con varias nanopartículas, en los que los antígenos de carbohidrato se pueden expresar específicamente sobre una superficie de célula de tumor. Un ser humano que se le diagnostica cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, se puede tratar usando los conjugados antígeno-nanopartícula y los procedimientos de la presente invención. En determinado aspecto, el tratamiento de seres humanos usando los diversos procedimientos y conjugados antígeno-nanopartícula da lugar a la inhibición de la metástasis, especialmente en los pulmones. Durante el tratamiento de un mamífero, un determinado aspecto de la presente divulgación puede incluir además las etapas de retirar células de tumor primario del mamífero. Normalmente, las células de tumor se retiran del mamífero antes de administrar la cantidad terapéuticamente efectiva de los conjugados antígeno-nanopartícula. A este respecto, las células de tumor primario que se inhiben de adherirse a, y de colonizar sobre, tejidos secundarios del mamífero.

15
20
25
30

En diversos aspectos de la presente divulgación para tratar un mamífero, los conjugados antígeno-nanopartícula adecuados incluyen cualquiera de los conjugados antígeno-nanopartícula descritos en el presente documento. Por ejemplo, los conjugados antígeno-nanopartícula adecuados incluyen antígenos de carbohidrato que se presentan en el sistema inmunitario en carcinomas humanos durante el crecimiento y la progresión del tumor. Otros conjugados antígeno-nanopartícula que son particularmente útiles usan antígenos de carbohidrato que incluyen antígeno TF, antígeno T_n, antígeno Gb1, antígeno GM1, antígeno GM3, y otros carbohidratos glicosfingolípidos, tetrasacárido de Lewis Y, así como sus modificaciones, y cualquier combinación de estos antígenos. Los antígenos de carbohidrato más preferidos se seleccionan de antígeno TF y antígeno T_n, o cualquier combinación de los mismos.

35
40

Una nanopartícula se conjuga cuando la nanopartícula tiene grupos de antígenos de carbohidrato enlazados a la superficie de la nanopartícula que pueden actuar para cambiar la respuesta de un sistema biológico del que resulta del contacto con una nanopartícula no conjugada. El término "enlace" se refiere a una asociación atractiva de un átomo o molécula con otro átomo o molécula, por ejemplo, un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, o un enlace o interacción de otro tipo. Como ejemplo, los grupos de antígenos de carbohidrato se pueden unir a la superficie de la nanopartícula para permitir que la nanopartícula en su totalidad se adhiera al material biológico, y dejar la nanopartícula en su totalidad biológicamente inerte de modo que el sistema biológico no "vea" la nanopartícula y no responda a la nanopartícula. Un material biológico puede incluir una secreción, por ejemplo, un anticuerpo, de otro material biológico.

45

En el contexto de interacciones con entidades biológicas, tales como células, o constituyentes químicos de los mismos, por ejemplo, receptores, el término "unión" se usa coherentemente con el uso en la literatura biológica. Esto es, "unión" se puede referir a la fuerza atractiva neta entre dos moléculas o estructuras macromoleculares que resultan de varios tipos de enlaces diferentes que actúan simultáneamente incluyendo enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, e interacciones de van der Waals.

50

El grupo de antígenos de carbohidrato se puede enlazar a la nanopartícula, o se puede enlazar a un enlazador o grupo espaciador que se conjuga a la nanopartícula. Determinados sacáridos son grupos de antígenos de carbohidrato. En esta solicitud, el término "sacárido" se refiere a mono, di, tri y oligosacáridos. El sacárido puede ser un sacárido hallado en la naturaleza, o puede ser un sacárido que no se encuentre en la naturaleza. Un sacárido puede ser, por ejemplo, un antígeno hallado sobre la membrana de una célula de tumor o una bacteria. Por ejemplo, el disacárido de Thomsen-Friedenreich se halla sobre la superficie de muchas células de cáncer humanas pero no sobre la superficie

55
60

de células humanas normales. Un sacárido hallado sobre la superficie de células de cáncer, pero no sobre la superficie de células humanas normales se puede denominar antígeno de carbohidrato asociado a tumor.

El término "enlazado" se usa en el presente documento para referirse a enlazado directamente o bien enlazado indirectamente. En un primer ejemplo, un primer grupo químico se enlaza directamente a un segundo grupo químico si hay un enlace entre un átomo o una porción del primer grupo químico, y un enlace entre un átomo o una porción del segundo grupo químico. En un segundo ejemplo, un primer grupo químico se enlaza indirectamente a un segundo grupo químico si hay un enlace entre un átomo o una porción del primer grupo químico y un tercer grupo químico, y otro enlace entre el tercer grupo químico y un segundo grupo químico. En referencia a un primer grupo químico como "enlazado" a un segundo grupo químico quiere decir que el enlace podría ser directo, como en el primer ejemplo, o indirecto, como en el segundo ejemplo.

Un grupo químico, por ejemplo, un grupo de antígeno de carbohidrato, se puede enlazar a la nanopartícula directamente, o se puede enlazar a la nanopartícula indirectamente, por ejemplo, a través de un grupo de enlace. Un grupo de enlace puede desempeñar varias funciones diferentes. Por ejemplo, un grupo de enlace puede actuar como "espaciador" entre la nanopartícula y el grupo de antígenos de carbohidrato de modo que el grupo de antígenos de carbohidrato puede asumir una conformación requerida para estimular o suprimir la respuesta de un sistema biológico como se desee. Un grupo de enlace también puede actuar para separar la carga en o sobre la nanopartícula del grupo de antígenos de carbohidrato. Un grupo de enlace puede facilitar el enlace de un grupo de antígenos de carbohidrato a la nanopartícula. Por ejemplo, un grupo de antígenos de carbohidrato se puede enlazar a un grupo de enlace, el grupo de enlace puede incluir un átomo que tenga una afinidad alta por la nanopartícula y así se enlaza a la nanopartícula o se integra con la nanopartícula. Por ejemplo, un grupo de antígenos de carbohidrato se puede enlazar a un átomo de azufre, sirviendo el átomo de azufre como grupo de enlace, y a su vez el átomo de azufre se puede enlazar a la superficie de la nanopartícula. Como otro ejemplo, un sacárido que es un grupo de antígenos de carbohidrato se puede enlazar a un grupo de enlace que incluye una cadena de al menos un átomo de carbono. El grupo de enlace puede incluir además un átomo de azufre. Después, el átomo de azufre se puede enlazar a la nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula de oro o plata. Un átomo que se enlaza directamente a la nanopartícula, por ejemplo, un átomo de azufre, se puede denominar como parte de un grupo de enlace o como un grupo de enlace en sí mismo. De forma alternativa, un átomo que se enlaza directamente a la nanopartícula puede denominarse como fuera de un grupo de enlace. Esto es, el ejemplo anterior también se podría presentar como un grupo de antígenos de carbohidrato enlazado a un grupo de enlace que incluye una cadena de al menos un átomo de carbono, con el grupo de enlace enlazado al átomo de azufre, que está enlazado a la nanopartícula. En una realización, un disacárido de Thomsen-Friedenreich se une covalentemente a un grupo de enlace que incluye una cadena de cinco átomos de carbono, que a su vez se enlaza a un átomo de azufre, que a su vez se enlaza a la nanopartícula de plata u oro.

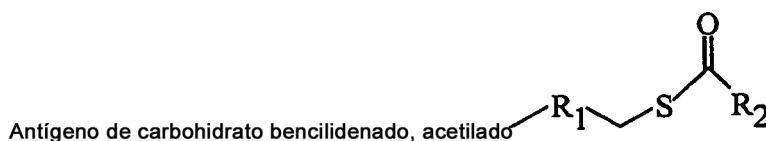


III

En una realización, se puede formar el grupo de antígenos de carbohidrato-tiol de fórmula III haciendo reaccionar un glicósido de fórmula I con un ácido alquiltio en presencia de un catalizador para producir un tioéster de fórmula II, en la que R_2 representa un grupo que contiene uno o más átomos de carbono. Después, el tioéster de fórmula II se puede ser desbencilidenar e hidrolizar para producir el grupo de antígenos de carbohidrato-tiol de fórmula III en solución. En una realización, el glicósido se puede seleccionar para producir un Thomsen-Friedenreich-tiol para el compuesto de fórmula III.



I



II

En una realización, la solución que contiene nanopartículas conjugadas ilustrada en la fig. 1 se puede purificar, y la solución purificada se puede secar para aislar una preparación de nanopartículas conjugadas con un grupo de antígenos de carbohidrato. Por ejemplo, la solución se puede filtrar a través de una membrana con un límite en el

intervalo de 10.000 a 1 millón de Dalton. El límite se puede seleccionar de modo que sólo pasen las nanopartículas deseadas menores de un determinado tamaño y queden retenidas las nanopartículas más grandes y las partículas; en este caso, el permeado que pasa a través del filtro se seca para obtener nanopartículas conjugadas aisladas. De forma alternativa, el límite se puede seleccionar de modo que se retengan las nanopartículas deseadas más grandes de un determinado tamaño y pasen las nanopartículas más pequeñas y las partículas; en este caso, el retentado retenido por el filtro se seca para aislar las nanopartículas conjugadas. La solución que contiene las nanopartículas también se puede forzar a pasar a través de un filtro con un límite más grande, después, el permeado pasa a través de un filtro con un límite más pequeño, y después, el retentado del filtro con el límite más pequeño se seca para aislar las nanopartículas conjugadas. Se pueden usar membranas de diversos tipos, por ejemplo, se puede usar una membrana de ultrafiltración o se puede usar una membrana de diálisis. Como ejemplo, la solución que contiene las nanopartículas se puede hacer pasar a través de una membrana de ultrafiltración con un límite de aproximadamente 50 kilodalton y se puede secar el retentado para aislar nanopartículas conjugadas. Las nanopartículas conjugadas aisladas se pueden redisolver o resuspender en un disolvente acuoso, por ejemplo, un disolvente acuoso biocompatible, para su uso posterior. Un disolvente acuoso biocompatible podría ser un disolvente que contiene componentes además de agua y las nanopartículas que mejoran el rendimiento de las nanopartículas disueltas en agua o suspendidas en agua cuando se aplican a un biomaterial. Por ejemplo, un disolvente acuoso biocompatible se puede ajustar para tener salinidad y pH similares a los de un tejido en el que se va a inyectar.

En una realización, una nanopartícula conjugada se enlaza a una célula para formar un complejo célula-nanopartícula. Por ejemplo, el grupo de antígenos de carbohidrato sobre la nanopartícula puede actuar como un ligando que se acopla con un receptor sobre la superficie de una célula. El grupo de antígenos de carbohidrato sobre la nanopartícula puede ser, por ejemplo, un sacárido, tal como un disacárido de Thomsen-Friedenreich. Por ejemplo, el disacárido de Thomsen-Friedenreich puede actuar como un ligando que se acopla con una proteína receptora, galectina-3, sobre una célula endotelial. Además de un grupo de antígenos de carbohidrato, la nanopartícula puede tener otros grupos sobre la superficie de la nanopartícula, tales como un ácido mercaptoalcanoico, por ejemplo, ácido mercaptoacético.

En una realización, las nanopartículas conjugadas están en forma de una formulación. Esta formulación incluye un líquido y nanopartículas conjugadas disueltas o suspendidas en el líquido, de modo que la solución o suspensión no precipite ni flocule. Las nanopartículas conjugadas de acuerdo con la invención, cuando se mezclan con agua, forman una solución que es transparente, aunque se puede colorear. Por tanto, parece que las nanopartículas se disuelven en agua. Sin embargo, la literatura sobre nanopartículas hidrófilas se refiere a menudo a una suspensión de nanopartículas, puede ser porque, aunque cuando se mezclan con agua la composición resultante sea transparente, el término "suspensión" se usa debido al mayor tamaño de las nanopartículas con respecto a moléculas de peso molecular bajo.

Las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato de acuerdo con la invención se pueden inyectar en un organismo, por ejemplo, en los tejidos, incluyendo el sistema circulatorio, de un animal vivo. Por ejemplo, las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato se pueden disolver o suspender en un disolvente acuoso biocompatible, y después la solución o suspensión se inyecta en el cuerpo. Las nanopartículas conjugadas de Thomsen-Friedenreich de la invención se adherirían a células que expresan galectina-3, en particular, células endoteliales que se han estimulado para expresar cantidades grandes de galectina-3. Entonces, la adhesión de células de tumor sobre las células endoteliales se inhibiría basándose en un efecto de enmascaramiento. El hecho que las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato se la presente solicitud sean solubles en agua y biocompatibles las hace particularmente ventajosas para su uso en la evaluación de tejido in vivo o in vitro.

Las nanopartículas también se pueden conjugar con receptores biológicos que se acoplan con antígenos sobre células de cáncer, estos antígenos ni están presentes en las células normales ni están presentes sobre células de cáncer en una concentración mucho más grande que en las células normales. De forma similar, las nanopartículas se pueden conjugar con antígenos que se acoplan con receptores sobre células de cáncer, estos receptores ni están presentes en las células normales ni están presentes sobre células de cáncer en una concentración mucho más grande que en las células normales. Al poner en contacto los conjugados de nanopartículas con el tejido en el cuerpo o en una muestra in vitro, se puede inhibir la adhesión por las células de cáncer.

Las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato se pueden usar en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, las células de cáncer pueden expresar antígenos que se acoplan con receptores en las células normales. Este acoplamiento puede desempeñar una función en la metástasis de células de cáncer u otras interacciones de células de cáncer con el cuerpo. En una realización, las nanopartículas se funcionalizan con los mismos antígenos que expresan las células de cáncer, las nanopartículas se pueden unir a receptores en las células normales y así bloquear la adhesión de células de cáncer a las células normales. Por ejemplo, como se discute anteriormente, el antígeno T de carbohidrato asociado a cáncer, por ejemplo, disacárido de Thomsen-Friedenreich, desempeña una función principal en el anclaje de células de cáncer de mama y de próstata sobre el endotelio interaccionando específicamente con una proteína expresada en el endotelio, galectina-3. Las nanopartículas funcionalizadas de Thomsen-Friedenreich se inyectan en el cuerpo para adherirse a células endoteliales que expresan galectina-3, en particular, células endoteliales que se han estimulado para expresar grandes cantidades de galectina-3, y así bloquear la adhesión de las células de cáncer al endotelio. Este tratamiento podría retrasar o evitar la metástasis de células de cáncer. Véase Glinsky et al., "The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium",

Cancer Res., 61 (12): 4851-4857, 15 de junio, 2001.

Sin quedar ligada a ninguna teoría particular de funcionamiento, las presentaciones múltiples de sacáridos antigénicos a proteínas receptoras, es decir, una concentración alta de sacáridos antigénicos, puede incrementar considerablemente la resistencia del acoplamiento entre la partícula o célula con los sacáridos antigénicos y la partícula o célula con las proteínas receptoras; esto se conoce como el efecto clúster de glicósidos. Por tanto, las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato se pueden usar ventajosamente como vehículos para proporcionar sacáridos antigénicos a proteínas receptoras, debido a que los sacáridos antigénicos están presentes en concentraciones altas en las nanopartículas.

Las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato presentadas en esta solicitud pueden ser especialmente útiles porque se pueden usar para tratamiento y diagnóstico. Por ejemplo, las nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato se pueden inyectar en el cuerpo para tratamiento, y después se pueden inducir para presentar fluorescencia y someter a imagen para monitorizar la respuesta del cuerpo, especialmente del tejido enfermo, para el tratamiento.

Como se discute anteriormente, las nanopartículas funcionalizadas con un antígeno se pueden unir a células enfermas, por ejemplo, células de cáncer, que expresan un receptor para el antígeno, y las nanopartículas funcionalizadas con un receptor se pueden unir a células enfermas, por ejemplo, células de cáncer, que expresan un antígeno que se acopla con el receptor. En una realización, la nanopartícula, además del antígeno de carbohidrato, tiene un agente terapéutico adicional enlazado a ella. Inyectando una nanopartícula de este tipo, se puede lograr la administración de fármaco específico de sitio. Esta administración de agente terapéutico específico de sitio es de gran interés en el tratamiento de cáncer, ya que los agentes terapéuticos usados pueden ser tóxicos para las células normales así como cancerosas. El agente terapéutico suministrado puede ser un fármaco, por ejemplo, un fármaco para estimular una respuesta inmunitaria, un agente quimioterapéutico, por ejemplo, para matar o debilitar una célula de cáncer, o un agente radioterapéutico para matar o debilitar una célula de cáncer. De forma alternativa, la porción de nanopartícula del conjugado antígeno-nanopartícula puede servir por sí mismo como agente terapéutico. Por ejemplo, se pueden usar radioisótopos como elementos en la formación de la nanopartícula. Se pueden seleccionar elementos o compuestos no radioactivos por su toxicidad para las células de cáncer y seleccionarse de modo que la nanopartícula se degrade con el tiempo, exponiendo las células de cáncer a las que está unido el conjugado antígeno-nanopartícula a esos elementos o compuestos tóxicos. También se pueden usar nanopartículas funcionalizadas con fármaco, radioactivas, o quimiotóxicas funcionalizadas con un antígeno para debilitar o destruir selectivamente células en el cuerpo a las que se adhieren las células de cáncer para su crecimiento o proliferación.

En una realización, se usan nanopartículas conjugadas con antígenos de carbohidrato como componente de una composición inmunógena. Se pueden usar antígenos asociados a tumor expresados por células cancerosas, por ejemplo, sacáridos antigénicos tales como disacárido de Thomsen-Friedenreich, para funcionalizar nanopartículas. La introducción de antígenos asociados a tumor solos normalmente no estimula una respuesta inmunitaria debido a la autotolerancia inmunitaria. Sin embargo, sin restringirse a una teoría particular de funcionamiento, la presentación múltiple y densa de antígenos asociados a tumor sobre la superficie de un núcleo de nanopartícula se puede reconocer por el sistema inmunitario como claramente antinatural de modo que se estimule una respuesta inmunitaria. Cuando se inyectan en el cuerpo, estas nanopartículas funcionalizadas de antígenos asociado a tumor estimulan una respuesta inmunitaria y por tanto incitan a que el sistema inmunitario ataque las células cancerosas.

Ejemplos

En estos ejemplos se notifica una preparación eficaz y simple de conjugados de nanopartículas de oro encapsulado de antígeno-T_n (también denominado "antígeno T_n" y "ag T_n", antígeno T_n y variantes similares) y antígeno-TF (también denominado "ag TF", "antígeno TF", "antígeno T" y variantes similares), su interacción con proteína específica de galactósido galectina-3 y péptido 15-mero de unión a antígeno TF P-30. Se analizan sus aplicaciones en imagen, diagnósticos de cáncer temprano, y su uso como agentes antimetastásicos.

Resultados y análisis

La preparación de antígenos TF y T_n con puente de disulfuro se representa en el **esquema 1** de Svarovsky, S. A.; Barchi, J. J. Jr. Carbohydr. Res. 2003, 338, 1925-1935. Después, los inventores de la presente invención prepararon conjugados de nanopartículas de oro encapsulado de antígeno TF y T_n por un procedimiento modificado de Brust et al. ("Synthesis of Thiol-derivatized Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System", J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, 801-802.) El conjugado antígeno-nanopartícula resultante fue extremadamente soluble en agua pero completamente insoluble en metanol y en otros disolventes orgánicos. Las medidas de TEM (**figura 3**) muestran que la solubilización en agua no dio como resultado la agregación de las nanopartículas.

La desaparición de las señales de metileno próximas al grupo -SH en las nanopartículas conjugadas de antígeno TF ("TF-AuNP") así como la desaparición del pico de -SH del espectro de IR son claramente indicativas de que la partícula de oro se unió con la monocapa de TFSH. Los cambios químicos y las integrales del resto de protones confirman que las moléculas de TFSH unidas tienen la misma estructura que las libres. Los resultados del análisis elemental de las nanopartículas de oro mostraron la misma proporción de C/H/N/O relativa como en el ligando libre.

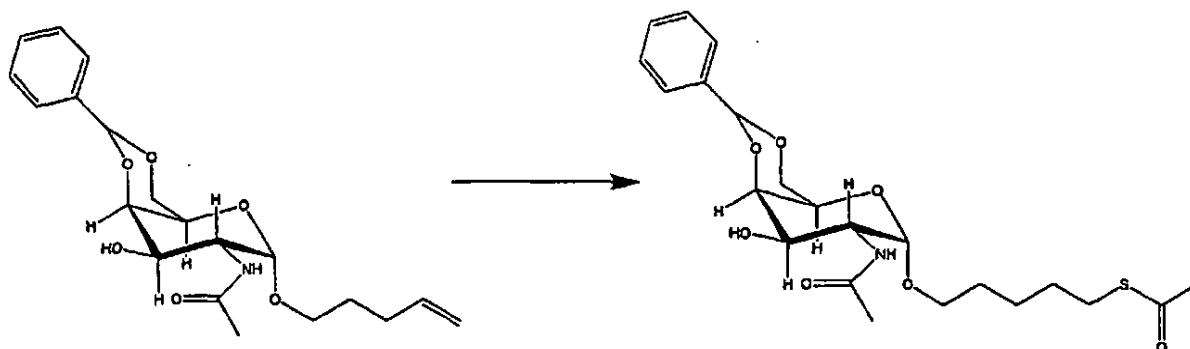
Parte experimental

Materiales y procedimientos

Se determinaron los puntos de fusión en un aparato de punto de fusión de Fisher-Johns y están sin corregir. Los valores de R_f se refieren a TLC realizada en uniplacas GF de Analtech prerrecubiertas con gel de sílice 60 a un grosor de 0,25 mm. Se visualizaron los puntos carbonizando con una solución de molibdato de amonio (IV) tetrahidratado (12,5 g) y sulfato de cerio (IV) tetrahidratado (5,0 g) en un 10 % de H_2SO_4 acuoso (500 ml). Se realizó la cromatografía en columna ultrarrápida bajo presión media usando gel de sílice 60 (malla 230-400, E. Merck) Y se empleó normalmente un gradiente de polaridad de disolvente en etapas, correlacionado con movilidad de TLC.

