

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 980**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2008 E 08842664 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2205284**

54 Título: **Nuevo procedimiento de preparación de nanopartículas recubiertas con una capa estabilizadora de gem-bisfosfonato acoplada a ligandos de biodistribución hidrófila**

30 Prioridad:

05.10.2007 FR 0758103

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

15.04.2013

73 Titular/es:

**GUERBET (100.0%)
15, RUE DES VANESSES
93420 VILLEPINTE, FR**

72 Inventor/es:

**PORT, MARC y
ROUSSEAU, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 400 980 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo procedimiento de preparación de nanopartículas recubiertas con una capa estabilizadora de gem-bisfosfonato acoplada a ligandos de biodistribución hidrófila

5 La invención se refiere a un nuevo procedimiento de preparación de nanopartículas para la obtención de imágenes médicas que comprenden un núcleo metálico, una capa estabilizadora orgánica y al menos un ligando de direccionamiento de un tejido patológico.

10 Se conocen nanopartículas metálicas usadas en la obtención de imágenes de diagnóstico, concretamente en la obtención de imágenes por resonancia magnética IRM, que comprenden un núcleo metálico, recubierto con una capa orgánica estabilizadora acoplada dado el caso a ligandos de direccionamiento biológico.

15 Entre esas nanopartículas, se conocen concretamente nanopartículas metálicas habitualmente denominadas USPIO que son partículas de óxido de hierro muy pequeñas, concretamente de magnetita (Fe₃O₄), de maghemita (γ-Fe₂O₃) y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición, de tamaño inferior a aproximadamente 100-150 nm.

20 Para obtener disoluciones coloidales de partículas magnéticas, estables en medio fisiológico, es necesario acondicionar la superficie de las partículas magnéticas. Para ello, se recubre la partícula con una capa orgánica estabilizadora constituida por macromoléculas tales como hidratos de carbono tales como el dextrano, o por moléculas orgánicas pequeñas tales como ácidos carboxílicos.

25 Con el fin de obtener información pertinente para el diagnóstico mediante obtención de imágenes médicas, resulta muy ventajoso acoplar estas últimas a ligandos de direccionamiento apropiados, de manera que las partículas se unan a y/o se reconozcan por células o tejidos diana. Este reconocimiento puede garantizarse ventajosamente con ayuda de ligandos que tienen un efecto sobre la biodistribución del producto, por ejemplo mediante un mecanismo de tipo fagocitosis de la partícula por células del sistema inmunitario tales como los macrófagos. Estos ligandos son por ejemplo grupos hidrófilos tales como grupos aminoalcohol, o compuestos de tipo polietilenglicol (PEG).

30 El documento WO 2004/058275 describe la síntesis de compuestos usando, como capa de estabilización/de unión, una capa de tipo gem-bisfosfonato, y como ligando, entre los numerosos ligandos posibles, grupos hidrófilos con efecto sobre la biodistribución (ligandos de biodistribución). En particular se describen compuestos que se presentan en forma de un núcleo N metálico recubiertos con elementos de direccionamiento de fórmula S-C, en la que:

35 - S es un grupo gem-bisfosfonato injertado al núcleo y de fórmula (I)



40 - C es un ligando hidrófilo (acoplado a la función X) de tipo aminoalcohol y/o de tipo PEG;

donde:

• L representa un grupo orgánico que conecta la función X a la función gem-bisfosfonato -CH(PO₃H₂)₂;

45 • X representa una función química que puede acoplarse al ligando hidrófilo C.

Para la preparación de estos compuestos, el procedimiento anterior (usado de manera general para las USPIO) comprende esquemáticamente las siguientes etapas:

50 - preparar el núcleo metálico N de las nanopartículas metálicas

- revestir el núcleo N con la capa estabilizadora de gem-bisfosfonato de fórmula



55 - acoplar la partícula obtenida con el o los grupos hidrófilos.

60 Se intenta mejorar este procedimiento para obtener compuestos cuya cantidad de ligando injertado se controle perfectamente, con el fin de optimizar y controlar con reproducibilidad la tasa de injerto en el núcleo, de evitar etapas de purificación y de simplificar el control farmacéutico minimizando los riesgos de contaminación bacteriana o pirógena, y así obtener una fabricación del producto que funcione a nivel industrial.

Por otro lado, en el caso concretamente de ligandos de biodistribución de tipo aminoalcohol o polietilenglicol,

descritos en detalle a continuación, un problema complementario se encuentra en la cantidad necesaria de ligando que va a usarse en el procedimiento descrito en el documento WO 2004058275. En efecto, para obtener al final una tasa de recubrimiento con elementos de direccionamiento S-C ventajosamente elevada, concretamente una tasa de recubrimiento de más del 80% de los sitios de fijación posibles en el núcleo, hacía falta en ese procedimiento anterior usar una cantidad importante de ligando C en exceso (hacía falta añadir, a un equivalente de compuesto N-S [núcleo + recubrimiento de gem-bisfosfonato], del orden de 5 equivalentes de ligando hidrófilo C), de ahí precios de coste industriales elevados. Era particularmente útil resolver este problema para aminoalcoholes complejos y costosos tales como los de fórmula (IV), concretamente los aminoalcoholes AAG1 y sus derivados descritos a continuación en la presente solicitud.

El solicitante ha logrado resolver estos problemas técnicos gracias a un procedimiento (denominado vía inversa) de preparación según el cual se preparan elementos constituidos por uno o varios ligandos hidrófilos acoplados químicamente a grupos orgánicos de enlace de gem-bisfosfonato, después esos elementos [grupo de enlace-ligando] se acoplan a las nanopartículas metálicas. Los grupos orgánicos de enlace pertenecerán a, o formarán, la capa estabilizadora (o de unión).

Para ello, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas, concretamente para la obtención de imágenes médicas, que comprenden un núcleo metálico N recubierto con una capa estabilizadora orgánica acoplada a al menos un ligando hidrófilo con efecto sobre la estabilidad/biodistribución de las nanopartículas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) preparar el núcleo metálico N de las nanopartículas metálicas;

b) preparar elementos de direccionamiento/estabilización de fórmula S-C en la que:

- S es un grupo de unión de gem-bisfosfonato de fórmula $X-L-CH(PO_3H_2)_2$;

- C es un ligando de biodistribución hidrófila elegido de los aminoalcoholes o los PEG tal como se mencionan en la reivindicación 1;

c) inyectar en el núcleo N al menos un elemento de direccionamiento.

Por motivos de simplicidad, en la solicitud se usará para la expresión elementos de direccionamiento/estabilización, la expresión "elementos de direccionamiento".

Por la expresión "inyectar en el núcleo N al menos un elemento de direccionamiento" se entiende que se inyectan conjuntos de direccionamiento de la misma estructura, o varios conjuntos de direccionamiento cuyos grupos S y/o grupos C no tienen la misma fórmula.

La ventaja de tener grupos S diferentes es concretamente poder aumentar o reducir el tamaño hidrodinámico del agente de contraste (haciendo variar el tamaño de los grupos L), lo que permite contribuir a optimizar la biodistribución del producto en función de la indicación de diagnóstico en cuestión.

Según unas realizaciones, los elementos de direccionamiento son aminoalcoholes tales como se definen en la reivindicación 1.

Según unas realizaciones, los elementos de direccionamiento son PEG tales como se definen en la reivindicación 1.

Según realizaciones, una parte de los elementos de direccionamiento son aminoalcoholes tal como se definen en la reivindicación 1, y otra parte de los elementos de direccionamiento son PEG tal como se definen en la reivindicación 1. Los ligandos pueden ser idénticos o diferentes entre los elementos de direccionamiento inyectados.

Según realizaciones, las nanopartículas metálicas obtenidas tras el injerto tendrán por tanto, por ejemplo, del 10 al 90% de los elementos de direccionamiento con un ligando hidrófilo que tiene un efecto ventajoso sobre la biodistribución y/o la estabilidad de la partícula (un aminoalcohol, una rama PEG, varios aminoalcoholes diferentes), y el resto (del 90 al 10%) de los elementos de direccionamiento con un ligando diferente.

Según realizaciones, se inyectan en el núcleo por un lado elementos de direccionamiento S-C (portadores de grupos hidrófilos), y por otro lado grupos de estabilización S no portadores de ligandos de biodistribución. Se tendrá por ejemplo del 5 al 95% de grupos S-C y el resto (del 5 al 95%) de grupos S.

La tabla al final de la descripción detallada ilustra diferentes posibilidades.

Estas tasas corresponden a tasas de recubrimiento del núcleo por los elementos S o S-C (a nivel de los sitios de fijación posible, normalmente los sitios protonados localizados en la superficie de la nanopartícula). Los porcentajes se expresan por tanto en número de moléculas S-C o S por número de sitios de fijación disponibles en el núcleo.

Así, para una tasa de recubrimiento del 100%, la superficie del núcleo estará casi totalmente recubierta con elementos S-C y/o S (por ejemplo el 80% de grupos S-C y el 20% de grupos S). Esta tasa de recubrimiento es por tanto distinta de la tasa de injerto descrita a continuación.

5 Las nanopartículas metálicas tienen un diámetro hidrodinámico del orden de 10 a 100 nm, y concretamente de 10 a 50 nm.

Cada grupo S de un conjunto de direccionamiento comprende al menos una parte de enlace al núcleo, y al menos una función química X de acoplamiento con un ligando C, más precisamente de enlace covalente a una función reactiva del ligando.

Las etapas a) y b) pueden realizarse en cualquier orden pero antes de la etapa c).

15 El conjunto de los grupos S injertados en el núcleo N constituye la capa de unión (estabilizadora). La tasa de injerto (porcentaje en moles de compuesto S-C y/o S por moles de hierro; la tasa de injerto se determina a partir de las valoraciones de fósforo) de los elementos de direccionamiento S-C y/o S en el núcleo N está normalmente comprendida entre el 0,5 y el 10%, concretamente del 1 al 5%, por ejemplo el 1, 2, 3, 5, 10%, para un tamaño cristalino del núcleo del orden de 7-8 nm.

20 Según realizaciones, además de los elementos de direccionamiento S-C, también se injertan grupos que tienen un efecto sobre la estabilidad de la nanopartícula, por ejemplo ácidos hidroximonocarboxílicos, por ejemplo elegidos de los siguientes: ácido glucónico, ácido oxálico, ácido mandélico, ácido 4-hidroxí-3-metoxi-mandélico, ácido lactobiónico, ácido alfa-hidroxihipúrico, ácido metil-2-hidroxibutírico, ácido glicólico, ácido N-acetilneuraminínico, ácido fosfo-enolpirúvico.