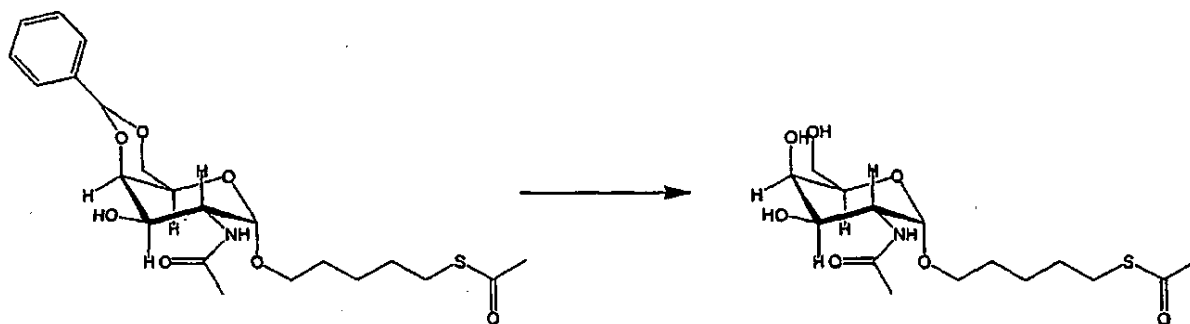
Se registraron espectros de RMN en un instrumento InovaUnity-400 de Varian con $CHCl_3$ residual (7,26 ppm) como el estándar interno en frecuencias de 399,74 MHz para 1H y 100,51 MHz para ^{13}C . Las asignaciones se basaron en experimentos gCOSY, TOCSY, ROESY, y ^{13}C /DEPT. Los datos de RMN de 1H están tabulados en el orden de multiplicidad (s, singlete; d, doblete; dd, doblete de dobletes; dt, doble de tripletes; t, triplete; q, cuartete; m, multiplete; sa, señal ancha), número de protones, y constante(s) de acoplamiento en hertzios. Los espectros de IR se tomaron con un espectrómetro FT/IR-615 de JASCO. Las rotaciones ópticas específicas se determinaron usando un polarímetro JASCO-P1010 en una cubeta de 0,5 dm a 589 nm en cloroformo. Se tomaron cinco medidas consecutivas de cada vez; se da el valor promedio. Se obtuvieron espectros de masas por bombardeo rápido de átomos de iones positivos (FABMS) a un voltaje de aceleración de 6 kV y a una resolución de 2000. Se usó glicerol como la matriz de muestra, y se efectuó la ionización por átomos de xenón. Se realizó la microscopía confocal de barrido láser en un microscopio confocal Zeiss 510 (NCI-Frederick, Confocal Microscopy Facility, Image Analysis Lab). Se realizaron análisis elementales por Atlantic Microlab, Inc., Norcross, GA. A menos que se establezca de otro modo, se adquirieron los materiales de Aldrich-Sigma (Milwaukee, WI) y se usaron sin purificación adicional.

Tioacetoxipentil-2-desoxi-4,6-benciliden-2-acetamido- α -D-galactopiranosido (126C-287)



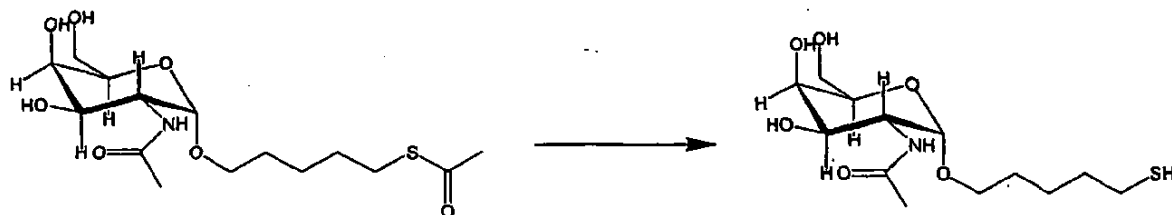
A una solución de 200 mg (0,53 mmol) de **126C-284** en 6 ml de 1,4-dioxano anhidro se le añadieron 4,4 ml (8,0 mmol, 15,08 equiv.) de ácido tiolacético recién destilado (3x) seguido de adición de 90 mg (0,09 mmol) de AIBN. Se dejó la reacción en agitación a 75 °C. A las 6 horas, la TLC (5 % v/v de MeOH en CH_2Cl_2) no mostró ningún material de partida. Se coevaporó la reacción con xilenos para retirar los disolventes y se sometió a cromatografía ultrarrápida el aceite residual EtOAc/hexanos 20:1 para dar 208 mg (0,46 mmol, 86 % de rendimiento) de un sólido blanco. R_f 0,22, (10:1 EtOAc/Hexanos); $[\alpha]_D = +210,00$ (c 0,21 en $CHCl_3$); IR (puro) 3291,89, 2114,56, 1748,16, 1649,80, 1554,34, 1375,00, 1218,79; RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,49-7,56 (m, 2H, Ph), 7,35-7,42 (m, 3H, Ph), 5,76 (d, 1H, $J=9,37$ Hz, NH), 5,58 (s, 1H, PhCH), 4,94 (d, 1H, $J=3,51$, H'-1), 4,46 (m, 1H, H'-2), 4,27 (dd, 1H, $J=1,17$, 12,49Hz, H'-6b), 4,23 (d, 1H, $J=3,51$ Hz, H'-4), 4,08 (dd, 1H, $J=1,95$, 12,49Hz, H'-6a), 3,84 (ddd, 1H, $J=3,5$, 10,5, 14,4Hz H'-3), 3,70 (dt, 1H, $J=6,25$, 9,76Hz, $-OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SAC$), 3,67 (sa, 1H, H'-5), 3,44 (dt, 1H, $J=6,25$, 9,76Hz $-OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SAC$), 2,88 (m, 2H, $-OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SAC$), 2,76 (d, 1H, $J=10,93$ Hz, -OH), 2,34 (s, 3H, SAC), 2,05 (s, 3H, NHAc), 1,56-1,68 (m, 4H, $-OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SAC$), 1,38-1,49 (m, 2H, $-OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SAC$); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 171,37, 129,36, 128,43, 126,56, 101,51, 98,38, 75,71, 69,58, 69,35, 68,04, 63,15, 50,60, 30,86, 29,55, 29,04, 28,98, 25,55.

FAB EM m/z: 454,2 (MH⁺). Anal: Calc. para $C_{22}H_{31}NO_7S$: C 58,26; H 6,89; N 3,09. Hallado: C 58,14; H 6,80; N3,02.

Tioacetoxipentil-2-desoxi-2-acetamido- α -D-galactopiranosido (126C- 289-2)

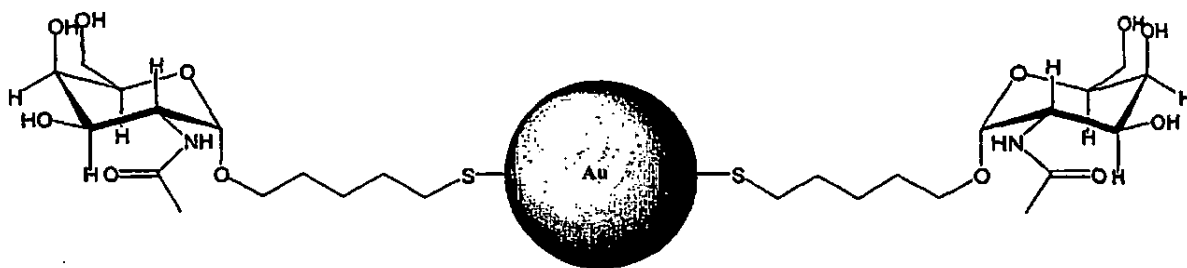
Se dejó que una solución de 180 mg (0,40 mmol) de **126C-287** en 10 ml de 80 % de AcOH reaccionara a 60 °C durante 3 horas. No se detectó ningún material de partida después de este tiempo. Se diluyó la solución de reacción con xilenos y se rotoevaporó hasta sequedad. Se sometió a cromatografía el residuo sólido blanco en gel de sílice usando un 10 % v/v de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente. Esto dio 80 mg (56 % de rendimiento) del α -producto. R_f 0,21, (10 % de MeOH en CH₂Cl₂); $[\alpha]_D^{20} = +104,74$ (c 0,18 en CHCl₃); 1R (puro) 3319,86, 2119,40, 1738,80, 1692,23, 1643,05, 1542,77; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,00 (d, 1H, J=8,20, NH); 4,86 (d, 1H, J=3,9Hz, H'-1) 4,32 (m, 1H, H'-2), 4,02 (d, 1H, J=3,12Hz, H'-4), 3,86 (bd, 1H, OH), 3,76 (m, 1H, H'-3), 3,71 (dt, 1H, J=6,64, 9,76Hz, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SAc), 3,49 (bs, 1H, OH), 3,43 (dt, 1H, J=6,25, 9,76Hz -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SAc), 2,81-2,87 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SAc), 2,67 (bs, 1H, OH), 2,34 (s, 3H, SAc), 2,09 (s, 3H, NHAc), 1,57-1,69 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SAc), 1,38-1,48 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SAc); RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ = 196,46, 172,68, 97,51, 71,23, 69,18, 68,49, 67,47, 61,62, 50,48, 48,44, 47,17, 29,40, 29,32, 28,71, 28,58, 25,26, 21,50.

FAB EM m/z: 366,2 (MH⁺). Anal: Calc. para C₁₅H₂₇NO₇S: C 49,30; H 7,45; N 3,83. Hallado: C 49,38; H 7,34; N 3,83

Tiopentil-2-desoxi-2-acetamido- α -D-galactopiranosido (126C-290)

A una solución de 60 mg (0,16 mmol) de **126C-289-2** en 3 ml de MeOH anhidro se añadieron gota a gota 45 μ l (10,6 mg, 0,20 mmol) de NaOMe (25 % p/v de solución en MeOH) a 0 °C. Después, se calentó la solución a temperatura ambiente y se agitó durante una hora adicional. Se neutralizó la solución con resina de intercambio iónico débilmente ácida (Amberlite®-50). Se filtró la resina y se lavó con 20 ml de MeOH. La FCC en gel de sílice usando un 10 % v/v de MeOH en CH₂Cl₂ proporcionó 47 mg (89 %) de sólido blanco. R_f 0,10, (10 % de MeOH en CH₂Cl₂); RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ = 4,76 (d, 1H, J=3,51, H'-1), 3,99 (dd, 1H, J=3,90, 10,93Hz, H'-2), 3,84 (d, 1H, J=3,51Hz, H'-6a), 3,80 (d, 1H, J=5,86Hz, H'-4), 3,77 (dd, 1H, J=3,12, 3,51Hz, H'-3), 3,62 (d, 1H, J=1,95Hz, H'-6b), 3,60 (sa, 1H, H'-5), 3,53-3,60 (m, 1H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SNa), 3,30-3,38 (m, 1H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SNa), 2,42 (t, 1H, J=7,03, 7,42Hz, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SNa), 1,90 (s, 3H, NHAc), 1,42-1,53 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SNa), 1,26-1,36 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SNa), (comprobar asignaciones H4,5,6, ampliar COSY); RMN de ¹³C (100 MHz, D₂O) δ = 174,69, 96,96, 71,00, 68,69, 68,07, 67,84, 61,42, 50,23, 32,78, 28,04, 24,25, 23,86, 22,15. FAB EM m/z: 346,2 (M+Na⁺). Anal: Calc. para C₁₃H₂₄NNO₆S: C 45,21; H 7,00; N 4,06. Hallado: C 46,31; H 7,80; N 4,15

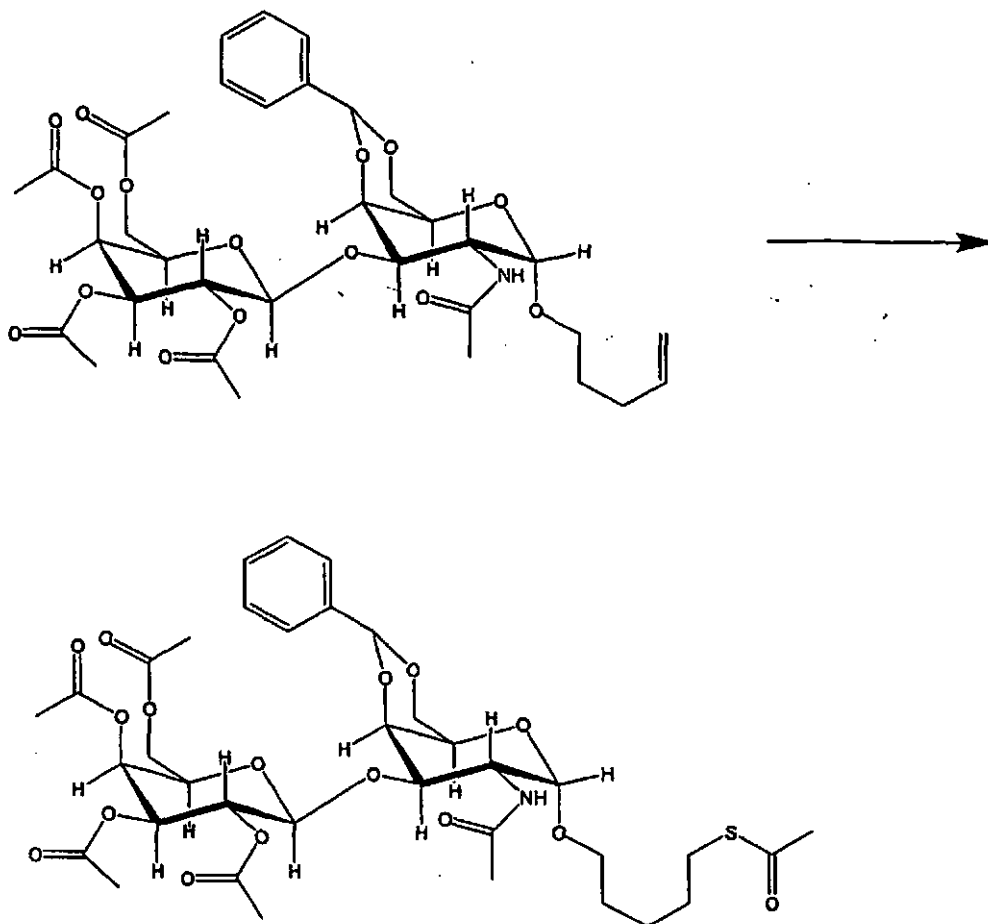
Nanopartículas de oro encapsuladas-Tn (Tn-AuNP)



Se combinó una solución de HAuCl_4 (1 ml, 15 mmol/l, 0,015 mmol) en agua con 1 ml de 35 mmol/l (0,035 mmol) de solución de bromuro de tetraoctilamonio (0,035 mmol) en tolueno. Se agitó enérgicamente la solución de dos capas hasta que la capa de agua se volvió transparente (transferencia completa de HAuCl_4 en la fase orgánica). Se separó la capa de tolueno naranja y se transfirió en un vial de reacción. Se añadió solución de 3,5 mg (0,0054 mmol) de **126C-300** y 1 mg de NaBH_4 en 2 ml de MeOH. Después, se añadió lentamente la solución combinada a la solución de tolueno de HAuCl_4 con agitación enérgica. Se produjo la precipitación inmediata de material insoluble oscuro. Después de que se completase la adición, se agitó la solución de reacción durante una hora adicional. Se centrifugó el precipitado a 5.000 rpm durante 15 min y se lavó con MeOH. Se repitió este procedimiento tres veces. Se disolvió el precipitado oscuro en agua y se liofilizó. La RMN de las nanopartículas en D_2O mostró trazas de material de partida (NT=5.000) junto con señales anchas correspondientes al ligando de azúcar **126C-300**. Se purificaron adicionalmente las nanopartículas filtrando de forma centrífuga con Centricon[®]-3 hasta que no se pudo detectar ningún material de partida por RMN ni TLC. El espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) de Tn-AuNP mostró dos picos anchos a 1,00-2,50 ppm y 3,00-4,5 ppm. Los cambios químicos de los picos corresponden a los del compuesto **126C-300**. Los informes anteriores indican que los picos ensanchados se pueden atribuir al ensamblaje de antígeno Tn tiolado sobre la superficie de oro. (Lin, C-C. et al JACS, 2002, 124, 3508 y referencias en el documento) IR, RMN, TEM, UV-Vis.

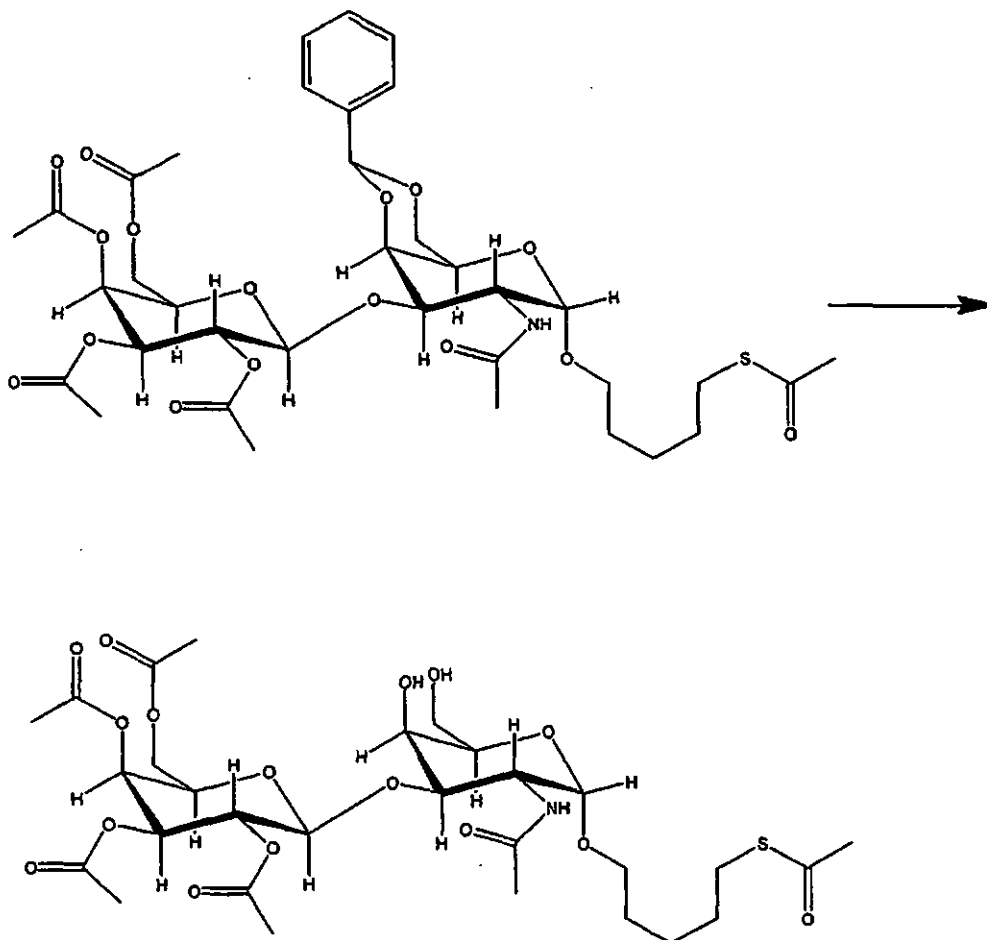
Preparación de TF-AuNP

126B-172



- Se purgó con argón una solución de 120 mg (0,17 mmol) de **126B-164** {Svarovsky y Barchi 2003 281 /id} en 4 ml de 1,4- dioxano anhidro durante 20 min. A esta solución desoxigenada se le añadieron 1,4 ml (2,55 mmol, 15 equiv.) de ácido tiolacético triplemente destilado seguido de 30 mg (0,03 mmol) de AIBN. Se dejó que la reacción se agitara bajo atmósfera de argón a 75 °C hasta que no se pudo detectar ningún material de partida por TLC (aproximadamente 1 hora). Después, se inactivó la reacción con ciclohexeno (0,1 ml). Se coevaporó la solución con xilenos bajo presión reducida. La FCC en gel de sílice con EtOAc/hexanos 3:1 proporcionó 125 mg (99,8 %) de sólido blanco (mezcla 7:3 de rotámeros de amida). R_f 0,19 (3:1 EtOAc/ hexanos); $[\alpha]_D^{25} = +157,79$ (c 0,22 en CHCl_3); IR (puro) 3099,05, 1752,01, 1689,34, 1368,25, 1220,72; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,48-7,54 (m, 2H, Ph), 7,27-7,38 (m, 3H, Ph), 5,56 (d, 1H, $J=8,98\text{Hz}$, NH), 5,52 (s, 1H, PhCH), 5,34 (d, 1H, $J=2,34\text{Hz}$, H"-4), 5,13-5,19 (m, 1H, H"-2), 4,92-4,98 (m, 2H, H"-3, H'-1), 4,76 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, ($\beta\text{H}''$ -1), 4,62 (m, 1H, H'-2), 3,90-4,30 (m, 6H, H'-6, H"-6, H'-4, H"-5), 3,88 (m, 1H, H'-3), 3,59 (sa, 1H, H'-5), 3,60-3,70 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 3,35-3,45 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,83 (t, 2H, $J=7,42\text{Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,30 (s, 3H, SAC), 1,93, 1,96, 2,00, 2,01, 2,11 (s, 15H, OAc, NHAc), 1,52-1,62 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 1,34-1,44 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) δ = (se necesita ^{13}C). FAB EM m/z : 784,0 (MH $^+$). Anal: Calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{NO}_{16}\text{S}$: C 55,16; H 6,30; N 1,79. Hallado: C 54,89; H 6,32; N 1,87

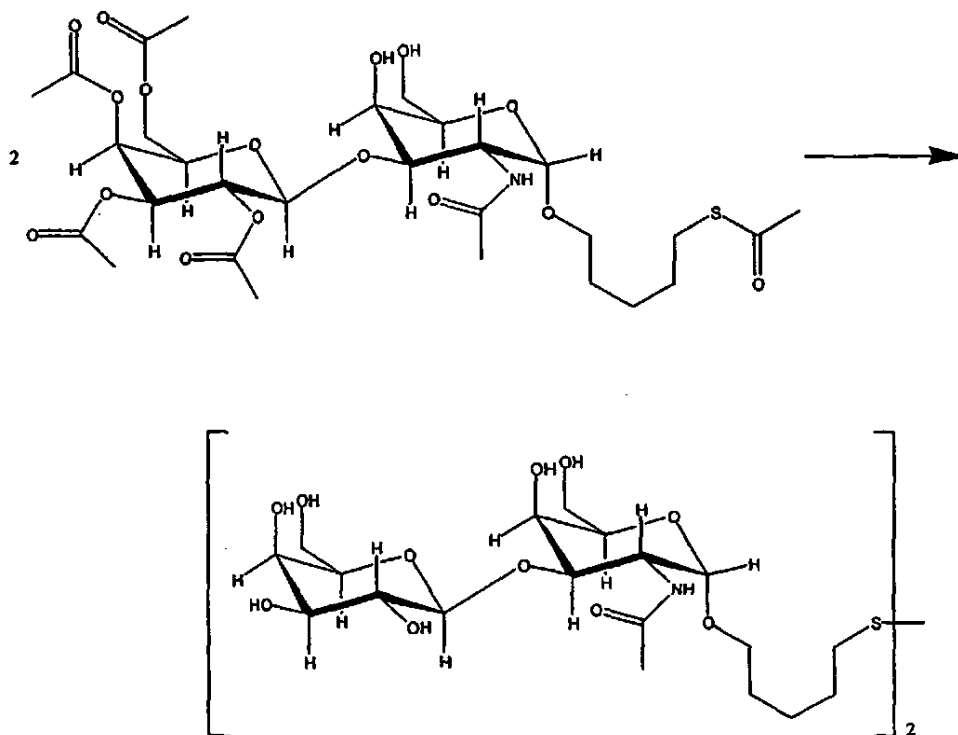
126B-175



Se agitó una solución de 110 mg (0,14 mmol) de **126B-172** en 3 ml de un 80 % de AcOH a 45 °C durante 16 horas. Se concentró la solución de reacción a presión reducida y se coevaporó dos veces con xilenos. Se sometió a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice usando un 7 % de MeOH en CH₂Cl₂ para proporcionar 69 mg (71 % de rendimiento) de espuma blanca (mezcla de 7:3 de rotámeros de amida). PF 95-97 °C; R_f 0,46 (10 % MeOH en CH₂Cl₂); [α]_D = +107,69 (c 0,15 en CHCl₃); IR. (puro); 3552,24, 1750,08, 1688,37, 1656,55, 1545,67, 1370,18, 1220,72; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,33 (dd, 1H, J=0,78, 3,51Hz, H''-4), 5,11-5,18 (m, 1H, H''-2), 4,94 (dd, 1H, J=3,51, 10,54Hz, H''-3), 4,78 (d, 1H, J=3,51Hz, H'-1), 4,61 (d, 1H, J=8,20Hz, (βH''-1), 4,51 (td, 1H, J=3,90, 10,54Hz, H'-2), 3,65-4,18 (m, 8H, H'-5, H'-3, H'-6, H''-6, H'-4, H''-5), 3,60-3,67 (m, 1H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 3,31-3,40 (m, 1H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,78-2,85 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,70 (sa, 2H, OH), 2,28 (s, 3H, SAc), 1,92, 1,94, 2,00, 2,02, 2,11 (s, 15H, OAc, NHAc), 1,50-1,62 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 1,32-1,42 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 196,46, 170,61, 170,39, 170,32, 169,72, 169,55, 101,86, 97,87, 78,38, 71,07, 70,82, 69,69, 69,37, 68,83, 67,89, 67,10, 62,88, 61,52, 48,06, 30,86, 29,57, 29,03, 28,88, 25,61, 23,56, 20,87, 20,81, 20,79, 20,72, 20,67.

FAB EM m/z: 696,1 (MH⁺). Anal: Calc. para C₂₉H₄₅NO₁₆S: C 50,06; H 6,52; N 2,01. Hallado: C 49,55; H 6,53; N 2,00

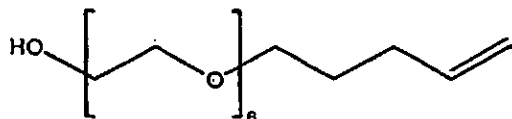
126B-177L



Se trató una solución de 300 mg (0,43 mmol) de **126B-175** en 5 ml de MeOH con 30 μ l de un 25 % (p/v) de NaOMe/MeOH. Se agitó la reacción a TA y durante 24 horas con flujo lento de burbujeo de aire a través de la solución. Inicialmente, se observaron dos puntos por TLC (R_f 0,13 y R_f 0,00 en un 20 % v/v de MeOH/ CH_2Cl_2). El punto de R_f más alto corresponde al tiol monomérico **126B-177H** mientras que el punto más bajo correspondió al dímero deseado **126B-177L**. Después de 24 horas, solo se pudo observar un punto de **126B-177L**. En este punto, se neutralizó cuidadosamente la reacción con Amberlite®-120 fuertemente ácido, y se evaporó bajo presión reducida a 50 °C para dar 200 mg (96 %) de **126B-177L** puro de RMN. Se purificó el producto bruto por RPFC con un 10 % $\rightarrow$ 40 % (v/v) de MeOH/ H_2O para dar 187 mg (90 %) de **126B-177L** puro como polvo blanco. El compuesto era soluble tanto en agua como en metanol. PF 247-249 °C; $[\alpha]_D = +93,76$ (c 1,6 en MeOH); IR (puro) 3379,64, 2944,77, 2827,13, 2112,64, 1746,23, 1218,79; RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ = 4,14 (d, 2H, J = 1,95Hz, NH), 3,87 (dd, 2H, J = 3,12, 10,93Hz, H'-2), 3,68 (m, 2H, $[-\text{OCH}_2-]_2$), 3,40 (m, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 2,68 (t, 4H, J = 7,42Hz, $-\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2-$), 1,94 (s, 6H, NHAc), 1,43-1,74 (m, 12H, $[-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-]_2$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 172,77 (NHAc), 105,08 (C-1), 97,60, 77,76, 75,52, 73,52, 71,33, 70,85, 69,07, 68,83, 67,54, 61,64, 61,38, 49,19, 38,41, 28,89, 28,81, 24,93, 21,69. FAB EM m/z : 969,2 (MH^+). Anal. Calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{22}\text{S}(3\text{xH}_2\text{O})$ C, 44,61; H, 7,29; N, 2,74. Hallado: C 44,24; H 7,21; N 2,73.

Síntesis de enlazadores HEXPEG

126E-170

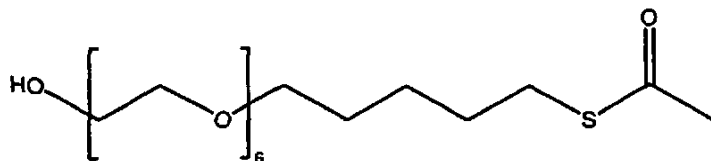


{PALEGROSDEMANGE, SIMON, et al. 1991 171 /id}

Se añadió una solución de 533 μ l de un 50 % de NaOH (6,7 mmol) a 10 g (35,5 mmol) de hexa(poli(etilenglicol)) (Aldrich) a 100 °C. Se agitó la reacción durante 30 min a 100 °C. Se añadió rápidamente 5-bromo-1-penteno (1 g, 6,7 mmol) y se agitó la reacción a 100 °C durante 24 horas. Se diluyó la reacción con agua y se extrajo 6x con EtOAc. Se evaporaron los extractos orgánicos combinados y se separaron por FCC con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1. Esto dio 1 g del producto del título como un líquido transparente. R_f (10:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) = 0,3; IR (puro) 3465 (sa), 2231, 2022, 1690; RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl) δ = 5,73-5,83 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,90-5,02 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,53-3,70 (m, 24H, PEG), 3,43 (t, 2H, J = 6,49Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 2,08 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1,65 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) δ = 72,49, 70,66, 70,59, 70,55, 70,52, 70,33, 70,07, 61,68, 30,19, 28,75. FAB EM m/z : 351,3

(MH⁺), 373,3 (M+Na⁺). Anal: Calc. para C₁₇H₃₄O₇: C, 58,26; H, 9,78; Hallado: C 58,30; H 9,78.

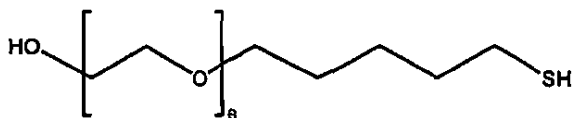
126E-179



Palegrosdemange C, et al., J. Am. Chem. Soc., 113(1):12-20 2 enero, 1991

- 5 Se trató una solución de 2,8 g (8 mmol) de **126E-170** en 30 ml de MeOH con 30 mmol (2,3 g, 2,3 ml) de HSAc recién destilado. Se purgó la solución con argón durante 20 minutos y se añadieron 10 mg de AIBN. Se irradió la reacción con 360 nm de luz durante una noche, se inactivó con 1 ml de ciclohexeno y se evaporó. Se purificó el residuo por FCC con CH₂Cl₂:MeOH 15:1 para proporcionar 3 g (88 %) del producto S-acetilado como un líquido transparente. IR (puro); 3465 (sa), 1689; RMN de ¹H (400 MHz, CD₃Cl) δ = 3,52-3,72 (m, 24H, PEG), 3,42 (t, 2H, J = 6,49 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,84 (d, 2H, J = 6,95 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,60 (sa, 1H, OH), 2,29 (s, 3H, Sac), 1,56 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 1,39 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac); RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃Cl) δ = 195,91, 72,47, 71,09, 70,61, 70,57, 70,55, 70,36, 70,09, 61,72, 30,62, 29,34, 29,10, 29,01, 25,36; FAB EM m/z: 427,4 (MH⁺). Anal: Calc. para C₁₉H₃₈O₈S: C, 53,50; H, 8,98; 0,30,01. Hallado: C 52,17; H 8,91.

126F-018



- 15 Se trató una solución de 1 g (2,34 mmol) de **126E-179** en 15 ml de MeOH seco con 10 gotas de un 25 % p/v de NaOMe/MeOH durante 30 minutos. Se inactivó la reacción con resina de intercambio de iones Amberlite®-120, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo por FCC con CH₂Cl₂:MeOH 15:1 para proporcionar 350 mg (40 %) de disulfuro que se escindió a tiol libre con DTT como sigue. Se trató la solución de 350 mg del disulfuro con 10x DTT en exceso en H₂O durante 1 hora, se concentró y se purificó por FCC con un 10 % de CH₂Cl₂:MeOH para dar 340 mg (98 %) de **126F-018** como un líquido amarillo claro. RMN de ¹H (400 MHz, CD₃Cl) δ = 3,48-3,68 (m, 24H, PEG), 3,38 (t, 2H, J = 6,49 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 2,80 (t, 1H, J = 6,03 Hz, OH), 2,46 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,54 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,38 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,28 (m, 1H, SH); RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃Cl) δ = 72,49, 71,08, 70,51, 70,48, 70,29, 70,05, 61,61, 33,75, 29,01, 24,87, 24,46. FAB EM m/z: 385,3 (MH⁺), 407,3 (M+Na⁺). Anal: Calc. para C₁₇H₃₆O₇S: C, 53,10; H, 9,44; Hallado: C 52,53; H 9,41.

Síntesis de galactósido β-enlazado

126F-083

- 30 Se transfirió por medio de una cánula una solución de 1,4 g (2,8 mmol) de **Gal-TCI** {Ren y Liu 1999 124 /id} y 1 g (2,34 mmol) de **126E-179** en 20 ml de CH₂Cl₂ anhidro a 500 mg de SM secado a la llama (4A) y se agitó a TA durante 30 min antes de la adición de 20 µl de TMSOTf. Después de 1 hora a TA, se inactivó la reacción con 0,1 ml de Et₃N, se filtró a través de Celite®, se concentró y se purificó por FCC sobre gel de sílice proporcionando 1,2 g (82 %) de **126F-083** como un sólido vidrioso. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,31 (m, 1H, H-4), 5,14 (dd, 1H, J = 7,94 Hz, J = 10,48 Hz, H-3); 4,95 (dd, 1H, J = 3,44 Hz, J = 10,46 Hz, H-2), 4,50 (d, 1H, J = 7,99 Hz, H-1), 3,45-3,72 (m, 24H, 24H PEG6), 3,80-4,20 (m, 3H, H-5, H-6ab), 3,40 (t, 2H, J = 6,60 Hz, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,70 (t, 2H, J = 7,32 Hz, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 2,25 (s, 3H, Sac), 2,08, 1,99, 1,98, 1,91 (s, 12H, 4xAc), 1,52 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac), 1,35 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂Sac); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 170,36, 170,25, 170,14, 169,45, 101,38, 71,11, 70,91, 70,59, 70,27, 70,10, 69,07, 68,81, 67,07, 61,29, 30,62, 29,36, 29,11, 29,02, 25,38, 20,76, 20,67, 20,58; FAB EM m/z: 795,6 (M + K⁺); Anal: Calc. para C₃₃H₅₆O₁₇S: C, 52,37; H, 7,46; Hallado: C 52,09; H 7,49.

126F-084

- 40 Se trató una solución de 1,2 g (1,92 mmol) de **126F-083** en 15 ml de MeOH con una cantidad catalítica de un 25 % de NaOMe/MeOH. Después de agitar durante una noche bajo argón, se neutralizó la reacción con resina de intercambio de iones Amberlite®-120 fuertemente ácida, se filtró, se evaporó y se purificó por RP-FCC en una columna C-18 con un 10 % → 40 % de MeOH en H₂O para dar después de liofilización 750 mg (94 %) de **126F-084** como un sólido vidrioso. RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ = 4,30 (d, 1H, J = 7,80 Hz, H-1), 3,97 (dt, 1H, J = 4,07 Hz, J = 11,19 Hz,), 3,80 (m, 1H,), 3,50-3,77 (m, 29H, 24H PEG6, anillo de azúcar 5H), 3,44 (m, 3H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH, H-2), 2,45 (t, 2H, J = 7,1 Hz, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,50 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,32 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH);

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 4,25 (d, 1H, J = 7,56 Hz, (pH-1) 4,07 (sa, 4H, OH), 3,97 (m, 1H, H-4), 3778 (m, 1H), 3,50-3,73 (m, 28H, PEG6), 3,42 (t, 2H, J = 6,54 Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 2,48 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,57 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,40 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 103,57, 74,47, 73,60, 71,12, 70,52, 70,48, 70,45, 70,39, 70,26, 70,05, 68,77, 68,54, 61,38, 33,77, 29,02, 24,88, 24,49; FAB EM m/z : 585,5 ($M + K^+$); Anal: Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_{12}\text{S}$: C, 50,53; H, 8,48; Hallado: C 48,99; H 8,51.

Síntesis de lactósido β -enlazado

126F-093

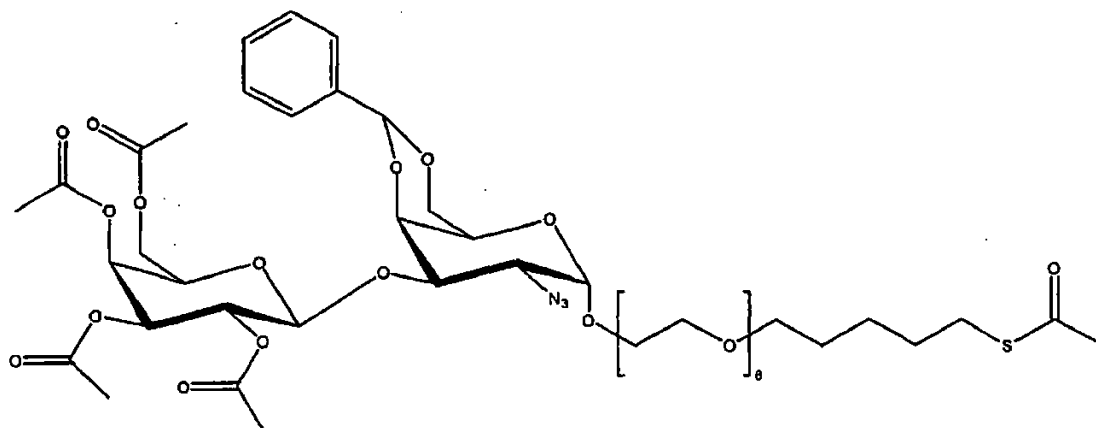
Se añadió por medio de una cánula una solución de 0,96 g (1,23 mmol) heptaacetato de O-lactosil-tricloroacetimidato y 426 mg (1 mmol) de PEG6-Pent-SAc en 15 ml de CH_2Cl_2 anhidro a 500 mg de SM secado a la llama (4A). Después de agitar durante 30 min a TA, se trató la solución con 15 μl de TMSOTF. Se inactivó la reacción en 1 hora por adición de unas pocas gotas de Et_3N , se filtró a través de Celite[®] y se evaporó. Se purificó el residuo por FCC para dar 1,05 g (82 %) del producto como un sólido vidrioso. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 5,35 (m, 1H, H-4'), 5,11 (dd, 1H, J_{12} = 7,89 Hz, J_{23} = 10,42 Hz, H-2''), 4,95 (dd, 1H, J_{34} = 3,44 Hz, J_{23} = 10,44 Hz, H-3''), 4,89 (dd, 1H, J = 7,95 Hz, J = 9,56 Hz, H-4'), 4,55 (d, 1H, J = 7,95 Hz, H-1''), 4,78 (d, 1H, J = 7,85 Hz, H-1'), 4,05-4,17 (m, 3H, H-6''ab, H-2'), 3,75-3,95 (m, 3H, H-6'ab, H-5), 3,50-3,75 (m, 24H, PEG6), 3,45 (t, 2H, J = 6,60 Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,87 (t, 2H, J = 7,30 Hz, $-\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,32 (s, 3H, SAC), 2,15, 2,12, 2,06, 2,05, 2,04, 2,03, 1,97 (s7 21H, Ac), 1,59 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 1,40 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 170,34, 170,14, 170,04, 169,74, 169,65, 169,05, 101,12, 100,69, 71,12, 70,68, 70,58, 70,10, 66,52, 62,02, 60,77, 29,36, 29,12, 29,03, 25,38, 20,69, 20,56, 20,44. FAB EM m/z : 1045,3 (M^+), 1083,4 ($M + K^+$). Anal: Calc. para $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{25}\text{S}$: C, 51,72; H, 6,94, Hallado: C 51,34; H 6,91.

126F-094

Se trató una solución de 860 mg (0,82 mmol) de **126F-093** en 20 ml de MeOH con una cantidad catalítica de un 25 % p/v de NaOMe en MeOH. En 1 hora, se inactivó la reacción con resina de intercambio de iones Amberlite[®]-120 fuertemente ácida, se filtró, se concentró y se purificó por RP-FCC en una columna C-18 con un 20 % $\rightarrow$ 40 % de MeOH en H_2O . RMN de ^1H (100 MHz, D_2O) δ = 4,40 (d, 1H, J = 7,92 Hz, (β H-1''), 4,34 (d, 1H, J = 7,72 Hz, β H-1'), 3,20-4,00 (m, 38H, 24 PEG6, 2 pent, 12 azúcar), 2,45 (t, 2H, J = 7,01 Hz, CH_2SH), 1,51 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,33 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ = 102,96, 102,91, 102,10, 78,30, 75,32, 74,73, 74,26, 72,77, 72,51, 70,88, 69,75, 69,11, 68,69, 68,53, 68,48, 60,97, 60,06, 32,73, 27,97, 24,01, 23,65. FAB EM m/z : 709,4 (M^+), 747,3 ($M + K^+$). Anal: Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{O}_{17}\text{S}$: C, 49,14; H, 7,96, Hallado: C 48,75; H 7,77.

Síntesis de antígeno de Thomsen-Friedenreich α - y β -HEXPEG-enlazado

126E-181-HI

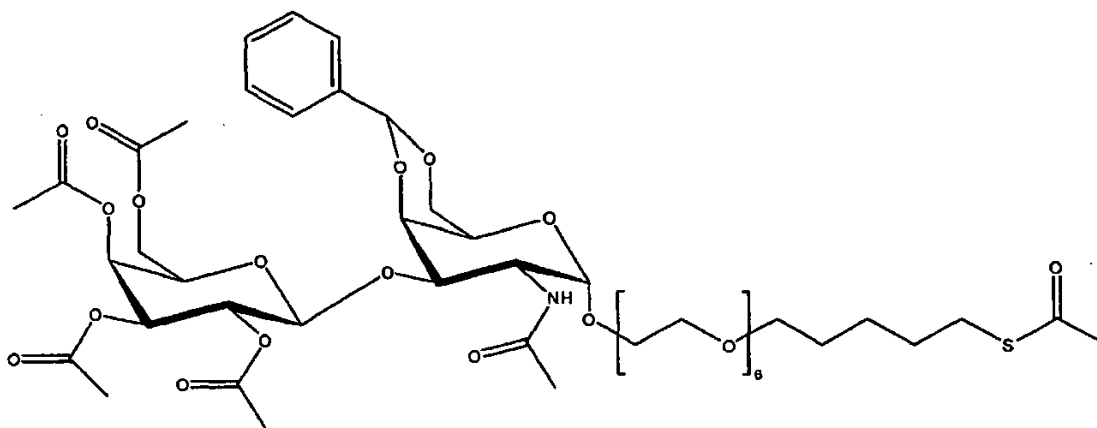


Se evaporó una solución de 2,5 g (3,26 mmol) de **126C-219** y 1 g (2,36 mmol) de **126E-179** en CH_2Cl_2 y se coevaporó con tolueno y se secó el residuo bajo vacío durante una noche. Se disolvió la mezcla seca en una mezcla 3:1 de CH_2Cl_2 /THF anhidro (60:20 ml) y se añadió por medio de una cánula a 2 g de SM secado a la llama (4A). Después de agitar durante 20 minutos, se inyectaron rápidamente 15 μl de TMSOTF por medio de una jeringuilla. Después de 30 min, se inactivó la reacción con Et_3N , se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo por FCC con CH_2Cl_2 :MeOH 20:1 para proporcionar 1,5 g de α -anómero y 400 mg de β -anómero (α : β =3,75). Rendimiento total 79 %. Se han probado otras condiciones de reacción para lograr una estereoselectividad α/β mayor. Se ha notificado que una disminución de la temperatura conduce a una selectividad α/β menor. Un incremento en la polaridad dio como resultado una selectividad α/β mejor. El uso de una mezcla 3:1 de CH_2Cl_2 :THF a temperatura ambiente dio la estereoselectividad más alta.