25 De manera por tanto muy ventajosa, puede controlarse perfectamente la tasa de injerto de las nanopartículas en compuestos portadores de ligandos, lo que es muy útil para el coste, el análisis y la caracterización y el control de la eficacia fisiológica del producto. La fabricación de los elementos de direccionamiento S-C se controla además totalmente, en particular su pureza antes del injerto, lo que es principal para la fabricación industrial.

30 Ahora se describe más precisamente el núcleo N. Normalmente, el núcleo metálico de las nanopartículas preparadas está compuesto total o parcialmente por hidróxido de hierro; por óxido de hierro hidratado; por óxidos de hierro mixtos tales como óxidos de hierro mixtos de cobalto, de níquel, de manganeso, de berilio, de magnesio, de calcio, de bario, de estroncio, de cobre, de zinc o de platino; o por una mezcla de los mismos. El término "ferrita" designa los óxidos de hierro de fórmula general $[x\text{Fe}_2\text{O}_3, y\text{MO}_2]$, en la que M designa un metal magnetizable bajo el efecto de un campo magnético tal como Fe, Co, Ru, Mg, Mn, pudiendo el metal magnetizable ser eventualmente radiactivo. De manera preferible, las partículas magnéticas de las composiciones de la invención comprenden una ferrita, concretamente la maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) y la magnetita (Fe_3O_4), o incluso las ferritas mixtas de cobalto (Fe_2CoO_4) o de manganeso (Fe_2MnO_4). El núcleo de la nanopartícula se ha vuelto ácido para facilitar el acoplamiento de los elementos S-C. El procedimiento de preparación del núcleo ácido (con una etapa que usa ácido nítrico) se describe en detalle en el documento WO 2004058275 (documento US 2004253181, concretamente los párrafos 331 a 339, página 19). Se recuerda que este procedimiento con una etapa de acidificación (a pH muy ácido, normalmente de entre 1 y 3) antes de la fijación de los grupos S y/o S-C, permite obtener partículas particularmente ventajosas cuya polidispersidad se controla totalmente y que están en disolución coloidal estable.

45 Ahora se describen los grupos L. El grupo de enlace L es un grupo divalente, elegido de:

- un grupo alifático; alicíclico; alicíclico-alifático; aromático; aromático-alifático, pudiendo dichos grupos alifáticos, alicíclicos y aromáticos estar eventualmente sustituidos con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de cloro, de yodo o de bromo;

- un grupo $-\text{L}_1-\text{NHCO}-\text{L}_2$ en el que L_1 y L_2 son o bien idénticos o bien diferentes, y representan un grupo alifático; alicíclico; aromático; alicíclico-alifático o aromático-alifático, pudiendo dichos grupos estar eventualmente sustituidos con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de cloro, de yodo o de bromo.

55 Un grupo alifático designa en este caso una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que comprende preferiblemente de 1 a 16 átomos de carbono, incluso mejor de 1 a 6 átomos de carbono. Preferiblemente, el grupo alifático designa un grupo alquilo. Ejemplos son concretamente los radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, isobutilo, pentilo y hexilo.

60 El término "alicíclico" designa una cadena hidrocarbonada cíclica que comprende preferiblemente de 3 a 8 átomos de carbono, preferiblemente un grupo cicloalquilo. A modo de ejemplo, se mencionarán concretamente el ciclopropilo y el ciclohexilo.

65 El término "aromático" representa un grupo hidrocarbonado mono o policíclico aromático que comprende preferiblemente de 5 a 20 átomos de carbono, incluso mejor de 6 a 18. Ejemplos son concretamente los radicales

fenilo y 1 ó 2-naftilo. Según una variante particular, un grupo "aromático" en el sentido de la invención puede integrar uno o varios heteroátomos tales como azufre, oxígeno o nitrógeno. En este caso particular, el grupo "aromático" designa un grupo heteroaromático mono o policíclico.

- 5 Los grupos "alifático-alicíclico" y "alifático-aromático" representan cadenas alifáticas que responden a la definición mencionada anteriormente, sustituidas respectivamente con un grupo alicíclico o aromático tal como se definieron anteriormente. A modo de ejemplo de grupo alifático-aromático, puede mencionarse concretamente el bencilo.

10 Según una variante preferida, L representa un grupo fenileno eventualmente sustituido, pudiendo los grupos X y gem-bisfosfonato estar en posición orto, meta o para.

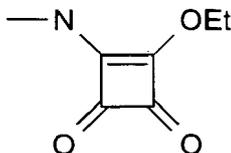
Según un modo de realización particularmente preferido, L representa un grupo alifático sustituido o no, y más preferiblemente un grupo $-(CH_2)_p-$, en el que p es un entero de 1 a 5.

- 15 Según otro modo preferible, L representa un grupo $L_1-CONH-L_2$ y más preferiblemente un grupo $-(CH_2)_n-NHCO-(CH_2)_m-$ en el que n y m representan un número entero de 0 a 5.

20 El extremo X del compuesto de gem-bisfosfonato de fórmula (I) se elige de tal manera que sea propenso a reaccionar y de formar un enlace covalente con una función presente en el biovector. Para más información referente a estos acoplamientos, podrá hacerse referencia concretamente a la obra Bioconjugate techniques, Greg T. Hermanson, 1995, Publisher: Academic, San Diego, Calif.

X se elige de:

- 25 • $-COOH$,
- $-NH_2$, $-NCS$, $-NH-NH_2$, $-CHO$, alquilpirocarbonilo ($-CO-O-CO-alk$), acilazidilo ($-CO-N_3$), iminocarbonato ($-O-C(NH)-NH_2$), vinilsulfurilo ($-S-CH=CH_2$), piridildisulfurilo ($-S-S-Py$), haloacetilo, maleimidilo, diclorotriazinilo, halógeno,
- 30 • el grupo de fórmula:

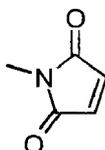


- 35 • prefiriéndose particularmente los grupos $-COOH$ y $-NH_2$.

El término "alk" designa en el sentido de la presente descripción un radical alquilo C_1-C_6 , designando el término "Py" por su parte un radical piridilo.

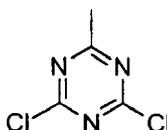
El radical maleimidilo designa un radical cíclico de fórmula:

40



El radical diclorotriazinilo designa un radical de fórmula:

45



Entre los grupos halógeno, pueden mencionarse concretamente el cloro, el bromo, el flúor y el yodo, prefiriéndose particularmente el cloro y el bromo.

- 50 Por "haloacetilo", en el sentido de la presente descripción, se entiende un radical acetilo CH_3-CO- , uno de cuyos átomos de hidrógeno está sustituido por un átomo de halógeno, siendo éste tal como se definió anteriormente.

Preferiblemente, X representa un grupo $-COOH$ o $-NH_2$ y L un grupo alifático sustituido o no, incluso mejor un grupo

$-(\text{CH}_2)_p-$, en el que p es un entero de 1 a 5.

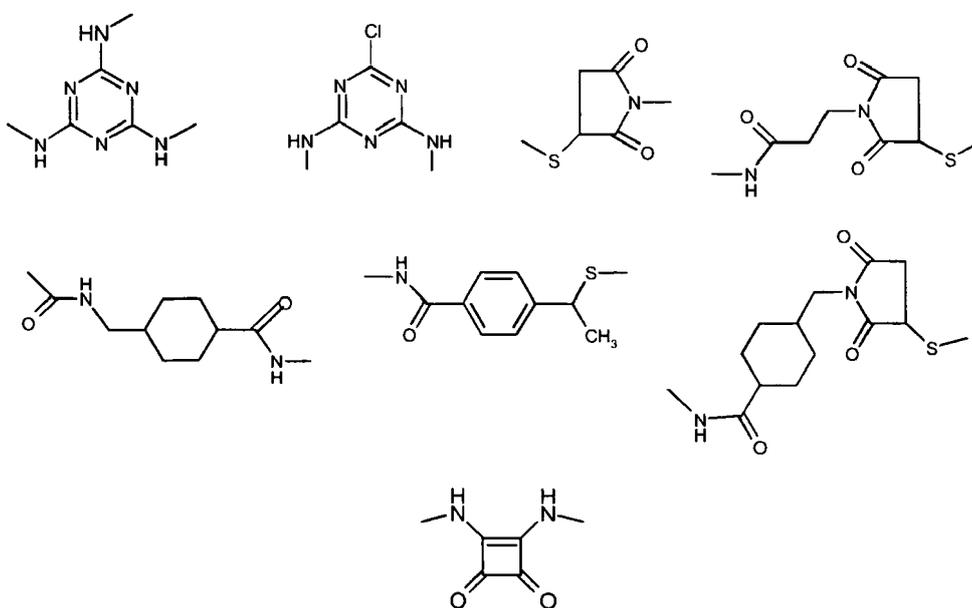
Se prefiere muy particularmente el compuesto de fórmula (Ia)



5 Según otro modo preferible, L representa un grupo $\text{L}_1\text{-CONH-L}_2$ y más preferiblemente un grupo $-(\text{CH}_2)_n\text{-NHCO}-(\text{CH}_2)_m-$ en el que n y m representan un número entero de 0 a 5 y X representa $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$.

10 Evidentemente, también entra en el marco de la invención el acoplamiento de la función X y del biovector de manera indirecta, es decir a través de un reactivo homobifuncional o heterobifuncional. A modo ilustrativo de reactivo homobifuncional, el glutaraldehído puede ser conveniente para realizar el acoplamiento, por ejemplo, de una función $\text{X} = -\text{NH}_2$ con una función $-\text{NH}_2$ del biovector.

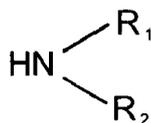
15 Según una variante preferida de la invención, las funciones X forman un enlace covalente L_3 con el biovector de tipo $-\text{CONH-}$, $-\text{COO-}$, $-\text{NHCO-}$, $-\text{OCO-}$, $-\text{NH-CS-NH-}$, $-\text{C-S-}$, $-\text{N-NH-CO-}$, $-\text{CO-NH-N-}$, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{N-CH}_2-$, $-\text{N-CS-N-}$, $-\text{COCH}_2\text{-S-}$, $-\text{N-CO-CH}_2\text{-S-}$, $-\text{N-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH=NH-NH-}$, $-\text{NH-NH=CH-}$, $-\text{CH=N-O-}$, $-\text{O-N=CH-}$ o que responde a las siguientes fórmulas:



25 La totalidad o parte, y normalmente del orden del 50 al 100%, concretamente el 50, 60, 70, 80, 80, 95% de las funciones X del compuesto de gem-bisfosfonato se acoplan a un ligando de biodistribución.

El ligando de biodistribución hidrófila es un ligando de aminoalcohol o polietilenglicol (también denominado PEG), tal como se define en la reivindicación 1.