Se aisló el α -anómero (**126E-181-HI**) deseado como un sólido vidrioso. R_f (10:1 CH_2Cl_2 :MeOH)= 0,8; proporción 4:1 de rotámeros. Se da la RMN del rotámero principal. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl) δ = 7,39-7,43 (m, 2H, Ph), 7,20-7,28 (m, 3H, Ph), 5,43 (s, 1H, PhCH), 5,28 (m, 1H, H-4"), 5,17 (dd, 1H, J = 7,88, 10,20 Hz, H-2"), 4,98 (d, 1H, J = 3,71 Hz, H-1'), 4,92 (m, 1H, H-3"), 4,67 (d, 1H, J = 7,88 Hz, H-1"), 4,26 (m, 1H, H-4'), 3,8-4,15 (m, 8H, H-2', H-3', H-6', H-6", H-5', H-5"), 3,52 (m, 24H, PEG), 3,32 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), 2,74 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), 2,19 (s, 3H, SAc), 2,04, 1,94, 1,92, 1,86 (s, 12H, 4xAc), 1,46 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), T.30 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) δ = 195,86, 170,28, 170,23, 170,11, 169,38, 137,73, 128,81, 128,22, 128,08, 126,50, 126,13, 102,41, 100,58, 98,87, 75,81, 71,06, 70,77, 70,55, 70,50, 70,22, 70,07, 69,19, 68,67, 67,51, 66,97, 63,02, 62,39, 61,37, 58,84, 30,61, 29,64, 29,34, 29,09, 28,99, 25,35, 20,69, 20,67, 20,54; FAB EM m/z: 1031,9 (MH⁺), 1069,9 (M+K⁺). Anal. Calc. para $\text{C}_{46}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{21}\text{S}$: C, 53,53; H, 6,74; N, 4,07; O, 32,55; S, 3,11 Hallado: C xx.xx; H x.xx.

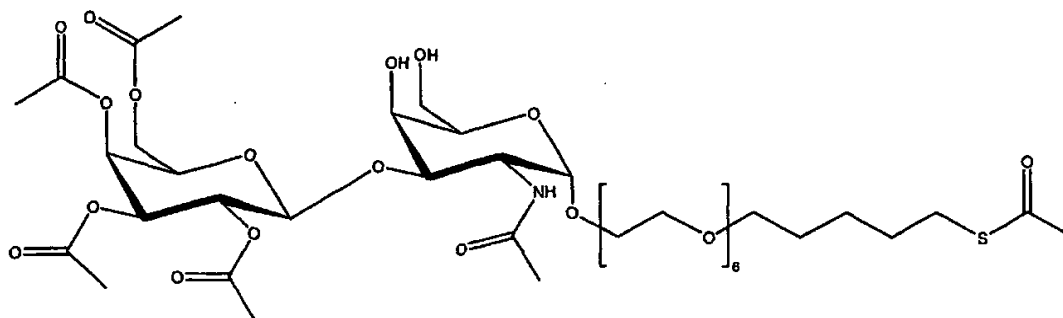
Se aisló el producto secundario **126E-181-LO** como un sólido vidrioso. R_f (10:1 CH_2Cl_2 :MeOH)= 0,5;

126E-188-HI



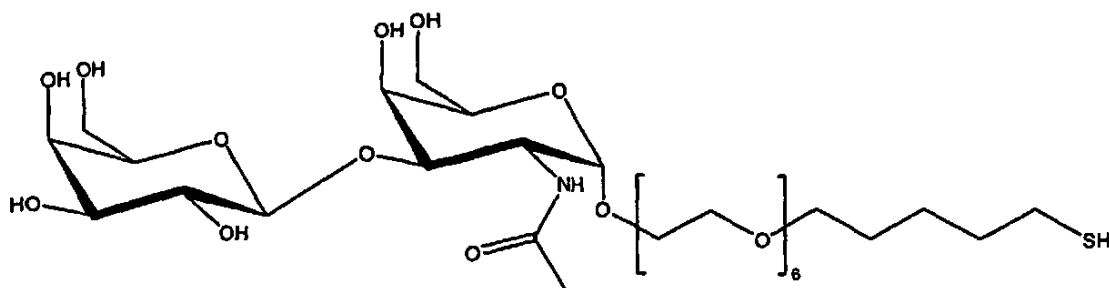
Se trató una solución de 1,5 g de **126E-181-HI** en 30 ml de THF + 15ml de AcOH + 5ml de Ac_2O con 15 g de polvo de Zn. A las 4 horas, se filtró la reacción a través de un lecho de Celite®, se lavó la torta de cinc con EtOAc. Se lavó el filtrado sucesivamente con agua, NaHCO_3 sat. y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Mg_2Si_4 , se evaporó y se sometió a cromatografía ultrarrápida con CH_2Cl_2 :MeOH 20:1 para proporcionar 1,2 g (79 %) de **126E-188-HI** como un sólido vidrioso. R_f (20:1 CH_2Cl_2 :MeOH) = 0,2; $[\alpha]_D^{25} = +72,38$ (c 1,37 en CHCl_3); RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl) δ = 7,52-7,57 (m, 2H, Ph), 7,30-7,40 (m, 3H, Ph), 5,96 (d, 1H, J = 9,27 Hz, NH), 5,56 (s, 1H, PhCH), 5,38 (m, 1H, H-4"), 5,20 (dd, 1H, J = 7,88, 10,66 Hz, H-2"), 4,99 (m, 2H, H-1', H-3"), 4,77 (d, 1H, J = 7,88 Hz, H-1"), 4,67 (m, 1H, H-2'), 3,72-4,30 (m, 8H, H-2', H-3', H-6', H-6", H-5', H-5"), 3,65 (m, 24H, PEG), 3,44 (t, 2H, J = 6,49 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), 2,86 (t, 2H, J = 7,42 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), 2,32 (s, 3H, NHAc), 2,15 (s, 3H, SAc), 2,057, 2,04, 1,98, 1,97 (s, 12H, 4xAc), 1,59 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$), 1,42 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAc}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) δ = 170,27, 170,12, 169,53, 169,36, 137,74, 128,71, 128,10, 128,06, 126,762, 126,21, 126,06, 101,40, 100,59, 98,57, 75,70, 74,52, 71,05, 70,85, 70,74, 70,54, 70,52, 70,36, 70,06, 69,99, 69,27, 68,81, 67,23, 66,96, 63,13, 61,25, 18,12, 30,60, 29,32, 29,08, 28,98, 25,33, 23,39, 20,68, 20,53. FAB EM m/z: 1048,2 (MH⁺). Anal. Calc. para $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{NO}_{22}\text{S}$: C, 55,00; H, 7,02; N, 1,34; O, 33,58; S, 3,06. Hallado: C 54,57; H 7,06; N 1,43

126E-190-HI

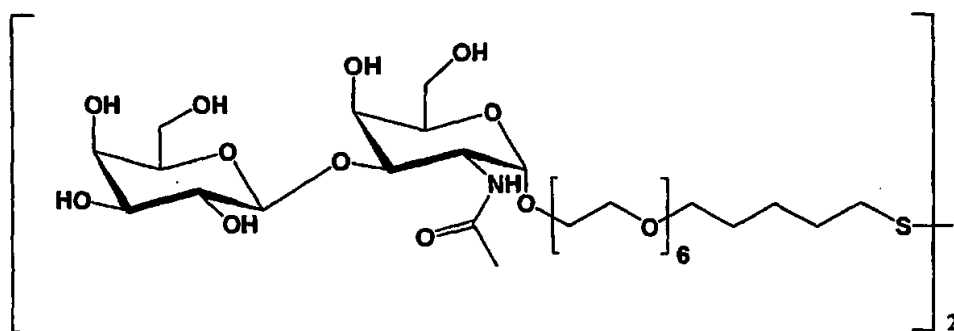


Se trató una solución de 1,2 g (1,14 mmol) de **126E-188-HI** en 20 ml de MeOH seco con unas pocas gotas de AcCl durante 1,5 horas, se inactivó con piridina, se evaporó y se purificó por FCC con 20:1 -> 10:1 de CH_2Cl_2 :MeOH para proporcionar 700 mg (65 %) de **126E-190-HI** como un sólido vidrioso. R_f (10:1 CH_2Cl_2 :MeOH)= ; $[\alpha]_D^{25} = +47,57$ (c 0,60

en MeOH); RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl) δ = 5,90 (d, 1H, J = 9,74 Hz, NH), 5,37 (m, 1H, H-4"), 5,20 (dd, 1H, J = 7,88, 10,66 Hz, H-2"), 5,00 (m, 1H, H-3"), 4,86 (d, 1H, J = 3,71 Hz, H-1'), 4,66 (d, J = 8,34 Hz, H-1"), 4,57 (m, 1H, H-2'), 3,76-4,22 (m, 7H, H-3', H-6', H-6", H-5', H-5"), 3,54-3,72 (m, 24H, PEG), 3,45 (t, 2H, J = 6,49 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,86 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,32 (s, 3H, NHAc), 2,16 (s, 3H, SAC), 2,08, 2,06, 1,99, 1,98 (s, 12H, 4xAc), 1,59 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 1,42 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) δ = 195,90, 170,36, 170,17, 170,06, 169,59, 169,35, 101,63, 98,15, 78,10, 71,04, 70,77, 70,64, 70,56, 70,53, 70,48, 70,44, 70,20, 70,04, 69,97, 69,81, 69,10, 68,58, 67,05, 66,94, 62,51, 61,28, 47,81, 30,59, 29,31, 29,05, 28,96, 25,32, 23,30, 20,64, 20,60, 20,57, 20,50. FAB EM m/z : 961,4 (MH^+). Anal: Calc. para $\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{NO}_{22}\text{S}$: C, 51,29; H, 7,24; N, 1,46; Hallado: C 50,47; H 6,91; N 1,55.

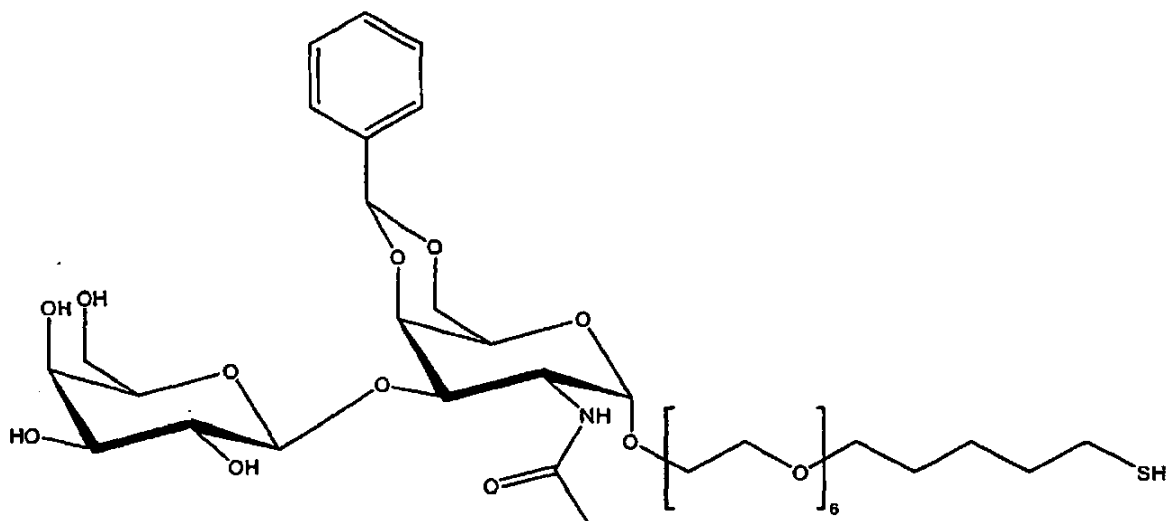
126F-004

Se trató una solución de 500 mg de **126E-190-HI** (0,52 mmol) en 20 ml de MeOH seco con 7 gotas de un 25 % p/v de NaOMe/MeOH y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se inactivó la reacción con resina de intercambio de iones Amberlite[®]-120, se filtró y se evaporó. Se purificó limpiamente con un 20 % de MeOH en CH_2Cl_2 para dar 350 mg (90 %) de **126F-004** como un sólido vidrioso (después de liofilización). R_f (20 % MeOH en CH_2Cl_2) = 0,20; $[\alpha]_D^{20}$ = +24,36 (c 0,24 en MeOH); RMN en ^1H (400 MHz, D_2O) δ = 4,80 (d, 1H, J = 3,71 Hz, H-1'), 4,35 (d, 1H, J = 7,88 Hz, H-1"), 4,24 (dd, 1H, J = 3,71, 10,66 Hz, H-2'), 4,12 (m, 1H, H-4"), 3,94 (dd, 1H, J = 2,78, 11,13 Hz, H-3"), 3,48-3,90 (m, 33H, 24H PEG, NH, H-3', H-4', H-5', H-5", H-6', H-6"), 3,43 (m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, H-2"); 2,44 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,91 (s, 3H, NHAc), 1,50 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,33 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ = 174,44, 101,75, 97,42, 97,330, 77,25, 74,92, 72,51, 70,87, 70,71, 70,57, 69,57, 69,11, 68,78, 68,69, 68,59, 68,48, 66,40, 61,16, 60,91, 48,45, 32,75, 27,98, 24,02, 23,66, 22,06, 22,04; FAB EM m/z : 750,3 (MH^+), 788,3 ($\text{M}+\text{K}^+$). Anal: Calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{59}\text{NO}_{17}\text{S}$: C, 49,65; H, 7,93; N, 1,87. Hallado: C 49,28; H 7,86; N 1,82.

126F-062

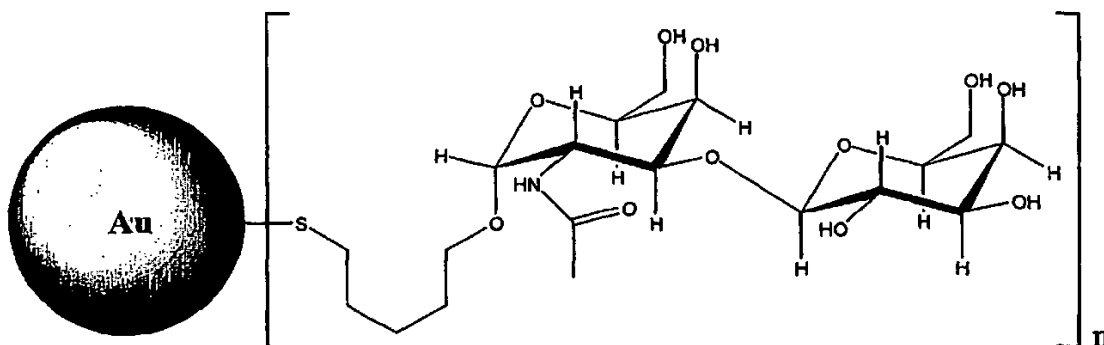
El tiol **126F-004** se dimerizó en almacenamiento en disulfuro **126F-062** que se separó del tiol por FCC con un 20 → 30 % de MeOH en CH_2Cl_2 . R_f = 0,15 (30 % MeOH en CH_2Cl_2 ; RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ = 4,80 (d, J = 3,81 Hz, H-1'), 4,34 (d, J = 7,61 Hz, H-1"), 4,24 (m, 1H, H-2'), 4,12 (m, 1H, H-4"), 3,94 (dd, 1H, J_{34} = 2,93, J_{23} = 11,12 Hz, H-3"), 3,48-3,90 (m, 33H, 24H PEG, NH, H-3', H-4', H-5', H-5", H-6', H-6"), 3,43 (m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, H-2"); 2,66 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,91 (s, 3H, NHAc), 1,62 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,51 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 1,34 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ = 174,41, 104,71, 97,43, 97,31, 77,33, 77,27, 74,90, 72,51, 70,81, 70,69, 70,56, 69,61, 69,22, 68,78, 68,67, 68,58, 68,48, 66,39, 61,14, 60,89, 48,44, 38,19, 28,23, 24,23, 22,06, 22,04; FAB EM m/z : xxxxx.x (MH^+). Anal: Calc. para $\text{C}_{62}\text{H}_{116}\text{N}_2\text{O}_{34}\text{S}_2$: C, 49,72; H, 7,81; N, 1,87; Hallado: C xx.xx; H x.xx; N xx.xx.

126F-005



Se desbencilidenó el compuesto **126F-005** adicionalmente como se describe para **126E-190-HI** para dar **126F-004** adicional.

5 Preparación de transferencia de fase de nanopartículas de oro encapsulado de TF (TF-AuNP)



Se combinó una solución de HAuCl_4 (0,015 mmol) en 1 ml de H_2O con una solución bromuro de tetraoctilamonio (0,035 mmol) en 1 ml de tolueno. Se agitó enérgicamente la mezcla bifásica hasta que se transfirió todo el HAuCl_4 a la capa de tolueno (color naranja). Se separó la capa orgánica. Se disolvió el borohidruro de sodio (2 mg, 0,053 mmol) en la solución recién preparada de **126B-177** (12,8 mg, 0,013 mmol) en 1 ml de MeOH. La proporción de ligando con respecto a oro fue de 1,76:1. Se añadió gota a gota la solución de ligando a la solución de tolueno de HAuCl_4 con agitación enérgica. Esto condujo a una formación inmediata de un precipitado marrón oscuro. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se aislaron las nanopartículas por unas pocas tandas de decantación/centrifugación en metanol. Se sometió la solución de nanopartículas en agua a SEC en columna de P-4 BioGel® (límites de exclusión) para retirar las trazas de impurezas de PM bajo. Este procedimiento dio coherentemente nanopartículas de pureza alta, a juzgar por la ausencia de algún pico agudo en el espectro de RMN. En contraste, la separación por filtración centrífuga en Centriplus® YM-30 (MWCO 30.000) siempre condujo a pequeñas impurezas de glicerol que se usa por Millipore, Inc. como humectante de las membranas de filtro. Se separaron las nanopartículas liofilizadas como un polvo oscuro que será fácilmente soluble en agua para dar un color púrpura intenso ($\lambda_{\text{máx}} = 522$ nm). Las soluciones congeladas diluidas no retuvieron la coloración púrpura pero una vez fundido el color, el espectro de RMN de las nanopartículas en D_2O corresponde estrechamente a las posiciones de los grupos funcionales del ligando (**figura 1**). IR (polvo) cm^{-1} 3298,64, 2925,48, 2854,13, 1711,51, 1619,91.

Preparación "acuosa" alternativa de TF-AuNP (Otsuka H, Akiyama Y, Nagasaki Y, Kataoka K, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (34): 8226-8230 29 AG. 2001)

Se añadió una solución de un 1 % de HAuCl_4 (1,9 ml, 0,046 mmol en Au^{3+}) a 200 ml de H_2O desgasificado. A esta solución se le añadieron 10 mg (0,010 mmol) de TF-S-S-TF (0,020 mmol por tiol). Se añadió gota a gota una solución enfriada (0 °C) de 20 mg (0,53 mmol) en 25 ml de H_2O a la solución de reacción con agitación rápida. Se agitó la

solución coloreada resultante durante una hora adicional, se purificó en un dispositivo centrífugo Centriplus® YM-30 de Millipore y se secó por congelación. Proporción de reactivos: TFSH: Au = 1:2,3

Preparación "acuosa" alternativa de TF-HEXPEG-AuNP {Otsuka, Akiyama, et al. 2001 324 /id}

5 Se trató lentamente una solución de 15 mg (0,02 mmol) de **126F-004** en 1,9 ml (1 %) de HAuCl_4 y 200 ml de agua destilada desgasificada (Sigma) a 0 °C con una solución de 20 mg de NaBH_4 en 25 ml agua enfriada con hielo. Se agitó durante una noche la solución de color rojo vino resultante, se purificó en un dispositivo centrífugo Centriplus® YM-30 de Millipore y se secó por congelación. Proporción de reactivos: 126F-004: Au^{3+} = 1:2,3. Véase la tabla I, "National Cancer Institute".

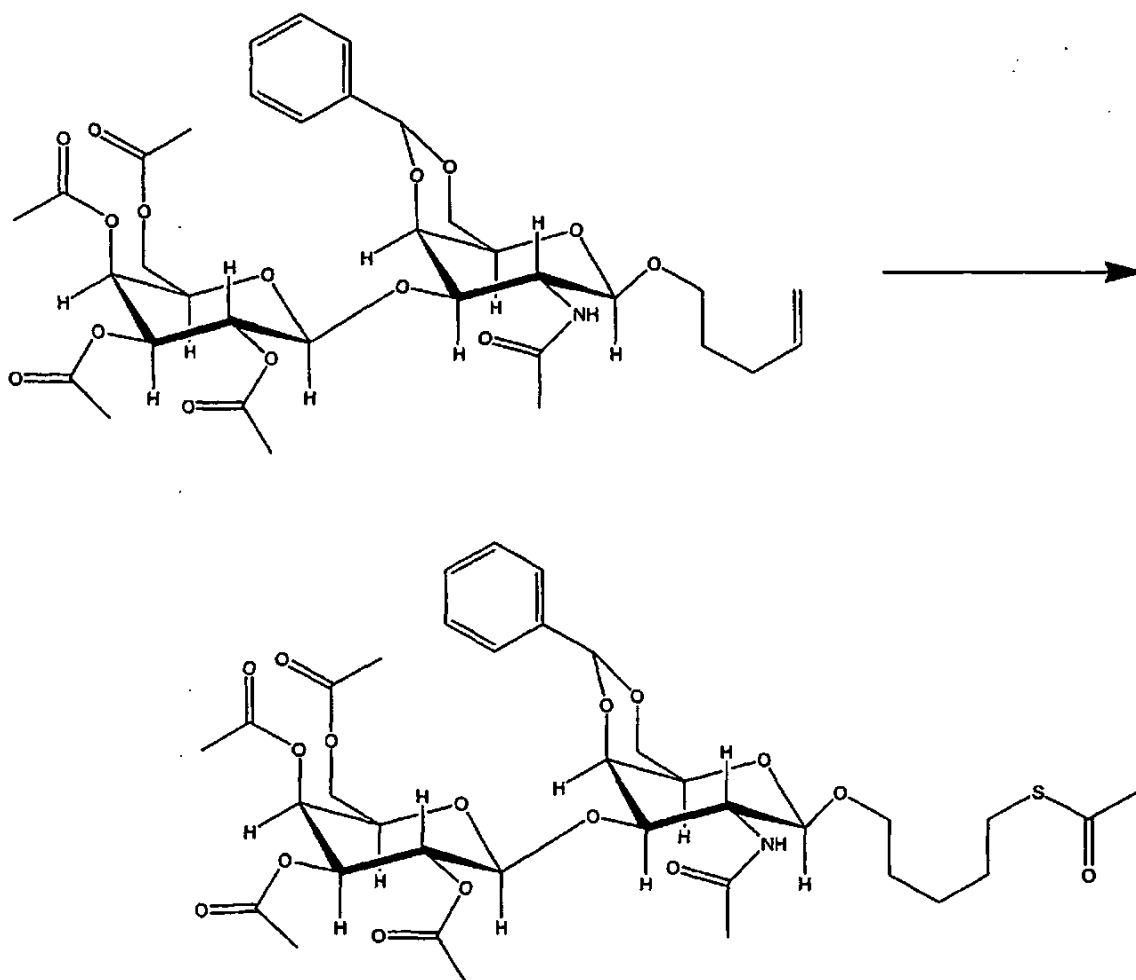
10 **Preparación "acuosa" alternativa de TF-HEXPEG-AuNP por medio de disulfuro {Otsuka, Akiyama, et al. 2001 324 /id}**

Se añadió una solución de 16 mg (0,021 mmol por ligando) de 126F-062 en 1,8 ml de un 1 % de HAuCl_4 a 200 ml de agua destilada desgasificada enfriada con hielo (Sigma). Después, se trató lentamente la solución con 20 mg/25 ml de NaBH_4 enfriado con hielo en agua. Después de 20 min a 0 °C y 30 min a temperatura ambiente, se purificó la solución de reacción de color rojo vino en un dispositivo centrífugo Centriplus® YM-50 de Millipore y se secó por congelación.

15 Proporción de reactivos TF-HEXPEG-SH: Au^{3+} = 1:2,3.

Preparación de TFB-AuNP

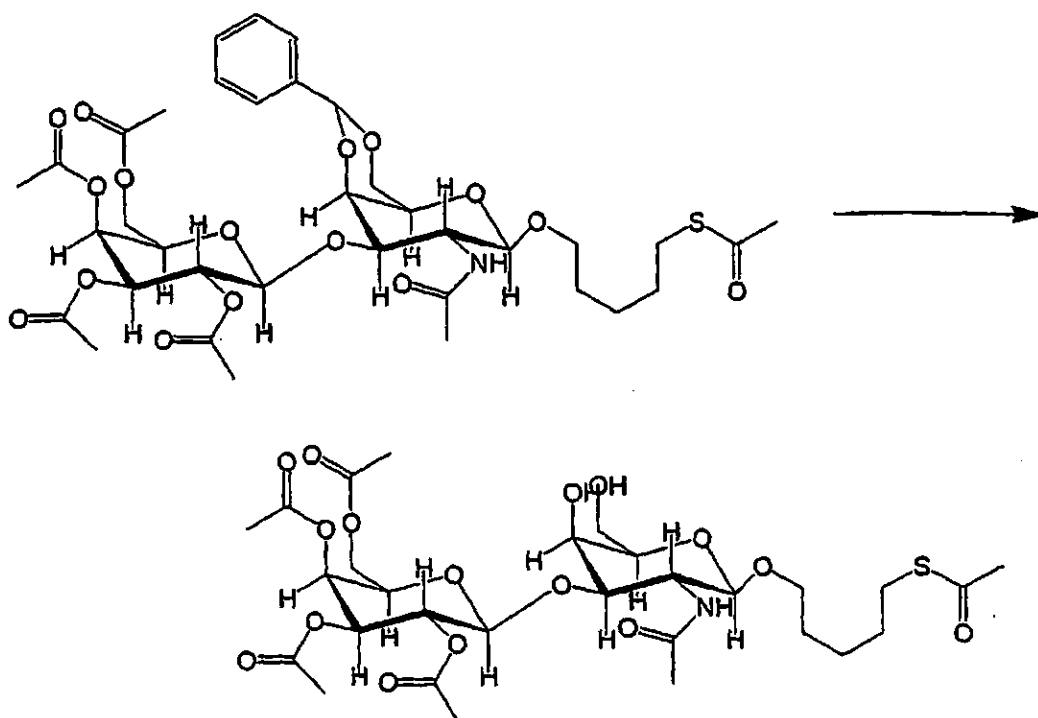
126E-17



20 Se purgó una solución de 660 mg (0,93 mmol) de 126D-14 {Svarovsky y Barchi 2003 281 /id} en 10 ml de 1,4- dioxano anhidro con argón durante 20 min. A esta solución desoxigenada se añadió 1,0 ml (13 mmol, 14 equiv.) de ácido tiolacético doblemente destilado seguido de 200 mg (1,2 mmol) de AIBN. Se dejó que la reacción se agitara bajo

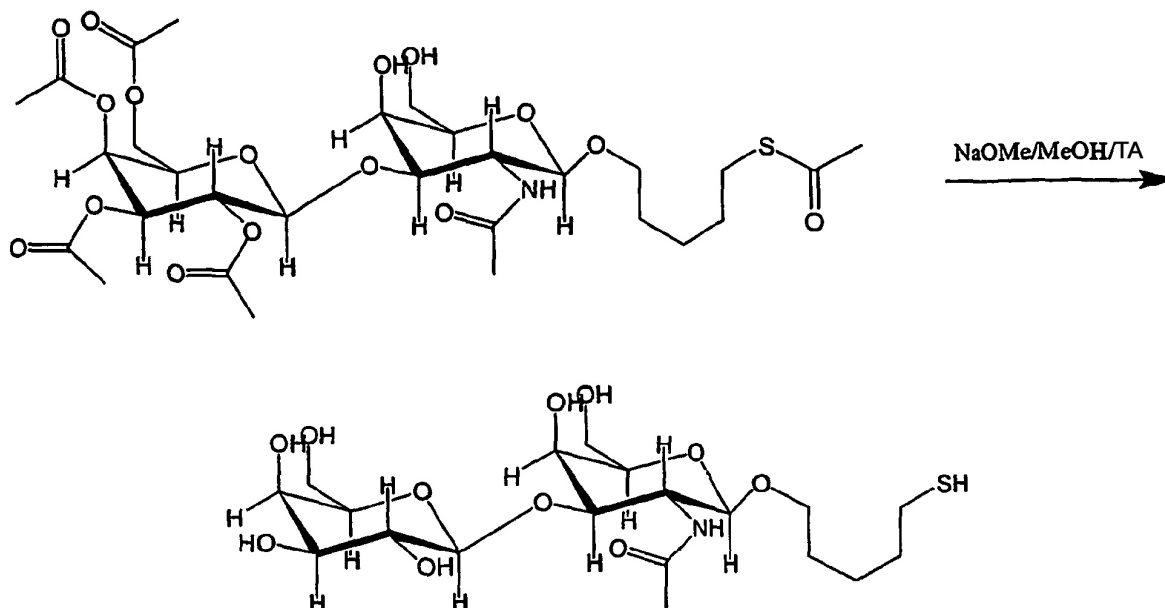
atmósfera de argón a 75 °C durante una noche o hasta que no se pudo detectar ningún material de partida por TLC. Después, se inactivó la reacción con 1 ml ciclohexeno. Se coevaporó la solución con xilenos bajo presión reducida. La FCC sobre gel de sílice con EtOAc/ hexanos 6:1 proporcionó 655 mg (90 %) de un sólido vidrioso. R_f 0,24 (6:1 EtOAc/hexanos); $[\alpha]_D^{25} = +20,02$ (c 2,41 en CHCl_3); IR (puro) 1749,12, 1686,44, 1655,59, 1557,24; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7,47\text{--}7,52$ (m, 2H, Ph), 7,27–7,35 (m, 3H, Ph), 5,93 (d, 1H, $J=6,64\text{Hz}$, NH), 5,51 (s, 1H, PhCH), 5,32 (d, 1H, $J=3,51\text{Hz}$, H"-4), 5,17 (dd, 1H, $J=8,20, 10,15\text{Hz}$, H"-2), 5,07 (d, 1H, $J=8,20\text{Hz}$, H'-1), 4,95 (m, 1H, H"-3), 4,73 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, pH"-1), 4,69 (m, 1H, H'-3), 4,26 (1H, $J=12,49\text{Hz}$, H-6a), 4,25 (m, 1H, H'-4), 4,09 (d, 2H, H-6), 4,01 (d, 1H, $J=12,49\text{Hz}$, H-6b), 3,81–3,90 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$, H"-5), 3,30–3,45 (m, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$, H'-5, H'-2), 2,73–2,86 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,26 (s, 3H, SAC), 2,10 (s, 3H, NHAc), 1,99, 1,98, 1,93, 1,92 (s, 12H, OAc), 1,48–1,60 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 1,32–1,40 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) $\delta = 196,42, 171,25, 170,49, 170,28, 169,32, 138,05, 128,99, 128,27, 126,40, 101,47, 100,85, 99,11, 76,19, 75,77, 71,24, 71,05, 69,63, 69,52, 69,26, 67,30, 66,63, 61,86, 54,81, 30,84, 29,55, 29,20, 29,01, 25,52, 23,92, 21,03, 20,88, 20,74$. FAB EM m/z : 784,1 (MH⁺). Anal. Calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{NO}_{16}\text{S}$: C 55,16; H 6,30; N 1,79. Hallado: C 54,31; H 6,08; N 1,81.

126E-20



Se trató una solución de 600 mg (0,76 mmol) de **126E-17** en 15 ml del metanol con unas pocas gotas de cloruro de acetilo y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se inactivó la reacción con 1 ml de piridina y se concentró. La purificación del producto bruto por FCC con un 5 % a 10 % de MeOH en CH_2Cl_2 proporcionó 510 mg (96 %) de **126E-20** como un sólido vidrioso. R_f 0,60 (10 % MeOH en CH_2Cl_2); $[\alpha]_D^{25} = +9,55$ (c 1,69 en CHCl_3); IR (puro) 3565,74, 3283,21, 1751,05, 1735,62, 1696,09, 1652,70; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 6,05$ (d, 1H, $J=7,03\text{Hz}$, NH), 5,33 (d, 1H, $J=3,12\text{Hz}$, H"-4), 5,13 (m, 1H, H"-2), 4,98 (dd, 1H, $J=3,51, 10,54\text{Hz}$, H"-3), 4,91 (d, 1H, $J=8,59\text{Hz}$, pH'-1), 4,61 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, pH"-1), 4,56 (m, 1H, H'-3), 4,03 (m, 1H, H'-4), 3,82 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 4,14–3,70 (m, 5H, H'-6, H"-6, H-5), 3,57 (m, 1H, H-5), 3,42 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 3,24 (m, 1H, H'-2), 2,86 (s, 1H, 4-OH), 2,78 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 2,58 (s, 1H, 6-OH), 2,27 (s, 3H, SAC), 2,11 (s, 3H, NHAc), 2,02, 2,01, 1,93 (s, 12H, OAc), 1,48–1,58 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$), 1,30–1,40 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SAC}$); RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3Cl) $\delta = 196,55, 171,04, 170,74, 170,33, 170,22, 169,61, 101,43, 99,35, 78,66, 73,91, 71,20, 70,86, 69,69, 68,93, 68,43, 67,20, 62,61, 61,78, 54,69, 30,84, 29,50, 29,15, 29,01, 25,44, 23,87, 20,95, 20,82, 20,78, 20,72$. FAB EM m/z : 696,1 (MH⁺). Anal. Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{NO}_{16}\text{S}$: C 50,06; H 6,52; N 2,01; Hallado: C 49,41; H 6,52; N 2,04.

126E-23



Se trató una solución de 300 mg (0,43 mmol) de **126E-20** en 5 ml de MeOH con 5 gotas de un 25 % (p/v) de NaOMe/MeOH. Se agitó la reacción a ta durante 10 minutos. Se neutralizó cuidadosamente la reacción con Amberlite®-120 fuertemente ácido, y se evaporó bajo presión reducida a 50 °C para dar 200 mg (96 %) de **126E-23** contaminado por una cantidad pequeña de disulfuro dimérico. Se purificó el producto bruto por RPFC con un 10 % → 40 % (v/v) de MeOH/H₂O para dar 187 mg (90 %) de **126B-23** puro como polvo blanco. El compuesto era soluble en agua y moderadamente soluble en metanol y cloroformo. *R_f* 0,10 (20 % MeOH-CH₂Cl₂); [α]_D = -6,48 (c 0,50 En MeOH); IR (puro) 3274,54, 1617,02, 1563,99; RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ = 4,37 (d, 1H, J = 8,59 Hz, β H-1"), 4,31 (d, 1H, J = 7,42 Hz, β H-1'), 4,04 (d, 1H, J = 2,73 Hz, NH), 3,36-3,90 (m, 14H, H-2", 2xH-6', 2xH-6", H-3', H-3", H-4', H-4", H-5', H-5", -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH, H-2'), 2,41 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,89 (s, 3H, NHAc), 1,39-1,53 (m, 4H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH), 1,23-1,32 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂SH); RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃Cl δ = 174,82, 105,01, 101,51, 80,18, 80,03, 75,23, 75,08, 74,98, 74,83, 72,71, 72,57, 70,83, 70,53, 70,37, 70,21, 68,84, 68,67, 68,28, 68,15, 61,25, 61,18, 61,09, 51,43, 32,77, 28,20, 24,09, 23,86, 22,53, 22,44. FAB EM *m/z*: 486,0 (MH⁺), 508,1 (M+Na⁺). Anal. Calc. para C₁₉H₃₅NO₁₁S: C, 47,00; H, 7,27; N, 2,88; Hallado: C 44,09; H 7,14; N 2,76.

Experimentos en ratones de inmunoterapia *in vivo* y resultados

Efecto anti-tumor *in vivo* de JAA-F11

Para investigar el efecto anti-tumor del anticuerpo JAA-F11 *in vivo*, se usó el modelo de cáncer de mama en ratones 4T1. La línea de tumor 4T1 tiene varias características que la hacen un modelo animal experimental adecuado para cáncer mamario humano. En primer lugar, las células de tumor 4T1 son Ag-T, positivas, fácilmente trasplantadas a la glándula mamaria de modo que el tumor primario puede crecer *in situ*, y las metástasis se desarrollan fácilmente. El tumor primario se puede retirar quirúrgicamente, de modo que la enfermedad metastásica se puede estudiar en un modelo animal, comparable con la situación clínica en la que el tumor de mama primario se retira quirúrgicamente y los focos metastásicos permanecen intactos (Pulaski et al, 1998, Pulaski et al, 2000, Aslakson et al, 1992).

Mantenimiento y recogida de células de tumor 4T1 *in vitro*

Se cultivaron células de tumor 4T1 en un matraz de cultivo ventilado de poliestireno de 250 ml con medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2mM, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 4,5 g/l de glucosa, HEPES 10mM y piruvato de sodio 1,0 mM (90 %) más un 10 % de FBS. Se incubaron los matraces de cultivo en un incubador de cultivo de tejidos a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Se dividieron los cultivos de 2 a 3 veces por semana y no se hicieron crecer *in vitro* más de un mes antes de la implantación. No se dejó que las células excedieran de un 50 % a un 80 % de confluencia ya que el crecimiento excesivo disminuirá la viabilidad de las células. Cuando se recogieron las células, se desechó el medio de cultivo. Se añadieron cinco ml de PBS estéril para lavar el matraz y se desecharon. Se añadieron cinco ml de solución de tripsina (Tripsina-0,25 %, EDTA-0,1 %) para cubrir el lado del matraz y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Se añadieron veinticinco ml del para recoger las células tripsinizadas del matraz y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml.

Se centrifugó el tubo con las células recogidas 10 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de células en 10 ml de medio. Se usó una jeringuilla de 30 cm³ con una aguja de 18 G para separar células

4T1 en la suspensión de células individuales. Se determinó la concentración de células viables usando un hemacitómetro. Se diluyeron las células con el mismo medio hasta la concentración deseada para inyección.

Experimentos *in vivo*

- 5 De acuerdo con estudios anteriormente publicados (Pulaski et al, 1998, Pulaski et al, 2000, Aslakson et al, 1992), se seleccionaron 1×10^4 células de tumor viables por ratón para asegurar que la incidencia de tumor fuera del 100 % pero la carga de tumor no será demasiado grande para el tratamiento de AB.

Inyección a ratones con células de tumor 4T1 y Ag-T oro o PBS

- 10 Se inocularon por vía subcutánea cien microlitros de 10^5 células viables/ml de suspensión de células 4T1 en la glándula mamaria abdominal derecha de ratones BALB/c hembra de ocho semanas. Tres días después de implantar las células de tumor 4T1, se dividieron veinticinco ratones aleatoriamente en dos grupos, y recibieron una administración intraperitoneal de Ag-T oro (5 ratones) ($5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{ratón}$) como tratamiento o bien PBS (20 ratones) como control dos veces a la semana. En el decimocuarto día después de implantar el tumor 4T1, se retiraron quirúrgicamente los tumores de mama primarios.

Medida del resultado del tumor

- 15 Se midieron los pesos de los ratones y se compararon las tasas de pérdida del peso entre los ratones tratados y los de control. Se monitorizaron los síntomas clínicos, tales como falta de acicalamiento, pelaje áspero, respiración rápida y con dificultad, y pérdida de movilidad y se registraron y se usaron como indicadores de morbilidad. Se sacrificaron los ratones cuando el diámetro de tumor alcanzó 14 mm o la pérdida de peso alcanzó un 20 % o cuando se produjo una morbilidad significativa. Se realizaron observaciones diarias tanto por los investigadores como por los cuidadores de
20 animales. Se registró el tiempo de supervivencia y se analizó con la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (MedCalc). Se recogieron los órganos de interés (tumor primario, pulmón, hígado, bazo, ganglios linfáticos y cerebro) y se fijaron usando fijador Z. Se contó el número de metástasis manifiestamente evidentes en los pulmones. Se analizó la diferencia en el número de metástasis por análisis de Chi-cuadrado usando la versión 7.2 del programa informático MedCalc. Se prepararon secciones de parafina para la tinción inmunohistoquímica para los análisis histológicos de
25 presencia de metástasis.

Análisis de resultados

El tiempo de supervivencia medio de los grupos de PBS y Ag-T fue de 57 y 70 días respectivamente. La diferencia no fue significativa ($p > 0,05$) de acuerdo con los resultados la curva de de Kaplan-Meier. Esto se repite con un mayor número de animales.

- 30 Se recogieron los órganos de interés, tales como tumor primario, pulmón, hígado, cerebro, bazo. Se hallaron lesiones metastásicas en ganglios linfáticos, costillas, pericardio y pulmones en ratones de ambos grupos. Se clasificaron los niveles de metástasis en pulmones en cuatro grupos después de contar el número de lesiones metastásicas manifiestamente visibles en los pulmones, como se muestra en las figuras. Los ratones con tratamiento de Ag TF presentaron menos metástasis en los pulmones en comparación con los de control de PBS. Se examinaron dos grupos
35 de los pulmones del grupo de ag-T oro que fueron manifiestamente negativos para metástasis de tumor para determinar micrometástasis por un anatomopatólogo en un estudio ciego con varios pulmones con lesiones metastásicas. De los dos ratones en el grupo de control de PBS, "no se observó metástasis", uno presentó nódulos de tumor histológicamente evidentes, mientras que el otro no.