30 Los ligandos de aminoalcohol son compuestos de fórmula general (II):

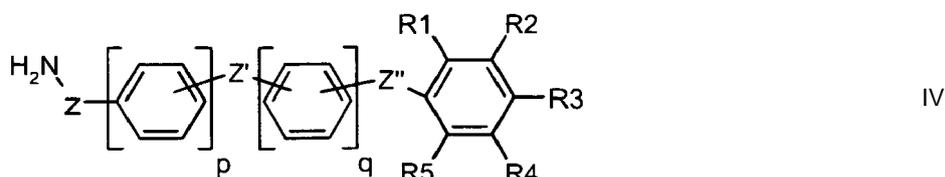


35 en la que:

R_1 y R_2 son idénticos o diferentes y representan una cadena hidrocarbonada alifática que comprende de 2 a 6 átomos de carbono, sustituida con de 6 a 10 grupos hidroxilo, o bien con de 4 a 8 grupos hidroxilo en el caso en el que R_1 y/o R_2 están interrumpidos por uno o varios átomos de oxígeno.

40 Como ejemplo de ligando de aminoalcohol de fórmula (II), pueden mencionarse concretamente los ligandos para los que R_1 y R_2 representan cada uno independientemente un grupo $-(\text{CH}_2)\text{-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$ o $-(\text{CH}_2)\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$, en particular aquéllos para los que R_1 representa un grupo $-(\text{CH}_2)\text{-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$ o $-(\text{CH}_2)\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$ y R_2 un grupo $-\text{CH}_2\text{-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$.

Según otro modo de realización preferido, los ligandos de aminoalcohol son compuestos de fórmula (IV)



5 en la que:

Z es un enlace, CH₂, CH₂CONH o (CH₂)₂NHCO

Z' es un enlace, O, S, NQ, CH₂, CO, CONQ, NQCO, NQ-CONQ o CONQCH₂CONQ,

10

Z'' es un enlace, CONQ, NQCO o CONQCH₂CONQ

p y q son números enteros cuya suma vale de 0 a 3 (con, según una variante ventajosa, p=q=0)

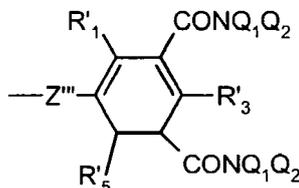
15 R₁, R₂, R₃, R₄ o R₅ representan cada uno independientemente H, Br, Cl, I, CONQ₁Q₂ o NQ₁COQ₂,

con Q₁ y Q₂ idénticos o diferentes elegidos de H, un grupo alquilo (C₁-C₈) mono o polihidroxilado y/o eventualmente interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno, de tal manera que Q₁ y Q₂ comprenden entre ellos dos de 4 a 10 grupos OH;

20

entendiéndose que al menos uno y como máximo dos de los grupos R₁ a R₅ representa CONQ₁Q₂ o NQ₁COQ₂;

o bien R₁, R₃, R₅ representan cada uno independientemente H, Br, Cl, o I y R₂ y R₄ representan



25

en la que:

R'₁, R'₃ y R'₅, idénticos o diferentes, representan H, Br, Cl o I;

30

Q₁ y Q₂ tienen el mismo significado que anteriormente;

Z''' es un grupo elegido de CONQ, CONQCH₂CONQ, CONQCH₂, NQCONQ, CONQ(CH₂)₂NQCO; y

35 Q es H o alquilo (C₁-C₄), pudiendo dichos grupos ser lineales o ramificados y estando eventualmente hidroxilados.

Preferiblemente, Z es CH₂.

Preferiblemente, p=q=0.

40

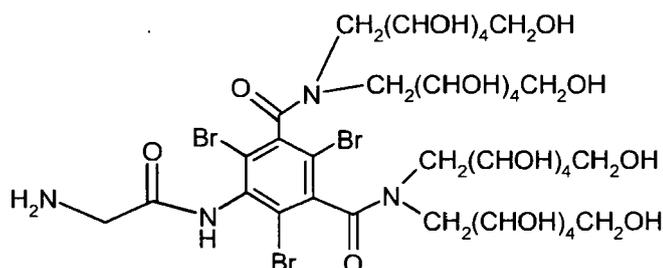
Preferiblemente, Z'' es CONH.

Preferiblemente, R₂ y R₄ representan CONQ₁Q₂.

45 Preferiblemente, R₁, R₃, R₅ representan Br.

Preferiblemente, Q₁ y Q₂ representan cada uno independientemente un grupo -(CH₂)-(CHOH)₄-CH₂OH o -(CH₂)-CHOH-CH₂OH, en particular un grupo -(CH₂)-(CHOH)₄-CH₂OH.

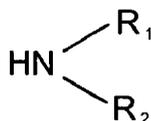
50 Según un modo de realización particularmente preferido, el ligando de aminoalcohol de fórmula (IV) es el compuesto:



Preferiblemente, los ligandos de aminoalcohol según la invención se acoplan a través de su función amina -NH- o -NH₂ a la función X de los grupos de unión S de fórmula X-L-CH(PO₃H₂)₂, de manera que las funciones hidroxilo quedan libres, conservando así su carácter hidrófilo.

Por "polietilenglicol", en el sentido de la presente solicitud, se designan de manera general compuestos que comprenden una cadena -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_k-CH₂OR₃ en la que k varía de 2 a 100 (por ejemplo 2, 4, 6, 10, 50), y R₃ se elige de H, alquilo o -(CO)Alk, designando el término "alquilo" o "alk" un grupo alifático hidrocarbonado, lineal o ramificado, que tiene aproximadamente de 1 a 6 átomos de carbono en la cadena.

El término "polietilenglicol" tal como se emplea en este caso, abarca concretamente los compuestos de aminopolietilenglicol de fórmula (III):



en la que:

R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan H, un grupo alquilo o una cadena de polietilenglicol de fórmula -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_k-CH₂OR₃, entendiéndose que al menos uno de los grupos R₁, R₂ representa una cadena de polietilenglicol,

en la que k varía de 2 a 100 (por ejemplo 2, 4, 6, 10, 50), y

R₃ se elige de H, alquilo o -(CO)Alk, designando el término "alquilo" o "alk" un grupo alifático hidrocarbonado, lineal o ramificado, que tiene aproximadamente de 1 a 6 átomos de carbono en la cadena.

Ejemplos de aminopolietilenglicoles son concretamente los compuestos O-(2-aminoetil)-O'-metilpolietilenglicol 1100, O-(2-aminoetil)-O'-metil-polietilenglicol 2000, O-(2-aminoetil)-O'-metil-polietilenglicol 750, los compuestos PEG 340, PEG 750, PEG 1500, PEG2000 por ejemplo.

Se precisa que el injerto de los compuestos S-C de la solicitud en el núcleo N se realiza por la parte CH(PO₃H₂)₂ de los compuestos S.

El solicitante ha indicado en particular, para los ligandos de aminoalcohol y/o PEG, que no solamente se facilita la síntesis y con un rendimiento mejorado, sino que además el producto final obtenido responde de manera satisfactoria a las especificaciones normativas y al uso de diagnóstico. El recubrimiento de casi la totalidad del núcleo mediante estos grupos confiere al producto una estabilidad y una biodistribución particularmente ventajosas para estos ligandos hidrófilos, concretamente mejorando la furtividad (el producto se capta entonces ventajosamente menos por el hígado) y la captación macrófaga (se mejora el direccionamiento de los macrófagos, con un interés concretamente para el seguimiento de las placas de ateroma, de los ganglios y otras zonas de inflamación). Por otro lado se entiende la ventaja del control de la cantidad de ligando para los productos con recubrimiento mixto, por ejemplo ligando de aminoalcohol y ligando de PEG, para respetar las exigencias de reproducibilidad de los lotes de fabricación, de calidad y de seguridad farmacéuticas.

De manera inesperada, el nuevo procedimiento del solicitante de vía inversa permite dividir entre un factor de 3 a 10 la cantidad de ligando de biodistribución, en particular de tales aminoalcoholes. La siguiente tabla ilustra este resultado, tomando el ejemplo del compuesto del ejemplo 14 que utiliza como aminoalcohol el compuesto del ejemplo 4.

	Vía directa (técnica anterior)	Vía inversa
Cantidad de ligando aminoalcohol que debe añadirse para obtener un recubrimiento con elementos S-C superior al 90%	de 5 a 10 equivalentes	de 1,2 a 2,2 equivalentes
Tasa de injerto (en % de ligando de aminoalcohol / mol de Fe) con el aminoalcohol del ejemplo 4	1,2%	2%
Cantidad de aminoalcohol (en mol de aminoalcohol) usada para obtener esta tasa de injerto	0,2 mol	0,025 mol

Por tanto, el solicitante ha logrado resolver el doble problema del control de la tasa de injerto de los ligandos, y de la reducción de la cantidad de ligando que debe usarse.

- 5 Según un modo de realización particular, el procedimiento según la invención comprende además injertar elementos S-C-T, en los que C es un ligando de polietilenglicol y T representa un grupo cromóforo.

Por "cromóforo" se entiende un grupo coloreado, es decir, que puede absorber la energía de fotones en un rango del espectro visible mientras que las otras longitudes de onda se transmiten o se difunden.

- 10 Como ejemplo de cromóforo útil según la invención, puede mencionarse concretamente el clorhidrato de 4-(amino)fluoresceína.

- 15 La invención también se refiere al uso de las nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento del solicitante para la preparación de una composición de diagnóstico o terapéutica. Las nanopartículas se usan en particular como agente de contraste de tipo composición de nanopartículas tales como las descritas en detalle en el documento WO 2004058275, para la obtención de imágenes IRM o escáner de RX.

- 20 Según realizaciones, las partículas se vehiculizan en sistemas de liberación de principios activos, tales como sistemas de encapsulación de tipo liposomas o nanopartículas lipídicas sólidas que también pueden encerrar, además de las nanopartículas usadas como agente de diagnóstico, principios activos terapéuticos.

- 25 La invención también tiene por objeto los elementos de direccionamiento S-C tal como se definieron anteriormente, útiles según el procedimiento de la invención.

La invención se ilustra con ayuda de los siguientes ejemplos detallados.

- 30 A continuación, las abreviaturas M, M/L, M teórica, N y M/z, ES⁺, ES, kD y CCF tienen los mismos significados que en el documento WO 2004/058275 (documento US2004/253181):

M o M/L: concentración molar (mol/litro).

M teórica: masa molecular teórica.

- 35 N: normalidad.

M/z: masa sobre la carga determinada mediante espectrometría de masas.

- 40 ES⁺: electronebulización en modo positivo.

ES⁻: electronebulización en modo negativo.

TFA: ácido trifluoroacético.

- 45 kD: unidad de masa molecular (kiloDalton).

CCF: cromatografía en capa fina.

- 50 Z ave: diámetro hidrodinámico medido mediante PCS.

Poli σ : polidispersidad medida mediante PCS.

La siguiente nomenclatura química procede del software ACD/NAME (sociedad Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canadá), según las normas de la IUPAC.