- 40 Estos resultados indican que las nanopartículas de oro se recubrieron con un antígeno de carbohidrato asociado a tumor específico; uno que está presente en un 90 % de los carcinomas humanos en el sistema inmunitario durante el crecimiento y la progresión de tumor. El antígeno TF es una glicoproteína O-enlazada es ideal para estudiar las interacciones que se pueden producir *in vivo* cuando una célula de tumor metastatiza. Se investigó una línea celular modelo de cáncer de mama, 4T1, usando las nanopartículas de oro conjugado con antígeno TF. Sin restringirse por una teoría particular de funcionamiento, parece que la línea celular 4T1 metastatiza a través de interacciones con el
45 disacárido TF que se usó para preparar los conjugados de nanopartículas de oro. Además, parece que el disacárido de antígeno TF está implicado en una interacción carbohidrato-proteína específica que ayuda en la colonización del pulmón de las células de cáncer de mama 4T1. En primer lugar, se implantaron tumores en ratones y después se dejó que crecieran. El tratamiento con conjugados de nanopartículas comenzó el tercer día después de la implantación. Cuando se pudieron palpar los tumores primarios, se retiraron quirúrgicamente y se continuó tratando a los ratones
50 con los conjugados de nanopartículas. Los conjugados de nanopartículas de oro antígeno TF inhibieron la metástasis del sitio metastásico en los pulmones. Sin restringirse por una teoría particular de funcionamiento, Ab a Ag TF aparentemente puede incrementar o bien disminuir la tasa de proliferación, como pueden las lectinas que se unen a Ag TF. Aparentemente, la adición de una partícula de oro que contiene antígeno TF puede interferir con un proceso implicado en la replicación de la célula de tumor, además poder inhibir la adhesión. Además, los conjugados de
55 nanopartículas que contienen oro y antígeno TF también pueden tener utilidad en la elucidación del mecanismo de antígeno TF y replicación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de conjugados antígeno-nanopartícula, que comprende:
proporcionar una nanopartícula; y
conjugar varios antígenos de carbohidrato con la nanopartícula, en el que los antígenos de carbohidrato incluyen antígeno TF.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de antígenos de carbohidrato incluye además antígeno T_n, antígeno Gb1, antígeno GM₁, antígeno GM₃, antígeno de Lewis Y, o cualquier combinación de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que se proporcionan varias nanopartículas, y se conjugan varios antígenos de carbohidrato con al menos una porción de las nanopartículas.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que se conjugan varios antígenos de carbohidrato con cada una de las nanopartículas.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que los antígenos de carbohidrato comprenden un grupo de enlace, y el grupo de enlace se conjuga con la nanopartícula.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la conjugación incluye el autoensamblaje de los antígenos de carbohidrato sobre al menos una superficie de la nanopartícula.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la nanopartícula comprende uno o más grupos de enlace de nanopartícula, y los antígenos de carbohidrato se conjugan con los grupos de enlace de nanopartícula.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que uno o más grupos espaciadores enlazan los antígenos de carbohidrato a la nanopartícula.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el uno o más grupos espaciadores incluyen PEG, una cadena de carbono, una cadena de carbono que incluye azufre, nitrógeno u oxígeno en el esqueleto, incluyendo los polímeros poli(acrilamida), una cadena de péptido compuesta toda de unidades de glicina o alanina, o cualquier combinación de las mismas.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además purificar las nanopartículas.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha purificación incluye filtración, centrifugación, electroforesis, cromatografía, cristalización, o cualquier combinación de las mismas.
12. Un conjugado antígeno-nanopartícula que comprende varios antígenos de carbohidrato conjugados con una nanopartícula, en el que los antígenos incluyen antígeno TF.
13. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12, en el que los antígenos incluyen además antígeno T_n, antígeno Gbl, antígeno GM₁, antígeno GM₃, antígeno Lewis Y, o cualquier combinación de los mismos.
14. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que varios antígenos de carbohidrato son idénticos entre sí.
15. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que al menos una porción de los antígenos de carbohidrato se presenta en el sistema inmunitario en carcinomas humanos durante el crecimiento y la progresión de tumor.
16. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que los antígenos de carbohidrato pueden inducir expresión en la superficie de galectina-3 en células endoteliales.
17. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que al menos uno de varios antígenos de carbohidrato asociados a tumor se conjuga con un grupo espaciador, y el grupo espaciador se conjuga con la nanopartícula.
18. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que el grupo espaciador incluye PEG, una cadena de carbono, una cadena de carbono que incluye azufre, nitrógeno u oxígeno en el esqueleto, un polímero, un péptido, o cualquier combinación de los mismos.
19. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que uno o más antígenos de carbohidrato se conjugan con uno o más grupos de enlace, en los que los grupos de enlace se conjugan con la nanopartícula.
20. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que uno o más antígenos de carbohidrato

que se conjugan con uno o más grupos espaciadores, los grupos espaciadores se conjugan con uno o más grupos de enlace, y el uno o más grupos de enlace se conjugan con la nanopartícula.

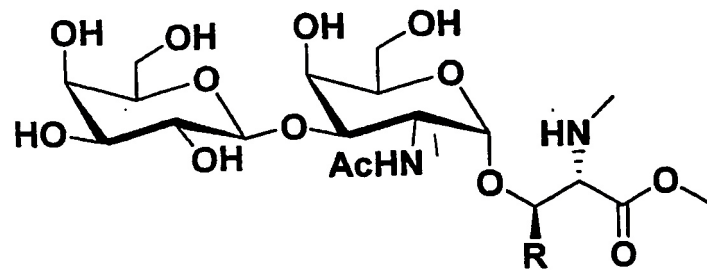
21. El procedimiento de la reivindicación 4 o el conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 19 ó 20, en el que los grupos de enlace incluyen al menos un átomo de azufre, grupo carboxilado, grupo amida, grupo carbamato, grupo carbonato, grupo tiocarbamato, grupo tiocarbonato, grupo tioéter, grupo succinimida, grupo n-hidroxi succinimida, o cualquier combinación de los mismos.
22. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que cada uno de los antígenos de carbohidrato se enlazan covalentemente a uno o más átomos de azufre.
23. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que los antígenos de carbohidrato se enlazan cada uno, individualmente, a uno o más átomos de azufre.
24. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que cada uno de los antígenos de carbohidrato incluyen uno o más aminoácidos.
25. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 22, en el que al menos dos átomos de azufre se enlazan covalentemente entre sí.
26. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 22, en el que al menos uno de los átomos de azufre se une a la nanopartícula.
27. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 26, en el que los enlaces entre los átomos de azufre y la nanopartícula incluyen enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, enlaces de van der Waals, o cualquier combinación de los mismos.
28. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que los antígenos de carbohidrato incluyen un disacárido.
29. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 28, en el que el disacárido comprende al menos un grupo de amino azúcar.
30. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que al menos uno de varios antígenos de carbohidrato es un indicador de pronóstico para cáncer, un marcador de células de carcinoma metastatizadas, una molécula de adhesión implicada en metástasis, o cualquier combinación de los mismos.
31. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que la nanopartícula incluye átomos de oro, átomos de plata, átomos de platino, átomos de rodio, átomos de paladio, o cualquier combinación de los mismos.
32. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 31, en el que la nanopartícula deriva de oro coloidal.
33. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que el conjugado antígeno-nanopartícula tiene un peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 1 millón de Dalton.
34. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que el número de antígenos de carbohidrato conjugados con la nanopartícula está en el intervalo de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 1000.
35. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que la nanopartícula tiene de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 átomos.
36. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 12 ó 13, en el que la nanopartícula tiene una dimensión en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 100 nm.
37. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 36, en el que la nanopartícula tiene una dimensión en el intervalo de desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm.
38. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 36, en el que la nanopartícula tiene una forma esférica, y el diámetro de la nanopartícula está en el intervalo de desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 10 nm.
39. El conjugado antígeno-nanopartícula de la reivindicación 36, en el que la nanopartícula tiene una forma icosaédrica, cúbica, rómbica, hexagonal, o de fullereno.
40. El conjugado antígeno-nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 12-39, para su uso en tratamiento.
41. Uso del conjugado antígeno-nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 12-39, para la fabricación de

un medicamento para inhibir la metástasis de células de carcinoma en un mamífero.

42. El procedimiento de la reivindicación 41, en el que el mamífero es un ser humano.
43. El uso de la reivindicación 42, en el que al humano se le diagnostica cáncer.
44. El uso de la reivindicación 43, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 5 45. El uso de la reivindicación 44, en el que se inhibe la metástasis de células de pulmón.
46. El uso de la reivindicación 41, que comprende además retirar células de tumor de dicho mamífero.
47. El uso de la reivindicación 46, en el que las células de tumor se retiran de dicho mamífero antes de administrar la cantidad terapéuticamente efectiva de los conjugados antígeno-nanopartícula.
- 10 48. El uso de la reivindicación 41, en el que los antígenos de carbohidrato se presentan en el sistema inmunitario en carcinomas humanos durante el crecimiento y la progresión del tumor.
49. El uso de la reivindicación 41, en el que los antígenos de carbohidrato pueden inducir expresión en la superficie de galectina-3 en células endoteliales.
50. El uso de la reivindicación 41, en el que los antígenos de carbohidrato se conjugan con una superficie exterior de dicha nanopartícula.
- 15 51. El uso de la reivindicación 41, en el que al menos uno de los antígenos de carbohidrato asociados a tumor se conjuga, individualmente, con al menos un grupo espaciador, y el al menos un grupo espaciador se conjuga con la nanopartícula.
52. El uso de la reivindicación de 51, en el que el grupo espaciador incluye PEG, una cadena de carbono, una cadena de carbono que incluye azufre, nitrógeno u oxígeno en el esqueleto, un polímero, un péptido, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 53. El uso de la reivindicación 41, en el que uno o más antígenos de carbohidrato se conjuga con un grupo de enlace.
54. El uso de la reivindicación 41, en el que uno o más antígenos de carbohidrato se conjuga, individualmente con un grupo espaciador, y uno o más grupos espaciadores se conjuga a un grupo de enlace.
- 25 55. El uso de la reivindicación 54, en el que el grupo de enlace incluye al menos un átomo de azufre, grupo carboxilado, grupo amida, grupo carbamato, grupo carbonato, grupo tiocarbamato, grupo tiocarbonato, grupo tioéter, grupo succinimida, grupo n-hidroxi succinimida, o cualquier combinación de los mismos.
56. El uso de la reivindicación 41, en el que cada uno de los antígenos de carbohidrato se enlaza covalentemente a uno o más átomos de azufre.
57. El uso de la reivindicación 56, en el que al menos dos de los átomos de azufre se unen entre sí.
- 30 58. El uso de la reivindicación 56, en el que los antígenos de carbohidrato se enlazan cada uno, individualmente, a uno o más átomos de azufre.
59. El uso de la reivindicación 56, en el que al menos uno de los átomos de azufre se une a al menos una de varias nanopartículas usando NaBH_4 .
- 35 60. El uso de la reivindicación 59, en el que los enlaces entre los átomos de azufre y la nanopartícula se caracterizan porque son enlaces covalentes, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, enlaces de van der Waals, o cualquier combinación de los mismos.
61. El uso de la reivindicación 41, en el que los antígenos de carbohidrato es un indicador de pronóstico, un marcador de células de carcinoma metastatizadas, una molécula de adhesión implicada en metástasis, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 62. El uso de la reivindicación 41, en el que al menos una de varias nanopartículas incluye átomos de oro, átomos de plata, átomos de platino, átomos de rodio, átomos de paladio, o cualquier combinación de los mismos.
63. El uso de la reivindicación 62, en el que las nanopartículas incluyen partículas de oro coloidal.
64. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que los pesos moleculares de al menos una porción de los conjugados antígeno-nanopartícula está en el intervalo de desde aproximadamente 1.000 Dalton a
- 45 aproximadamente 1 millón de Dalton.

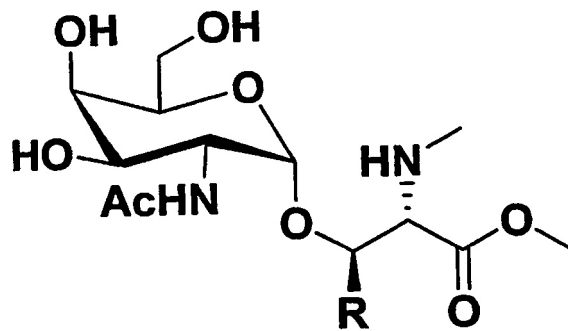
65. El procedimiento de la reivindicación 64, en el que los pesos moleculares de al menos una porción de los conjugados antígeno-nanopartícula está en el intervalo de desde aproximadamente 10.000 Dalton a aproximadamente 500.000 Dalton.
- 5 66. El uso de la reivindicación 41, en el que al menos una porción de los conjugados antígeno-nanopartícula comprende, individualmente, de desde 2 hasta aproximadamente 1000 antígenos de carbohidrato.
67. El uso de la reivindicación 41, en el que al menos una porción de las nanopartículas comprende de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 10.000 átomos.
68. El uso de la reivindicación 44, en el que al menos una porción de las nanopartículas tiene una dimensión en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 100 nm.
- 10 69. El uso de la reivindicación 68, en el que al menos una porción de las nanopartículas tiene una dimensión en el intervalo de desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 10 nm.
70. El uso de la reivindicación 68, en el que al menos una porción de las nanopartículas comprende una forma esferoide, y la dimensión es el diámetro de la nanopartícula.

Figura 1 A



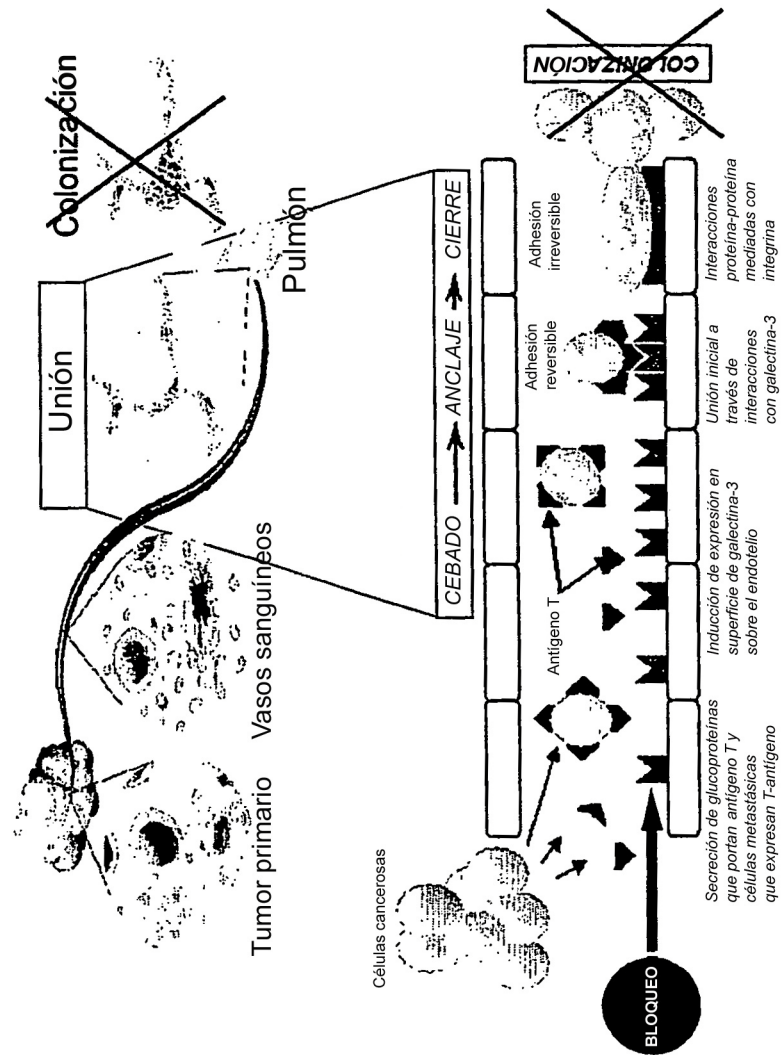
T (Thomsen-Friedenreich)
Gal β 1-3GalNAc α 1-OSer/Thr

Figura 1 B



T_n (T nouvelle)
GalNAc 1-OSer/Thr

FIGURA 2



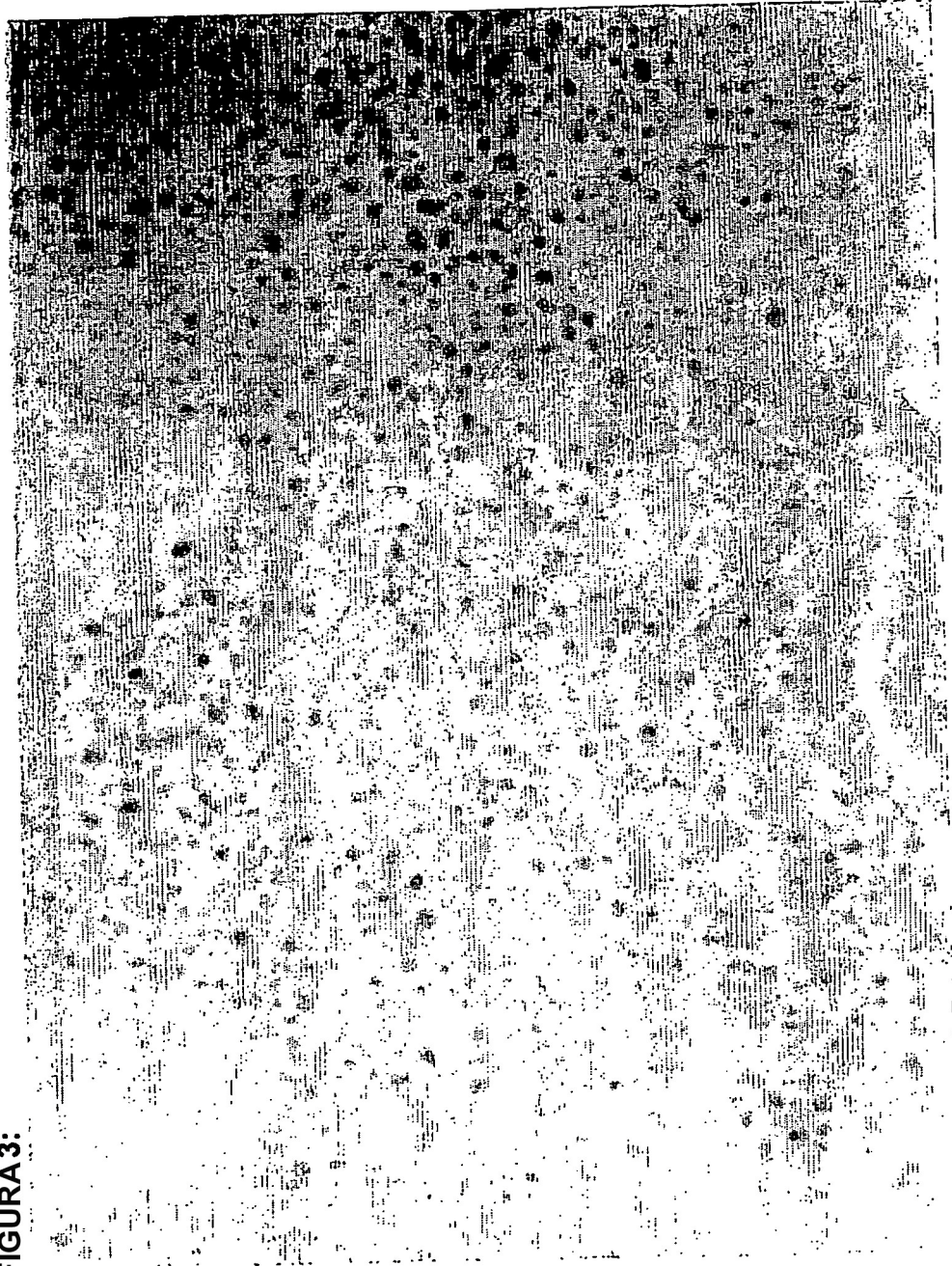
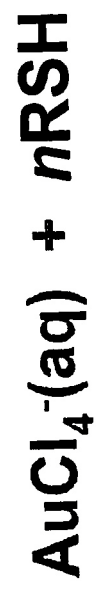


FIGURA 3:

FIGURA: 4
PROCESO ACUOSO



R = biomolécula soluble en agua

Reductor
↑

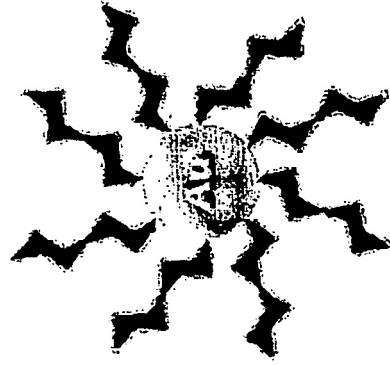
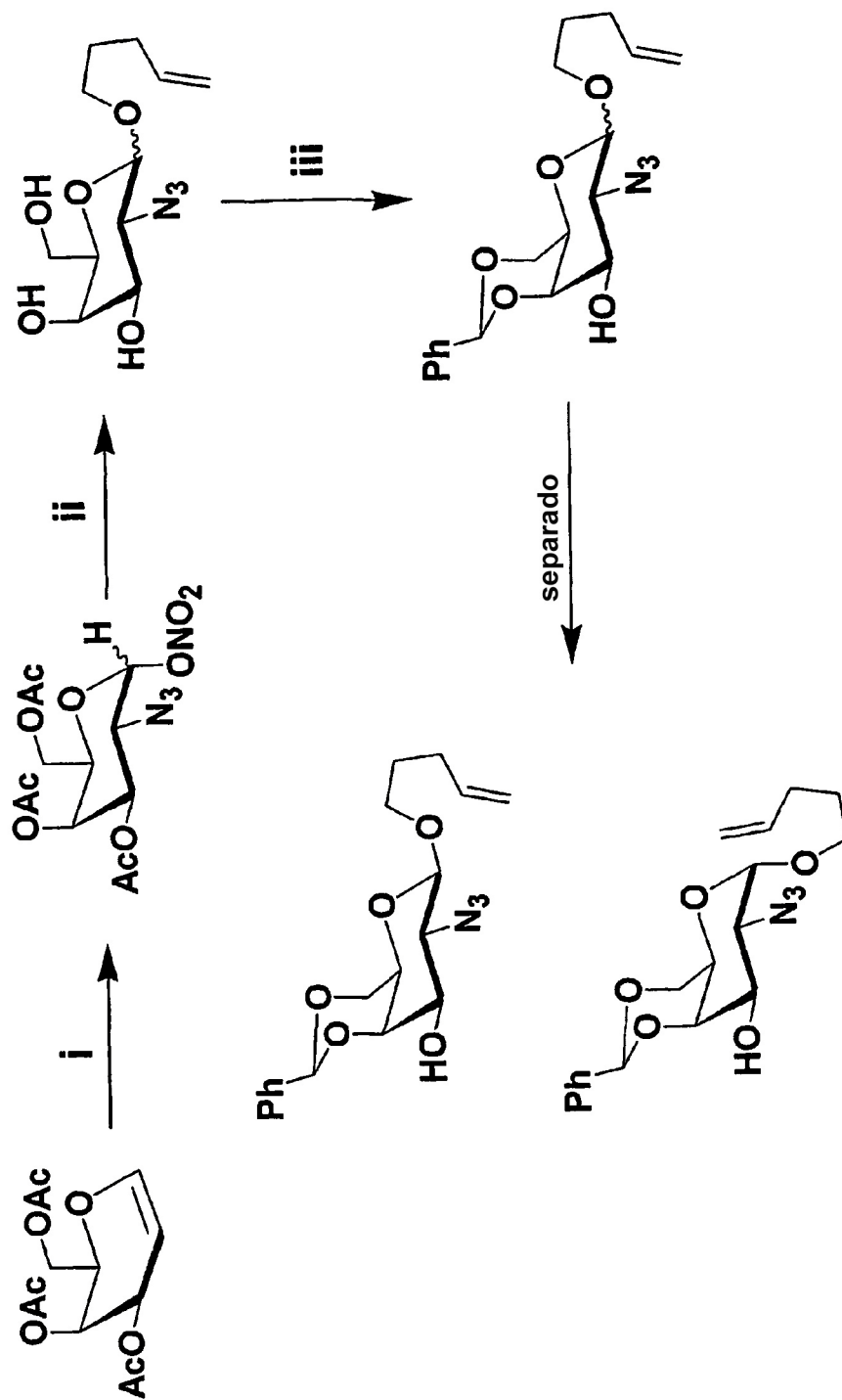


FIGURA: 5

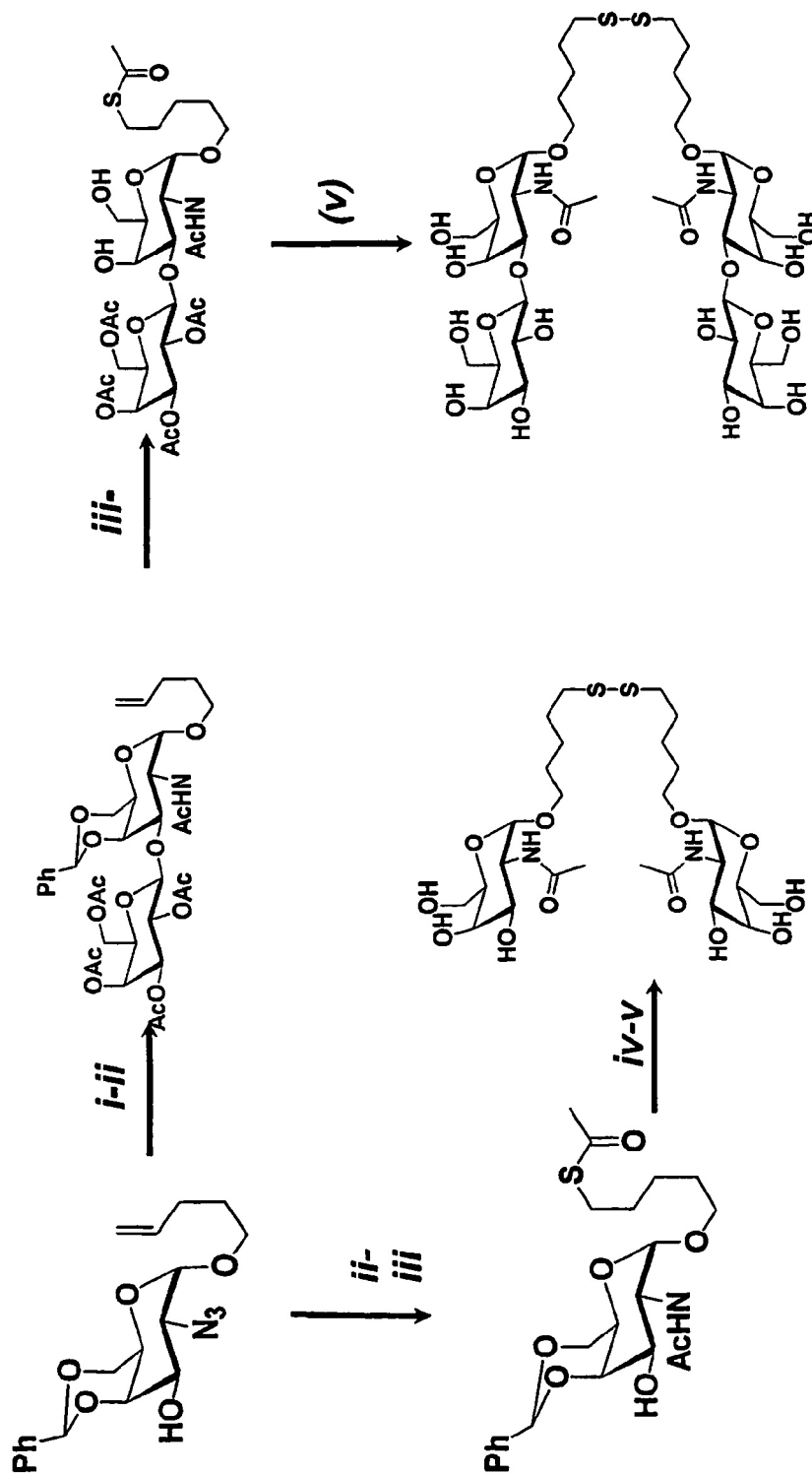
SÍNTESIS DE ANTÍGENO T



Condiciones de reacción: (i) $\text{NaN}_3/\text{CAN}/\text{MeCN}$, 59-65%; (ii) $\text{Na}/\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 99%; (iii) $\text{PhCH}(\text{OMe})_2/\text{PTSA}/\text{MeCN}$, 70%;

FIGURA: 6

GRUPO PENTENILO DERIVATIZADO PARA CONJUGACIÓN



Condiciones de reacción : (i) GaI-TCl, TMSOTf/CH₂Cl₂/MS, 90%; (ii) Zn, AcOH, Ac₂O, THF, 90%;
 (iii) 80% AcOH, 83%; (iv) AcSH/AIBN/1,4-dioxano, cuant.; (v) cat. NaOMe/MeOH, 97%;

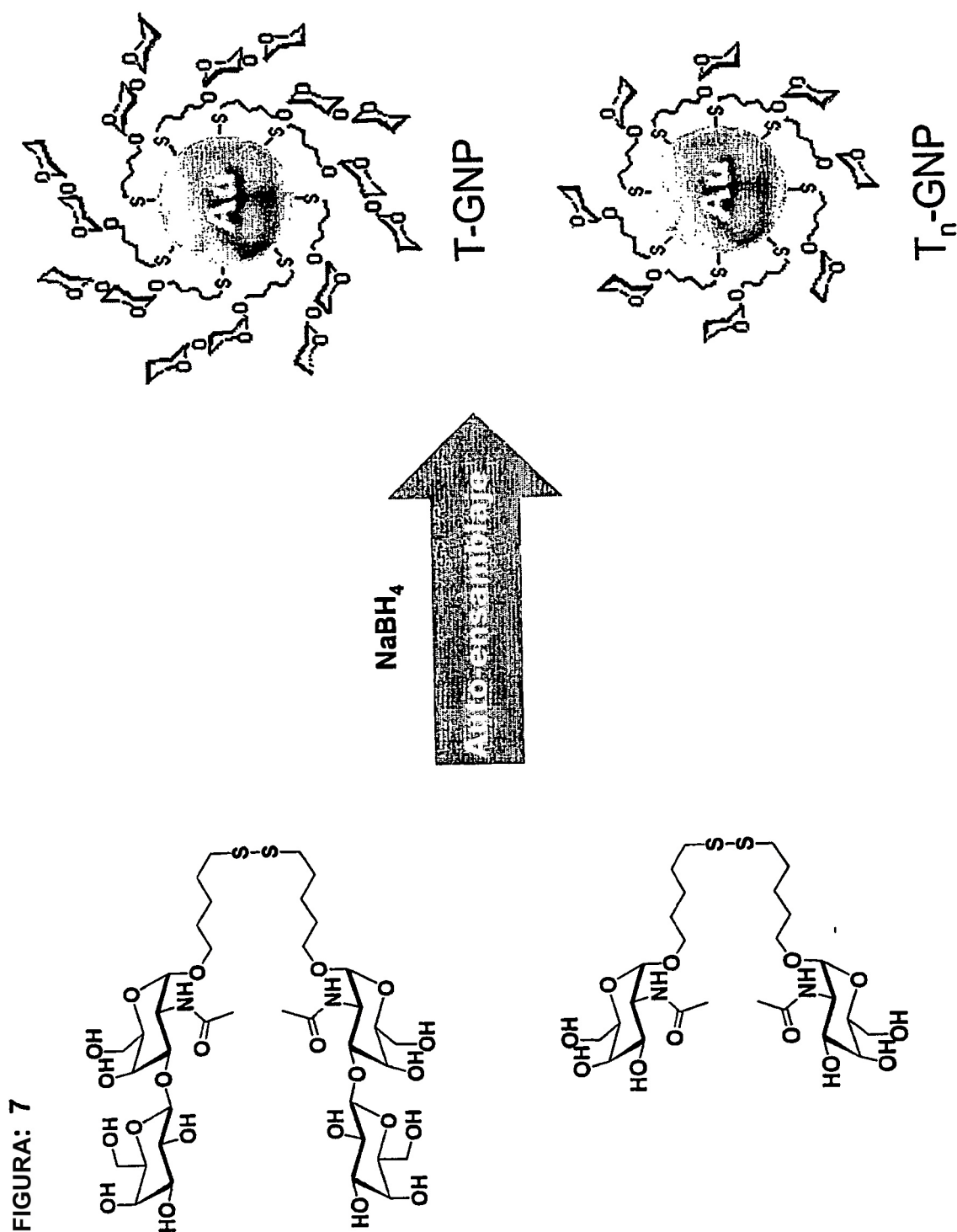


FIGURA: 8
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GNP

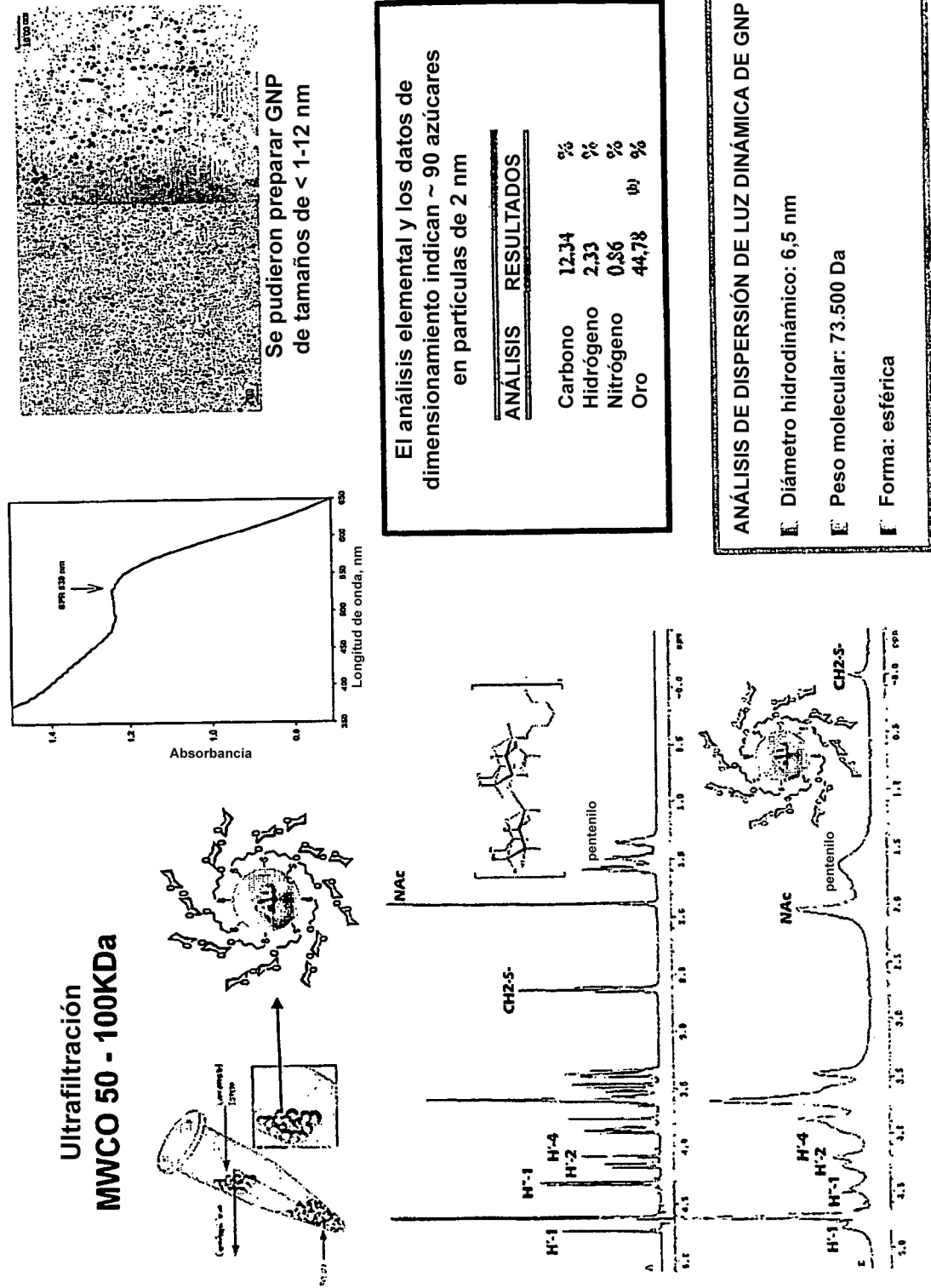
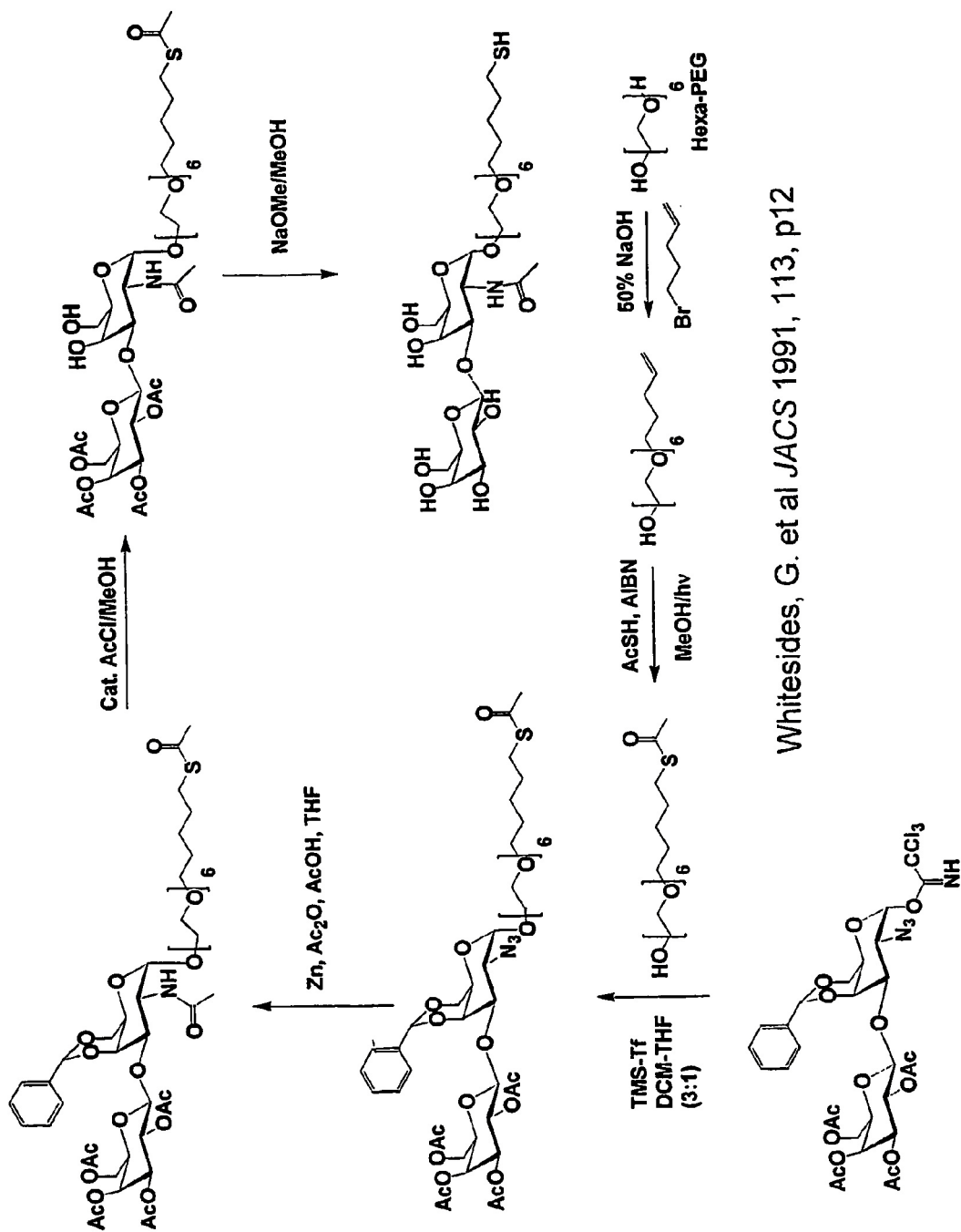


FIGURA: 9
SÍNTESIS DE ANTÍGENO T LIGADO A PEG



Whitesides, G. et al JACS 1991, 113, p12

FIGURA: 10

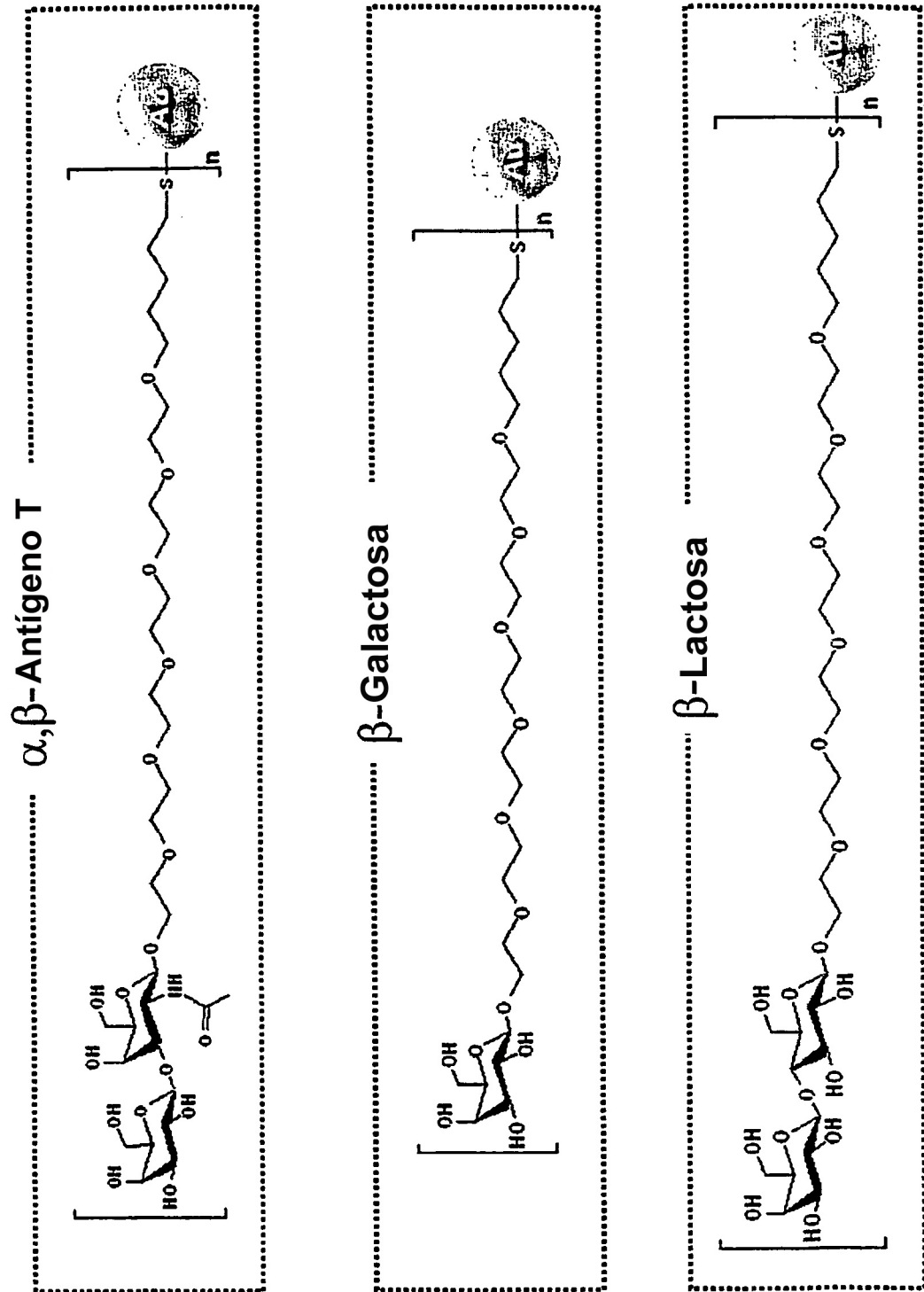


FIGURA: 11

LA FUNCIONALIDAD *IN VITRO* ESTÁ INTACTA

El ensayo de cromatografía de afinidad con lectina muestra estereoespecificidad de interacción ag-T oro - aglutinina del cacahuete

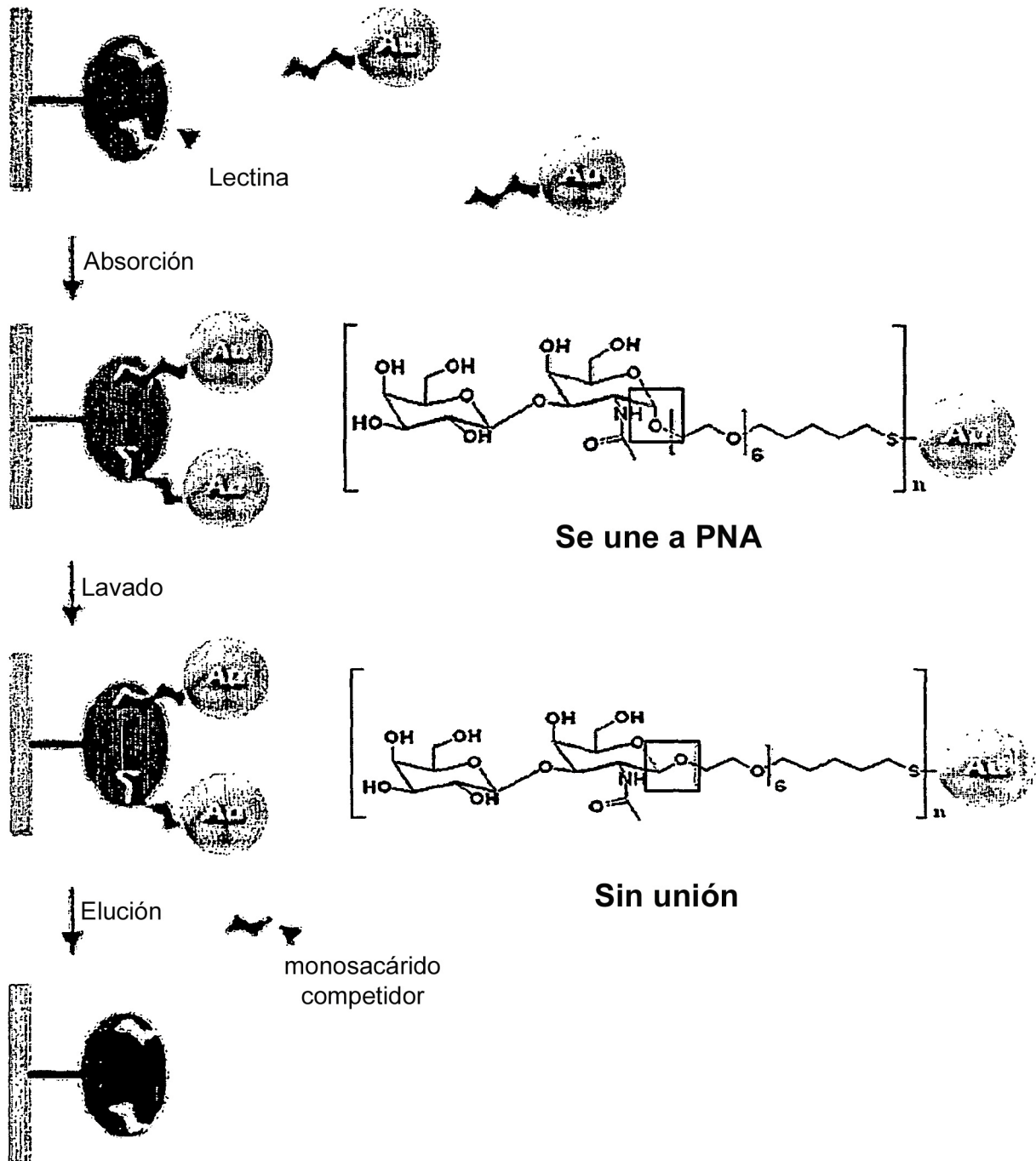


FIGURA: 12
LA BIOFUNCIONALIDAD *IN VITRO* ESTÁ INTACTA
Ensayos de aglutinación de rodamina-lectina
PISUM SATIVUM (PSA) frente a AGLUTININA DEL CACAHUETE (PNA)

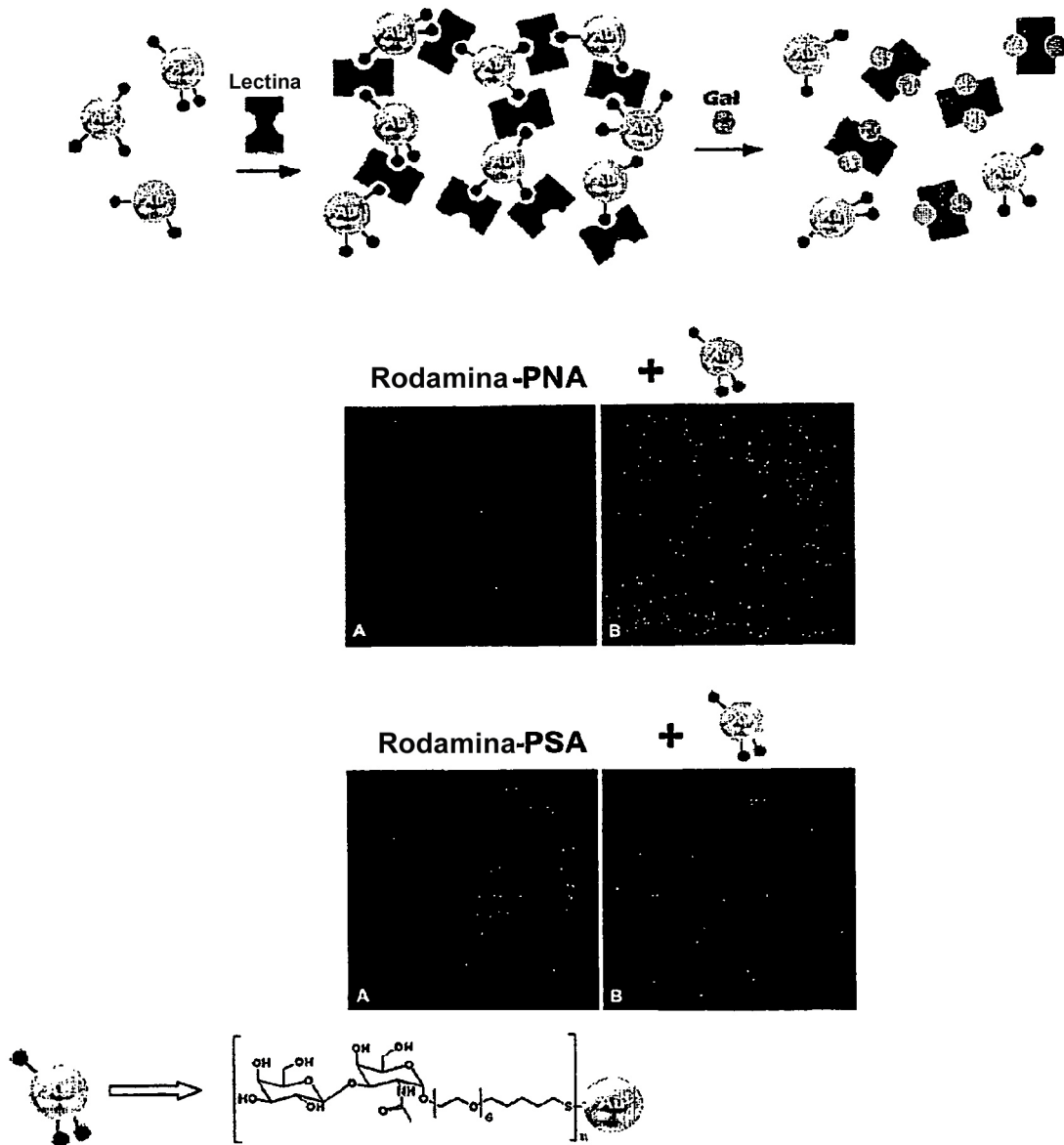


FIGURA: 13

PBS – Pulmones

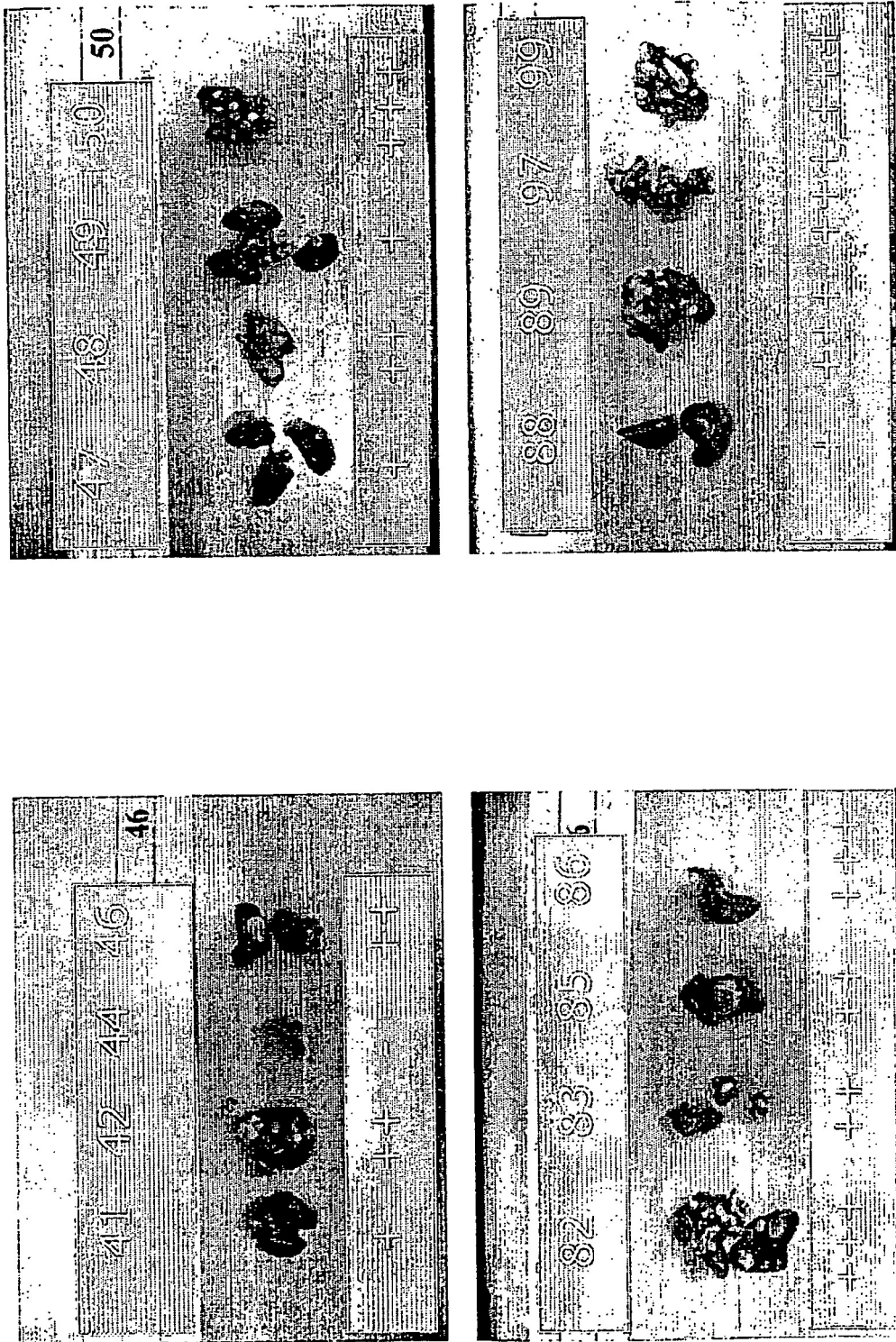


FIGURA: 14

Pulmones con Ag T oro

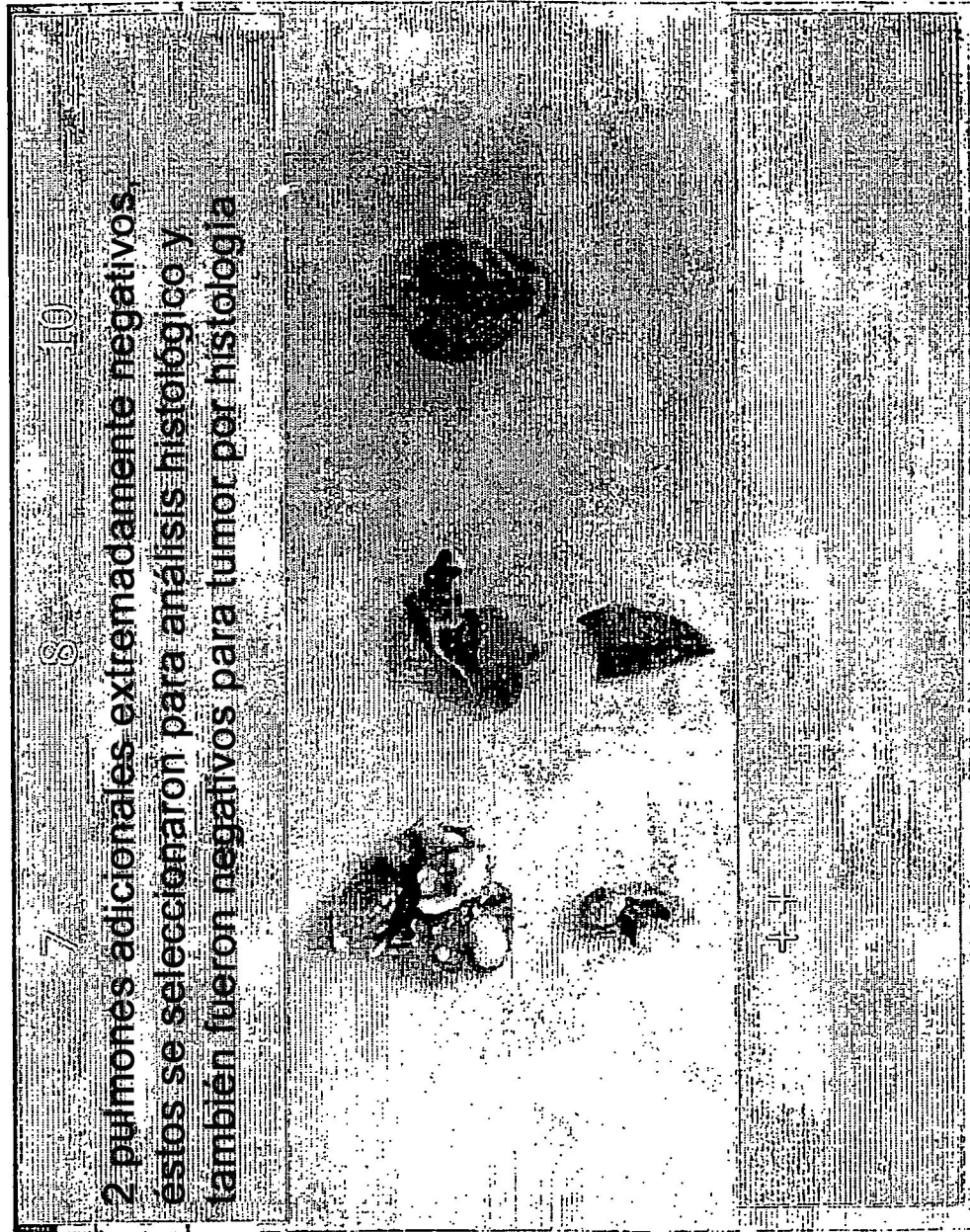


FIGURA: 15

Niveles de metástasis en pulmones
 (+++: 10~20, ++: 5~10, +: 0~5, -: 0)

	PBS	JAA-F11	T Ag Au
+++	6/16 (37,50%)	3/19 (15,79%)	0/3 (0%)
++	5/16 (31,25%)	2/19 (10,53%)	1/5 (20%)
+	4/16 (25,00%)	4/19 (21,05%)	0 (0%)
-	1/16 (6,25%)	10/19 (52,63%)	4/5 (80%)

FIGURA 16

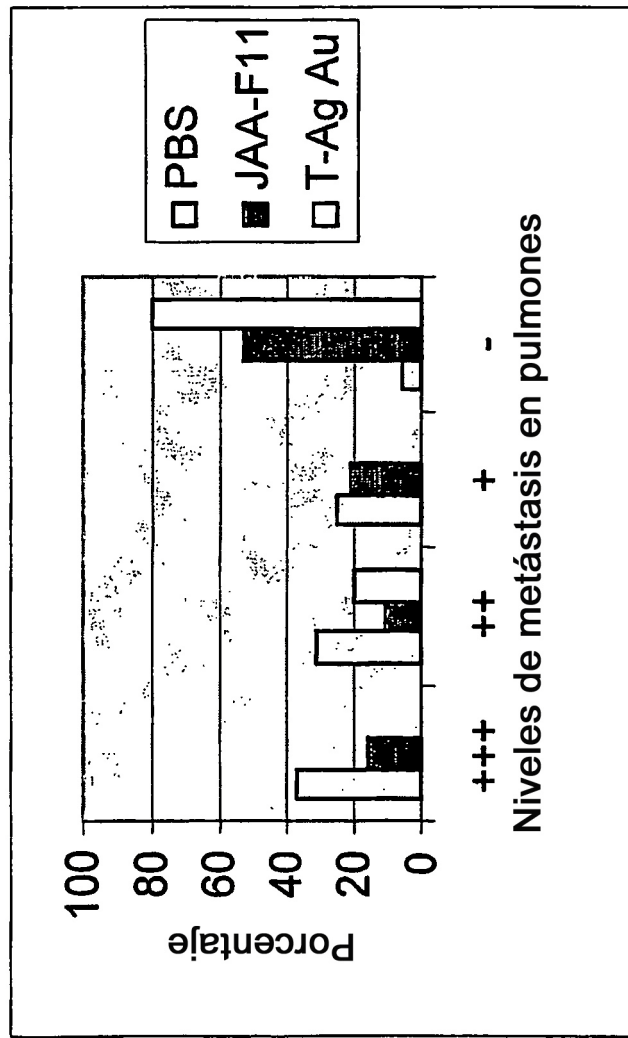


FIGURA : 17

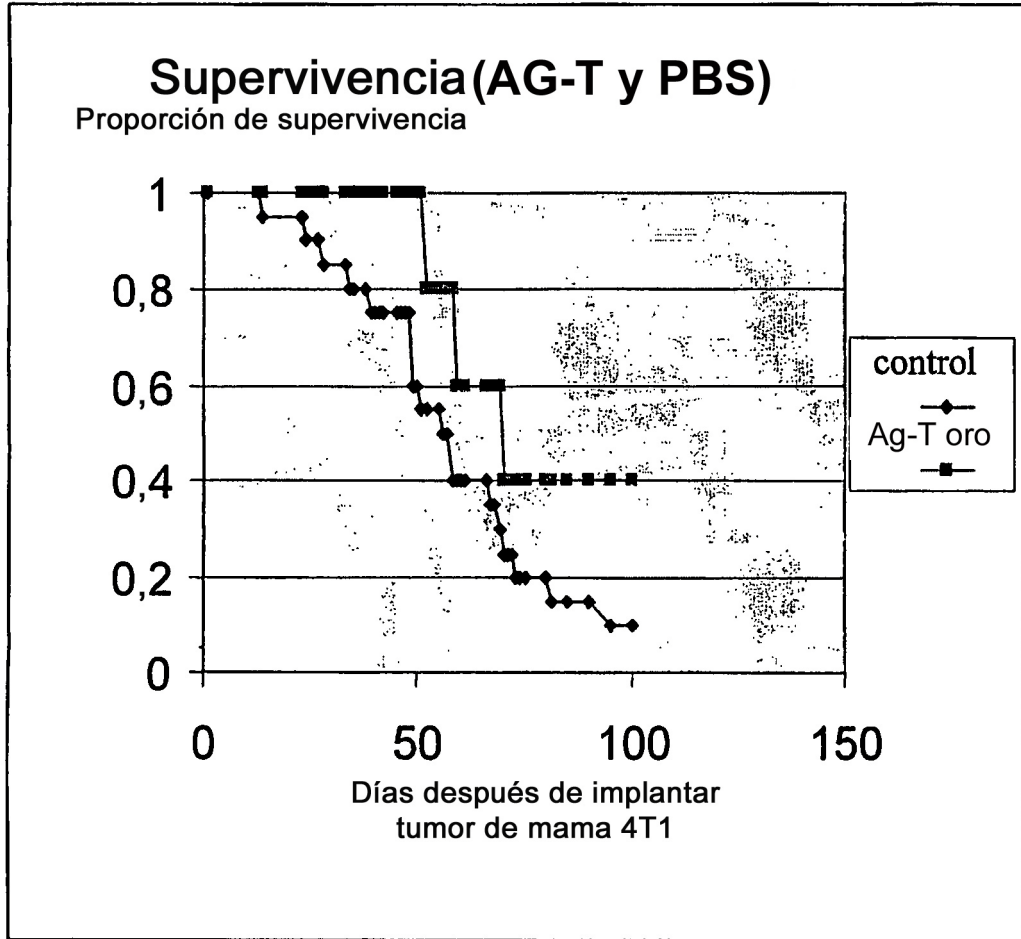


FIGURA 18