ES 2 400 980 T3

Valoración del hierro total:

5 El hierro se valora mediante espectroscopía de absorción atómica (espectrofotómetro VARIAN AA10) tras mineralización mediante HCl concentrado y dilución con respecto a un intervalo patrón de iones férricos (0, 5, 10, 15 y 20 ppm).

Tamaño de las partículas:

10 - Diámetro hidrodinámico de la partícula injertada (Z ave) = tamaño PCS:

Determinado mediante PCS (instrumento Malvern 4700, láser a 488 nm a 90°) en una muestra diluida a ~ 1 milimolar con agua PPI filtrada sobre 0,22 µm.

15 PCS = Photon Correlation Spectroscopy (espectroscopía de correlación fotónica) = técnica mediante difusión de luz dinámica; referencia: R. Pecora en J. of Nano. Res. (2000), 2, págs. 123-131.

- Diámetro de la partícula magnética (p) (antes del injerto):

20 Determinado mediante deconvolución de las curvas de imantación (mediciones realizadas en un magnetómetro SQUID) a diferentes temperaturas (referencia: R.W. Chantrell en IEEE Transactions on Magnetics (1978), 14(5), págs. 975-977).

Análisis estructurales:

25 Mediante espectroscopía de masas (instrumento MICROMASS VG Quattro II) con una fuente de electronebulización.

Ejemplo 1:

30 Se introduce una disolución de 36 g (0,181 moles) de FeCl₂, 4H₂O, 20 ml de HCl al 37% en 150 ml de H₂O en una mezcla constituida por 3 litros de agua y 143 ml (0,302 moles) de FeCl₃ al 27%. Se introducen rápidamente 250 ml de NH₄OH al 25% con fuerte agitación. Se agita el conjunto 30 min. Se eliminan los líquidos mediante decantación magnética. Se lava el ferrofluido 3 veces seguidas con 2 litros de agua. Se pone el ferrofluido nítrico en agitación 15 min. con 200 ml de HNO₃ [2 M], se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética. Se lleva el ferrofluido nítrico a reflujo con 600 ml de agua y 200 ml de Fe(NO₃)₃ [1 M] durante 30 min. Se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética. Se pone el ferrofluido nítrico en agitación 15 min. con 200 ml de HNO₃ [2 M], eliminándose el sobrenadante mediante decantación magnética. Se lava el ferrofluido nítrico 3 veces con 3 litros de acetona, después se lleva a 400 ml de agua. Se evapora la disolución a vacío hasta un volumen final de 250 ml.

40

Concentración M/L	Z ave nm	Poli σ	Diámetro SQUID	Ms emu/cm ³
4,85	40 nm	0,22	8,5 nm	275

Ejemplo 2:

45 Se introducen 108 g (0,543 moles) de FeCl₂, 4 H₂O en 450 ml de H₂O en una disolución de 4 litros de agua y 429 ml (0,906 moles) de FeCl₃ al 27%. Se introducen rápidamente 750 ml de NH₄OH al 25% con agitación (1200 rpm). Se agita el conjunto 30 min. Se eliminan los líquidos mediante decantación magnética. Se lava el ferrofluido 2 veces seguidas con 3 litros de agua. Se pone el ferrofluido nítrico en agitación ¼ h con 3 litros de HNO₃ [2 M], se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética. Se lleva el ferrofluido nítrico a reflujo con 1300 ml de agua y 700 ml de Fe(NO₃)₃ [1 M] durante 30 min. (600 rpm). Se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética. Se pone el ferrofluido nítrico en agitación 15 n con 3 litros de HNO₃ [2 M], eliminándose el sobrenadante mediante decantación magnética.

50

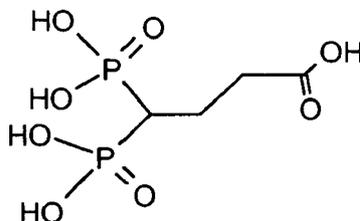
Se lava el ferrofluido nítrico 3 veces con 3 litros de acetona, después se lleva a 600 ml de agua. Se evapora la disolución a vacío hasta un volumen final de 250 ml.

55

Rendimiento %	Concentración M/L	Z ave (nm)	Poli σ
81,8	4,45	31,3	0,21

Se ponen 200 ml de la disolución anterior en agitación en 2,4 litros de HNO₃ durante 4 horas. Se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética. Se lava el ferrofluido nítrico 2 veces con 3 litros de acetona, después se lleva a 400 l de agua. Se evapora la disolución a vacío hasta un volumen final de 250 ml.

Rendimiento %	Concentración M/L	Z ave (nm)	Poli σ
77	2,742	23,3	0,20

Ejemplo 3:

5

Etapa a: 1-[diethoxyfosforil]vinilfosfonato de dietilo

Se disuelven 13 g (0,433 moles) de paraformaldehído y 10 ml (0,097 moles) de dietilamina en caliente en 250 ml de metanol. A continuación se añaden 24 g ($8,67 \cdot 10^{-2}$ moles) de [diethoxy-fosforil]metilfosfonato de dietilo. Se lleva el conjunto a reflujo durante 24 horas. Se concentra el medio de reacción a vacío. Se lleva el concentrado 2 veces a 250 ml de tolueno y a continuación se concentra a vacío. Se disuelve el aceite obtenido en 125 ml de tolueno. Se añaden 0,14 g de ácido para-toluenosulfónico. Se lleva la mezcla a reflujo 24 horas con un instrumento Dean-Stark, después se concentra hasta sequedad a vacío. Se extrae el producto con 500 ml de CH_2Cl_2 , después se lava 2 veces con 250 ml de agua. Se seca la fase orgánica sobre MgSO_4 y se concentra a vacío. Se purifica el producto bruto sobre 625 g de gel de sílice Merck Geduran® (40-63 μm). Elución: CH_2Cl_2 /acetona - 50/50 (CCF - SiO_2 : Rf = 0,45) – se aíslan 18,4 g con un rendimiento del 71%.

EM: M/z = 301,4 (ES+)

20

Etapa b: 2-[2,2-bis(diethoxyfosforil)etil]malonato de dietilo

Se agitan 1,6 g (0,01 moles) de malonato de dietilo, 0,07 g (0,001 moles) de etilato de sodio y 3 g (0,01 moles) de [diethoxy-fosforil]vinil-fosfonato de dietilo 15 min. en 15 ml de etanol. Se añaden 5 ml de una disolución saturada de NH_4Cl a la disolución etanólica. Se concentra el conjunto a vacío. Se extrae el residuo con 30 ml de acetato de etilo y se lava dos veces con 5 ml de agua. Se seca la fase orgánica sobre MgSO_4 , después se evapora hasta sequedad. Se purifica el aceite obtenido sobre 200 g de sílice Merck Geduran®; se aíslan 3,8 g con un rendimiento del 82%.

EM: M/z 460,9 (ES+)

30

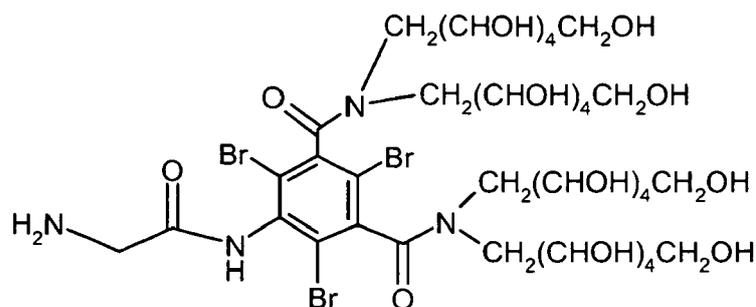
Etapa c: ácido 4,4-difosfonobutanoico

Se llevan 7 g ($15,7 \cdot 10^{-2}$ moles) de 2-[2,2-bis(diethylfosforil)etil]malonato de dietilo a reflujo durante 8 horas en 350 ml de HCl [5 N]. Se purifica el aceite de color marrón obtenido sobre 60 g de gel de sílice 60 silanizada (0,063-0,200 mm) con una elución de agua. Se aíslan 3,6 g con un rendimiento del 92%.

EM: M/z 249 (ES+)

Ejemplo 4:

40



El compuesto (ligando hidrófilo de aminoalcohol) puede prepararse según el modo operatorio descrito en la patente EP 0922700 A1.

45

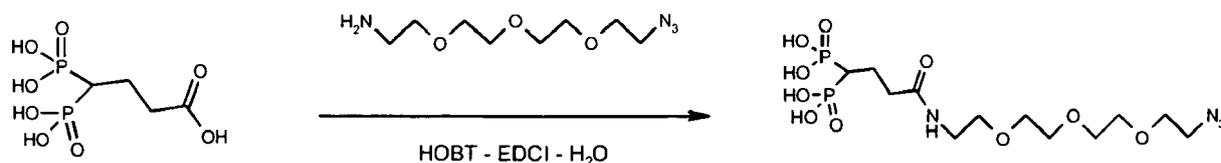
Ejemplo 5:

Se disuelven 600 mg del compuesto preparado en el ejemplo 3, etapa c ($2,42 \cdot 10^{-3}$ M) y 3,2 g de compuesto preparado en el ejemplo 4 ($4,85 \cdot 10^{-3}$ M) en 20 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 6,2 con NaOH 0,1 N. Se añaden 600 mg de EDCI ($3,13 \cdot 10^{-3}$ M), 65 mg de HOBT ($4,8 \cdot 10^{-4}$ M) y se agita el conjunto a temperatura ambiente durante 24 horas. Se vierte el medio de reacción sobre 400 ml de IPA y se agita 24 horas. Se filtra el precipitado, después se lava en éter etílico y se seca a vacío.

Se disuelve el producto bruto en el mínimo de agua ajustando el pH a 9, después se deposita sobre 150 ml de resina Amberlite Na (forma H⁺) una noche. Se eluye el producto con agua. Se concentran las fracciones buenas a vacío. EM, ES⁻: 1385,6

Ejemplo 6:

15 *Etapa a*



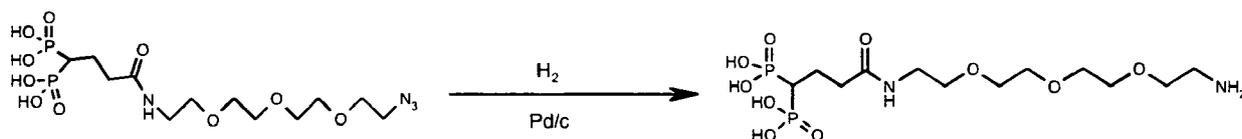
En un matraz de tres bocas de 500 ml, equipado con un electrodo y con una agitación magnética, se disuelve el gem-bisfosfonato (ejemplo 3, etapa c, 30 g) en H₂O (250 ml). Se lleva el pH a 5,7 mediante NaOH y se añade la amina (11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina, Fluka®, 21,8 g) de una sola vez: se añaden el HOBT (1,72 g) después el EDCI (21,16 g). Se agita el medio de reacción durante 24 horas a temperatura ambiente. Se evapora el medio hasta un volumen final de aproximadamente 150 ml. Se lleva el pH a 8 mediante NaOH. Se hace pasar la disolución sobre 70 ml (30 veces la teoría) de resina Amberlite 252 Na (H⁺-1,8 meq/ml) con el fin de eliminar el amino-PEG en exceso. Se eluye mediante H₂O (V_{recuperado} = 300 ml).

Se evapora hasta un volumen final de aproximadamente 150 ml.

Se hace pasar la disolución sobre 140 ml (2 veces la teoría) de resina IRA 67 (OH⁻-1,6 meq/ml) con el fin de eliminar los Cl⁻ en exceso. Se eluye mediante H₂O (V_{recuperado} = 260 ml). Se evapora hasta un volumen final de aproximadamente 100 ml. Se hace pasar la disolución sobre 900 g de sílice silanizada. Se eluye mediante 2 l de H₂O, después mediante 2 l de una mezcla de H₂O/CH₃OH (50/50).

m = 28,46 g, R = 75%, CL/EM: en ES⁺ a m/z = 449,12.

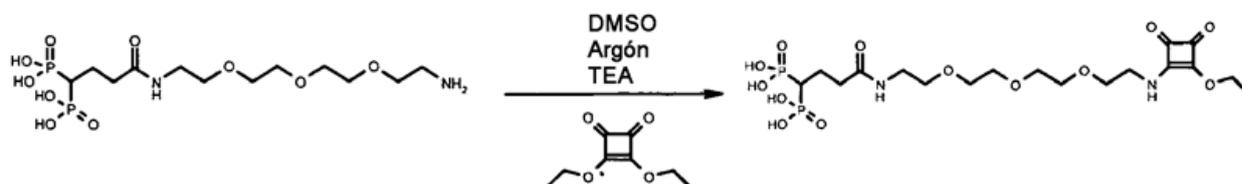
Etapa b



En el reactor autoclave de 1 L, se introduce la azida obtenida en la etapa a (28,26 g) previamente solubilizada en EtOH (350 ml). Se acidifica el medio mediante una disolución de HCl y se introducen cuatro espátulas de Pd/C en la disolución. Se agita el medio de reacción durante 4 horas a temperatura ambiente bajo 4 bares de hidrógeno. Se filtra el medio de reacción sobre Clarcel y se evapora la disolución hasta sequedad hasta obtener un aceite de color amarillo pajizo (31,21 g). Se purifica el producto mediante el paso de la disolución sobre 200 ml de resina IRA 67 (OH⁻-1,6 meq/ml) con el fin de eliminar los Cl⁻ en exceso. Se eluye mediante H₂O.

m = 12,25 g, R = 46% (aceite), CL/EM: en ES⁺ a m/z = 423,12.

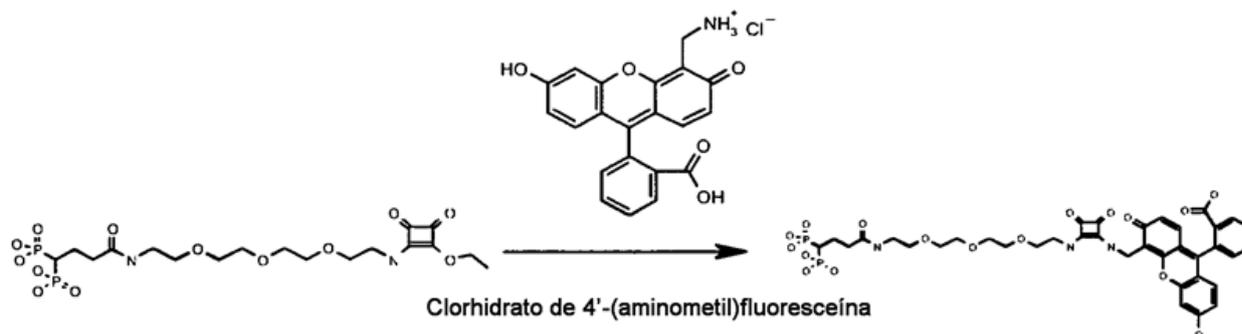
Etapa c



En un matraz de tres bocas de 250 ml, equipado con una agitación magnética, se disuelve el producto intermedio preparado anteriormente (12 g) en DMSO (200 ml). Se añaden trietilamina (6696 μ l), después escuarato de dietilo (4205 μ l). Se agita el medio durante 72 horas a temperatura ambiente. Se concentra la disolución hasta sequedad con la bomba de paletas hasta obtener un aceite de color amarillo que se purifica sobre sílice silanizada (elución mediante 2000 ml de H₂O, después mediante 2000 ml de [H₂O/CH₃OH] (80/20), después mediante 2000 ml de una mezcla de H₂O/CH₃OH (50/50) y mediante 1000 ml de CH₃OH).

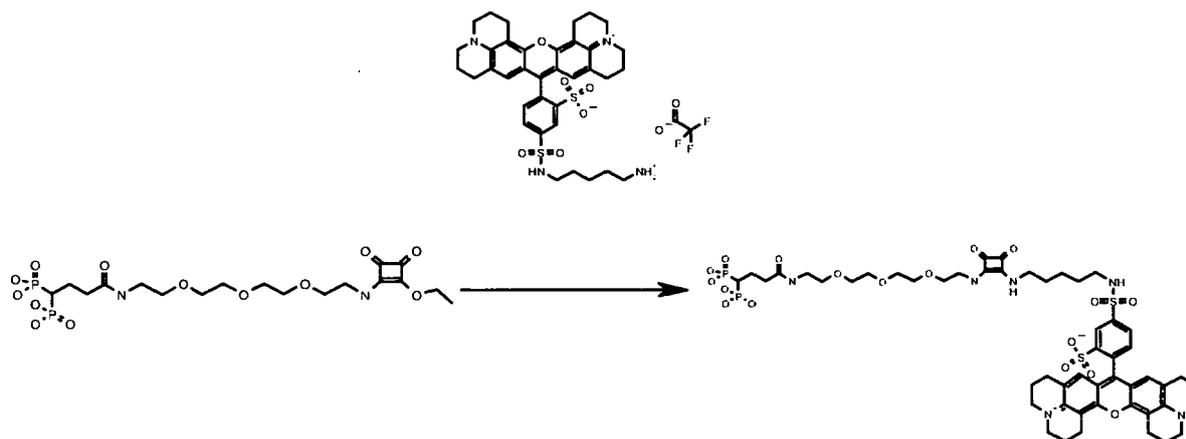
m = 7,2 g, R = 46,4% (aceite), CL/EM: en ES⁺ a m/z = 547,25.

10 **Ejemplo 7:**

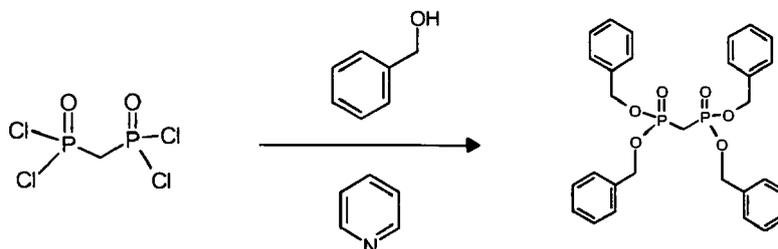


En un frasco, equipado con un electrodo y con una agitación magnética, se disuelve el producto intermedio preparado anteriormente (ejemplo 6, etapa c) (0,137 g; $2,5 \cdot 10^{-4}$ moles) en H₂O (2 ml). Se ajusta el pH de la disolución a 7,5 mediante una disolución saturada de Na₂CO₃. Se añade el colorante (0,05 g; $1,26 \cdot 10^{-4}$ moles), previamente disuelto en DMSO (1 ml), en el medio. El pH de la disolución es igual a 6,5. Se lleva el pH de la disolución a 8 mediante una disolución saturada de Na₂CO₃. Se agita la disolución durante 48 h a temperatura ambiente. Se lleva el pH de la disolución a 7 mediante una disolución de ácido clorhídrico 1 N. Se evapora la disolución hasta sequedad con la bomba de paletas. Se disuelve el aceite obtenido en H₂O (10 ml) y se purifica mediante cromatografía sobre un cartucho de sílice RP18 (25-40 μ m) de 90 g. Se aíslan 95 mg de producto con un rendimiento del 95%. CL/EM: en ES⁻ m/z = 860,19

25 **Ejemplo 8:**



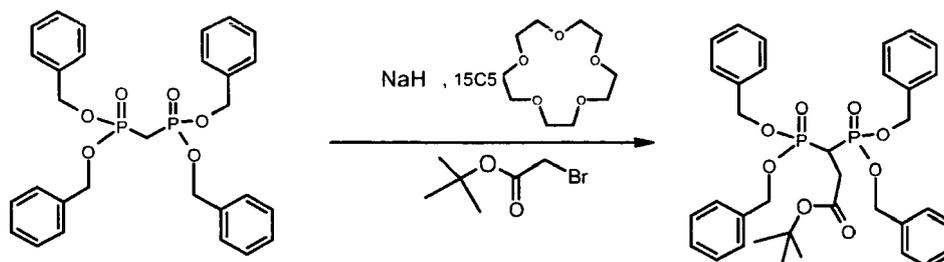
En un frasco, equipado con un electrodo y con una agitación magnética, se disuelve el compuesto preparado en el ejemplo 6, etapa c (0,137 g, $2,5 \cdot 10^{-4}$ moles) en H₂O (2 ml). Se ajusta el pH de la disolución a 7,5 mediante una disolución saturada de Na₂CO₃. Se añade el colorante (0,102 g, $1,26 \cdot 10^{-4}$ moles), previamente disuelto en DMSO (1 ml), en el medio. El pH de la disolución es igual a 5,5. Se lleva el pH de la disolución a 8 mediante una disolución saturada de Na₂CO₃. Se agita la disolución durante 48 h a temperatura ambiente. Se lleva el pH de la disolución a 7 mediante una disolución de ácido clorhídrico 1 N. Se evapora la disolución hasta sequedad con la bomba de paletas. Se disuelve el aceite obtenido en H₂O (10 ml) y se purifica mediante cromatografía sobre un cartucho de sílice RP18 (25-40 μ m) de 90 g. Se aíslan 100 mg de producto con un rendimiento del 66%.

Ejemplo 9:*Etapa a*

5

Se ponen 30 g de metilen-bis(dicloruro fosfónico) en agitación en 180 ml de tolueno previamente secado sobre tamiz. Se mantiene la temperatura a 0°C. Se añade gota a gota una disolución de 60 ml de alcohol bencílico y de 37,5 ml de piridina con la ayuda de una bomba de jeringa en 4 horas, no debiendo superar la temperatura los 0°C.

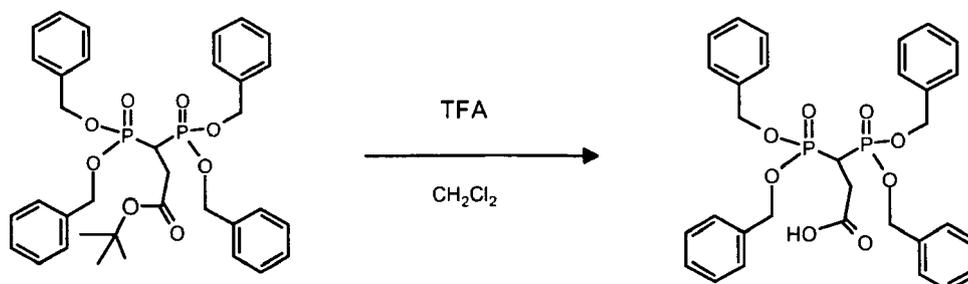
10 Se agita el medio 4 horas a TA. Se elimina la parte insoluble mediante filtración, se aclara varias veces con tolueno. Se lava la fase orgánica 3 veces con 150 ml de sosa 2 N, 250 ml de agua, se seca sobre MgSO₄ después se concentra. Se purifica la mezcla sobre sílice (eluyente: heptano/acetato de etilo: 30/70). CCF [SiO₂ - Hept/AcOEt: 3/7 - Rf = 0,3] - Rendimiento: 60%

15 CL/EM en ES⁺ 537,21*Etapa b*

20

Se ponen el compuesto preparado en la etapa a y el 15C5 en agitación en 240 ml de THF recién destilado. Se añaden poco a poco 1,15 g de NaH al 60% en el medio. Se mantiene la agitación ½ hora. Se añade gota a gota bromoacetato de t-butilo puesto en 25 ml de THF al baño de hielo. Se agita el conjunto 3 horas a TA. Se concentra el medio de reacción a vacío, se lleva a una disolución saturada de NH₄Cl y se extrae mediante 2*200 ml de CH₂Cl₂.

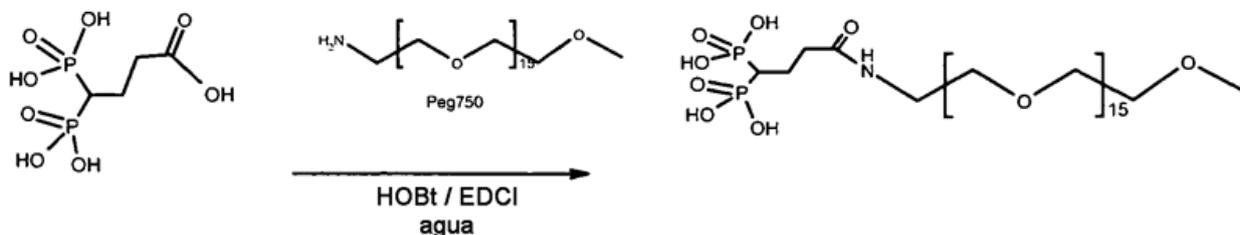
25 Se seca la fase orgánica sobre MgSO₄ y se purifica. (Cartucho Si60; 201 nm; caudal = 20 ml/min.- Gradiente: CH₂Cl₂ / acetona) - Rendimiento: 65%.

CL/EM en ES⁺ = 650,65, BP-tBu: (M+1) = 595,2630 *Etapa c*

35 Se ponen 3,4 g del compuesto procedente de la etapa b en disolución en 35 ml de CH₂Cl₂. Se mantiene la disolución en un baño de hielo y se añaden gota a gota 3,4 ml de TFA. Se agita el conjunto 4 horas a 0°C, después 20 horas a TA. Se evapora el medio de reacción a vacío a 20° C. Se lleva el producto a 20 ml de CH₂Cl₂ y se lava con agua, después se purifica (cartucho RP 18; detección a 201 nm; caudal = 20 ml/min.- Gradiente: agua-TFA pH=2,77/CH₃CN) - Rendimiento: 51%

40 CL/EM en ES⁺ = 595,28

Ejemplo 10:



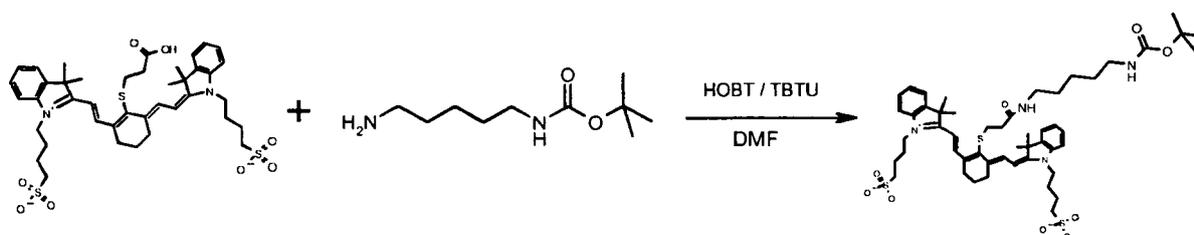
5 Se disuelven 1 g del compuesto obtenido en la etapa c del ejemplo 3 ($4,03 \cdot 10^{-3}$ moles) y 3,26 g de Peg750 ($4,43 \cdot 10^{-3}$ moles) en 55 ml de agua. Se ajusta el pH a 6,2. Se añaden 272 mg de HOBT ($2,01 \cdot 10^{-3}$ moles) y se agita el medio de reacción 5 minutos. A continuación se añaden 1,148 g de EDCI ($6 \cdot 10^{-3}$ moles) y se mantiene la agitación 24 h. Se realiza la purificación sobre resina Amberlite 252Na con fijación del producto a pH 9,2. Se obtienen 3 g, es decir un rendimiento del 59%.

10

CL/EM: modo ES⁻, una serie de picos centrada en BP a 964,35.

Ejemplo 11:

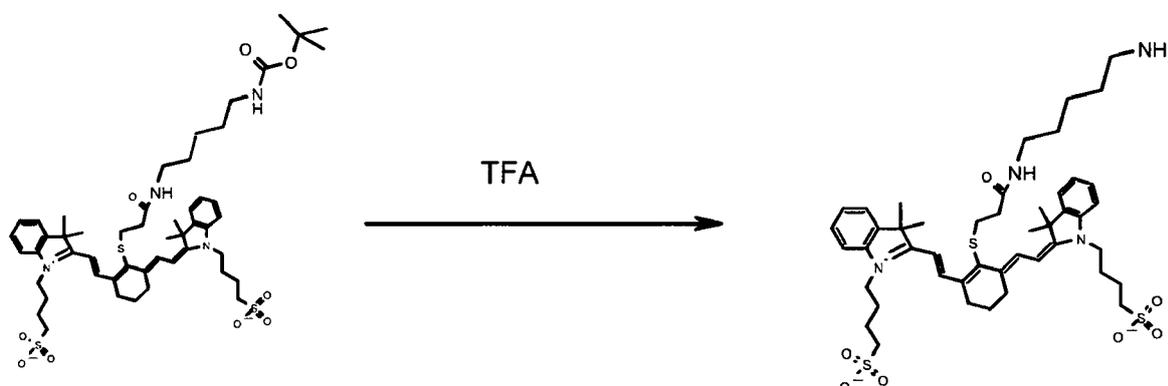
15 *Etapa a*



20 Se disuelven 150 mg de colorante ($1,88 \cdot 10^{-4}$ moles) en 15 ml de DMF. Se añaden sucesivamente: 60 mg de HOBT ($4,44 \cdot 10^{-4}$ moles), 51 mg de TBTU ($1,58 \cdot 10^{-4}$ moles), 84 mg de diamina protegida con terc-butilo ($4,15 \cdot 10^{-4}$ moles) y 0,165 ml de DIPEA ($9,4 \cdot 10^{-4}$ moles). Se agita el medio de reacción una noche a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se aíslan 103,4 mg de producto con un rendimiento del 55%.

25 CL/EM: modo ES⁺, BP a 980,89

Etapa b

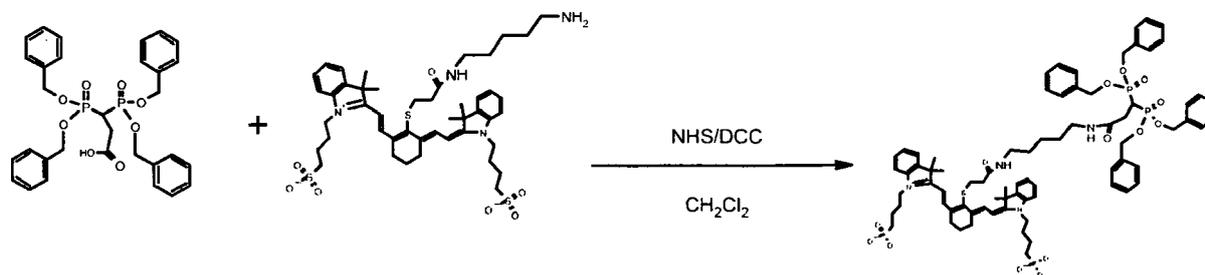


30

Se ponen 103 mg del compuesto preparado en la etapa a ($1,05 \cdot 10^{-4}$ moles) en agitación en 3 ml de TFA/TIS/agua (proporción de 90/2,5/2,5) durante 30 minutos. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa, se obtienen 40 mg de producto, es decir un rendimiento del 43%.

35 CL/EM: modo Es⁺, BP a 879,39; z=1.

Etapa c

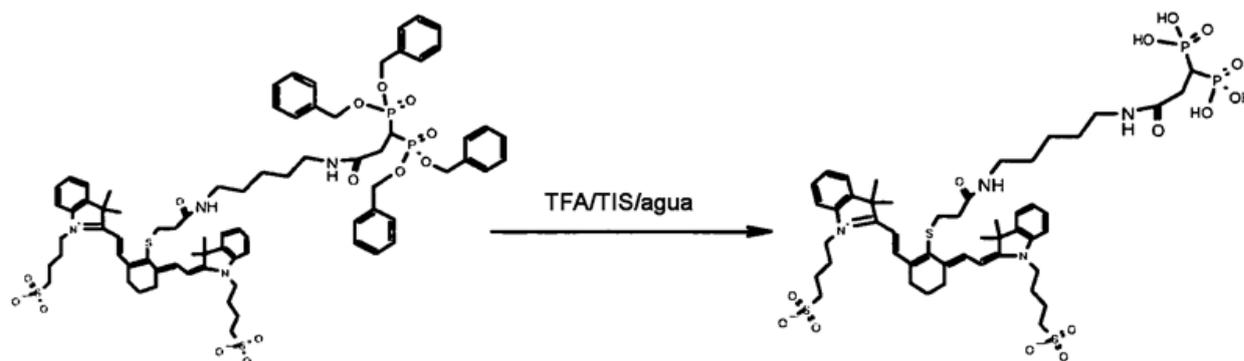


5 Se agitan 26 mg del compuesto obtenido en la etapa c del ejemplo 9 ($4,37 \cdot 10^{-5}$ moles), 18 mg de DCC ($8,72 \cdot 10^{-5}$ moles) y 8 mg de NHS ($6,95 \cdot 10^{-5}$ moles) 3 horas a temperatura ambiente en 5 ml de diclorometano. Se filtra la DCU. Entonces se añaden 40 mg ($4,54 \cdot 10^{-5}$ moles) del colorante obtenido en la etapa b y algunas gotas de TEA. Se mantiene la agitación 3 horas. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se aíslan 12 mg con un rendimiento del 20%.

10

CL/EM: modo ES⁺, BP a 1457,33

Etapa d



15

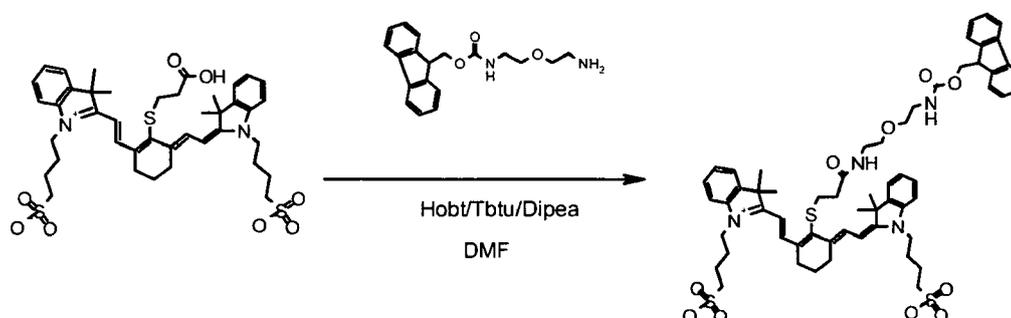
Se agitan 150 mg del compuesto preparado en la etapa anterior ($1,029 \cdot 10^{-4}$ moles) en 4 ml de TFA/TIS/agua (proporciones de 95/2,5/2,5). Se mantiene la agitación 3 horas a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se obtienen 50 mg, es decir un rendimiento del 45%.

20

CL/EM: modo ES⁺, BP a 1094,53 (z=1)

Ejemplo 12:

25 Etapa a

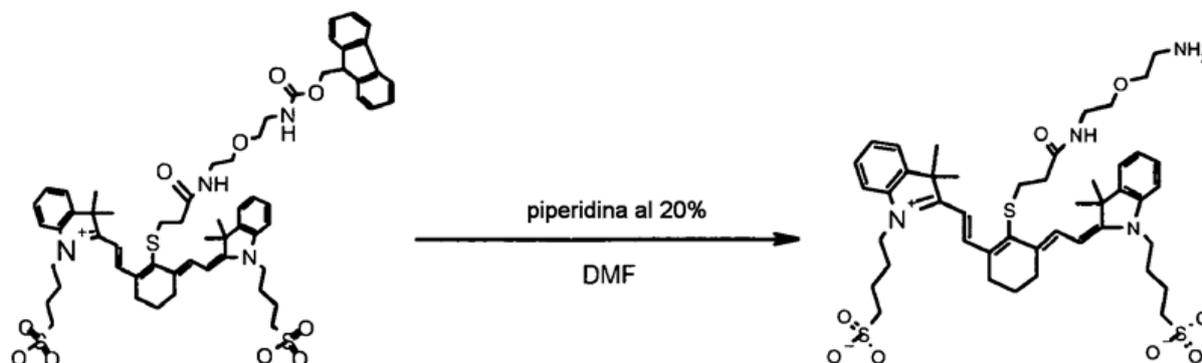


30

Se solubilizan 200 mg de colorante ($2,51 \cdot 10^{-4}$ moles) en 20 ml de DMF. Se añaden sucesivamente: 80 mg de HOBt ($5,92 \cdot 10^{-4}$ moles), 68 mg de TBTU ($2,11 \cdot 10^{-4}$ moles), 0,220 ml de DIPEA ($1,255 \cdot 10^{-3}$ moles) y 108 mg de Fmoc-aminoetioxiethylamina ($3,30 \cdot 10^{-4}$ moles). Se agita el medio de reacción una noche a temperatura ambiente. Se realiza la purificación ultrarrápida con agua/CH₃CN. Se aíslan 178 mg de producto con un rendimiento del 65%.

CL/EM: modo Es⁺, BP a 1103,43 (z=1)

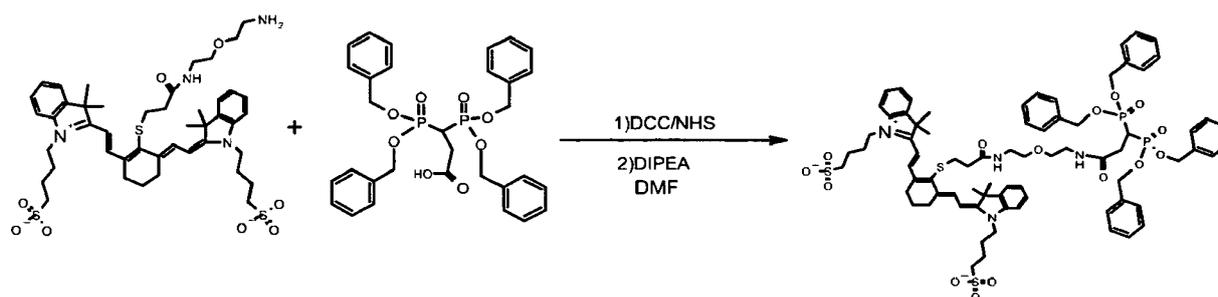
Etapa b



5 Se ponen 80 mg del compuesto preparado en la etapa anterior ($9,0 \cdot 10^{-5}$ moles) en disolución en 6 ml de DMF que contienen piperidina al 20%. Se mantiene la agitación 1 hora a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se obtienen 50 mg de producto, es decir un rendimiento del 40%.

10 CL/EM: modo ES⁺, BP a 880,09 (z=1)

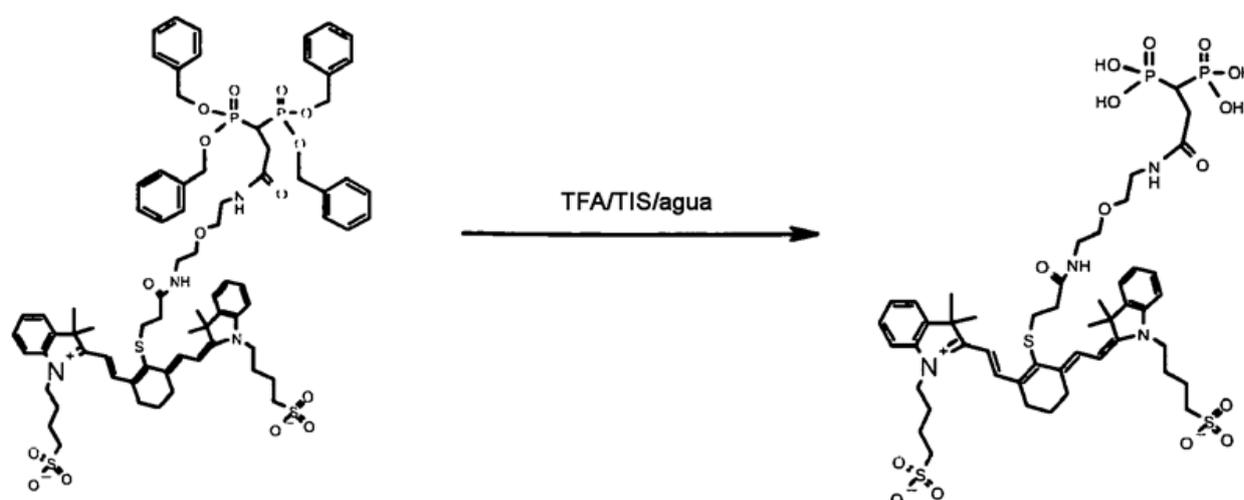
Etapa c



15 Se disuelven 20 mg de pinza bencilada obtenida en la etapa c del ejemplo 9 ($3,36 \cdot 10^{-5}$ moles), 14 mg de DCC ($6,78 \cdot 10^{-5}$ moles) y 6 mg de NHS ($5,21 \cdot 10^{-5}$ moles) en DMF y se agitan durante 3 horas a temperatura ambiente. Se elimina la DCU. Se disuelven 30 mg ($3,4 \cdot 10^{-5}$ moles) del colorante obtenido en la etapa b y 17 ml de DIPEA ($1,02 \cdot 10^{-4}$ moles) en 1 ml de DMF; entonces se añade gota a gota el éster activado. Se mantiene la agitación 3 horas a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se obtienen 30 mg, es decir un rendimiento del 36%.

CL/EM: modo ES⁺, BP a 1458,90 (z=1)

25 Etapa d



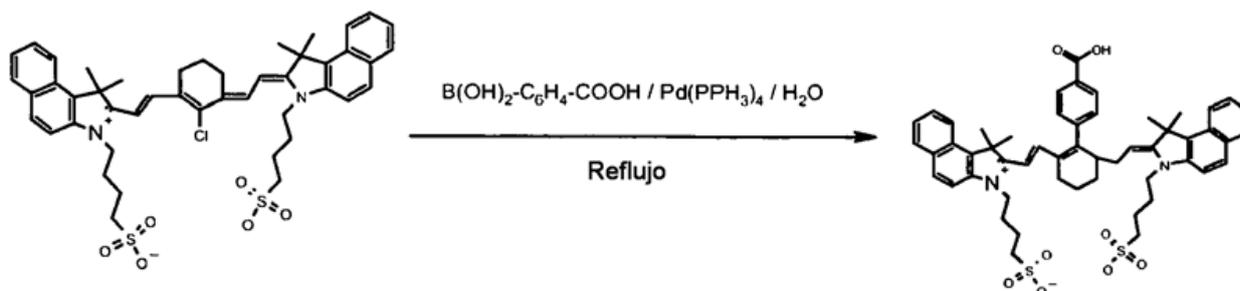
Se disuelven 30 mg del compuesto preparado en la etapa c ($2,03 \cdot 10^{-5}$ moles) en 3 ml de TFA/TIS/agua (proporciones de 95/2,5/2,5) durante 3 h 50 a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida, se obtienen 6 mg, es decir un rendimiento del 35%.

5 CL/EM: modo ES⁺, BP a 1098,21 (z=1) y 550,3 (z = 2).

Ejemplo 13:

Etapa a

10

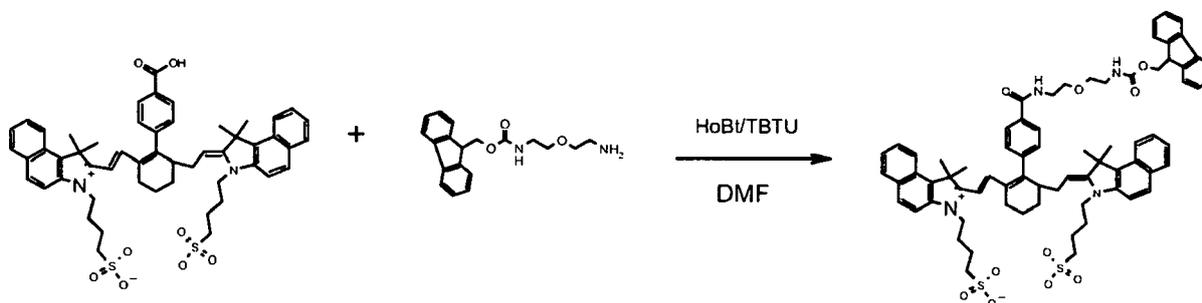


Se calientan 50 mg de IR820 (Aldrich®, $5,88 \cdot 10^{-5}$ moles) y 14,65 mg ($8,82 \cdot 10^{-5}$ moles) de ácido fenilborónico a reflujo en presencia de 10,7 mg ($9,24 \cdot 10^{-6}$ moles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio y de 40,7 mg de K₂CO₃ ($2,9 \cdot 10^{-4}$ moles) durante 24 h a 110°C. Al final de la manipulación, se filtra el paladio. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa, se obtienen 33 mg, es decir un rendimiento del 62%.

15

CL/EM: modo ES⁺, BP a 913,27 (z=1).

20 *Etapa b*

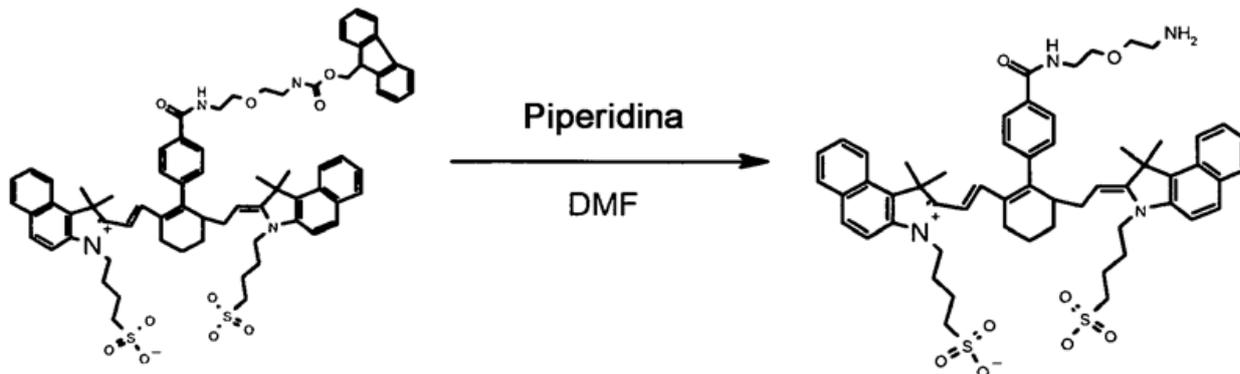


Se ponen 18 mg del compuesto preparado en la etapa a ($1,96 \cdot 10^{-5}$ moles), 7 mg de HOBT ($4,31 \cdot 10^{-5}$ moles), 7 mg de TBTU ($4,70 \cdot 10^{-5}$ moles), 10 mg de Fmoc-aminoetoxietilamina ($2,15 \cdot 10^{-6}$ moles) y 11 μl de DIPEA ($9,8 \cdot 10^{-5}$ moles) en agitación una noche a temperatura ambiente. Se tritura el medio de reacción en éter dietílico (20 mg) y se filtra. Así se aíslan 13 mg de producto con un rendimiento del 55%.

25

Etapa c

30

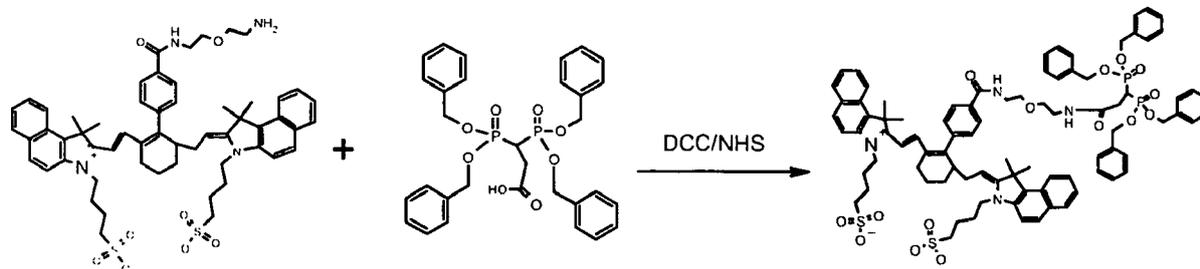


Se ponen 13 mg del compuesto obtenido en la etapa b ($1,06 \cdot 10^{-5}$ moles) en agitación en DMF y piperidina al 20%.

Se mantiene la agitación 30 minutos a temperatura ambiente. Se realiza la precipitación en 20 ml de éter dietílico y la agitación 1 hora a temperatura ambiente. Se obtienen 4,3 mg, es decir un rendimiento del 40%.

Etapa d

5



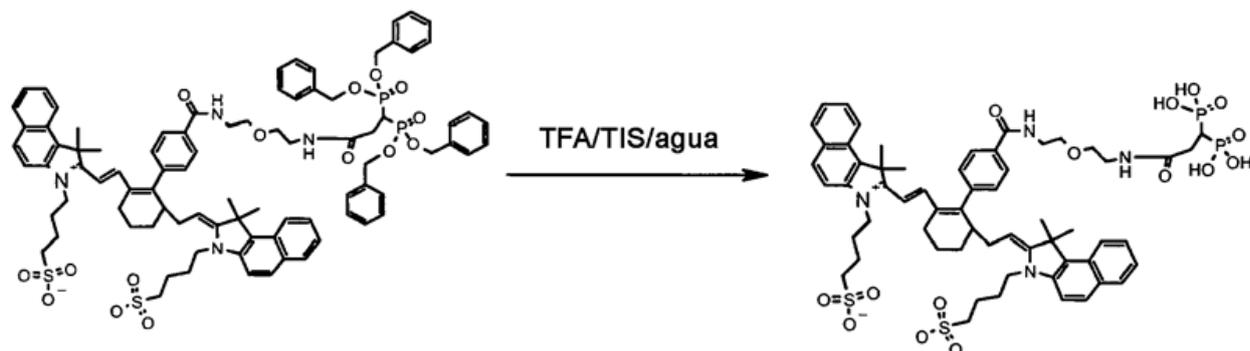
Se disuelven 20 mg del compuesto obtenido en la etapa c del ejemplo 9 ($3,36 \cdot 10^{-5}$ moles), 14 mg de DCC ($6,78 \cdot 10^{-5}$ moles) y 6 mg de NHS ($5,21 \cdot 10^{-5}$ moles) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se elimina la DCU. Se disuelven 35 mg ($3,4 \cdot 10^{-5}$ moles) del colorante obtenido en la etapa c y 17 μ l de DIPEA ($1,02 \cdot 10^{-4}$ moles) en 1 ml de DMF; entonces se añade gota a gota el éster activado. Se mantiene la agitación 3 horas a temperatura ambiente.

10

Se realiza la precipitación en 50 ml de éter etílico. Se obtienen 20 mg, es decir un rendimiento del 37%.

Etapa e

15



Se ponen 20 mg del compuesto preparado en la etapa d ($1,25 \cdot 10^{-5}$ moles) en agitación en 3 ml de TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5) durante 3 h y a temperatura ambiente. Se realiza la purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa. Se aíslan 4 mg, es decir un rendimiento del 26%.

20

Ejemplo 14:

Se añaden gota a gota 60 μ moles del compuesto obtenido en el ejemplo 5 en disolución en 10 ml de agua a una disolución de 1 ml del ejemplo 2 (ferrofluido ácido) a 2,75 M/L diluido en 100 ml de agua. Se agita el conjunto durante 20 minutos a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7,2. Se somete la disolución obtenida a ultrafiltración sobre una membrana que tiene un umbral de corte de 30 kD. Se eliminan 300 ml de filtrado para obtener una disolución final de 10 ml.

30

[Fe] = 0,260 M/L; tamaño de PCS = 28 nm

Tasa de injerto [compuesto de aminoalcohol/Fe] = 2% mol/mol

Ejemplo 15:

Se diluyen 3 ml del compuesto descrito en el ejemplo 2 ([Fe]= 1,336 mol/l) en 100 ml de agua. A esta disolución se le añaden sucesivamente y con un retraso de 15 minutos entre cada adición, una disolución de 46 mg del compuesto descrito en el ejemplo 5 en 2 ml de agua, una disolución de 3,85 mg del compuesto descrito en el ejemplo 7 en 2 ml de agua y finalmente una disolución de 46 mg del compuesto del ejemplo 5 en 2 ml de agua. Se agita la disolución 15 minutos a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7,4 con una disolución de NaOH. Se somete el medio a ultrafiltración sobre una membrana de 30 KD y se lleva el volumen de la disolución a 20 ml para una concentración en hierro de 0,191 mol/l. PCS: 26,8.

40

Ejemplo 16:

Según el protocolo del ejemplo 16, se fijan diferentes combinaciones binarias o ternarias de compuestos de bisfosfonato en proporciones variables sobre las partículas de óxido de hierro descritas en el ejemplo 1 ó 2 tal como se resume en la siguiente tabla:

5

N.º	Partículas	Bifosfonato 1 (% mol)	Bifosfonato 2 (% mol)	Bifosfonato 3 (% mol)	Tamaño de PCS nm
1	Ejemplo 1	Ejemplo 5 (40)	Ejemplo 3 (60)	-	42
2	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (60)	Ejemplo 3 (30)	Ejemplo 7 (10)	28
3	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (95)	Ejemplo 7 (5)	-	27
4	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (90)	Ejemplo 8 (10)	-	26
5	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (95)	Ejemplo 11 (5)	-	28
6	Ejemplo 2	Ejemplo 10 (20)	Ejemplo 3 (80)	-	29
7	Ejemplo 2	Ejemplo 10 (95)	Ejemplo 12 (5)	-	28
8	Ejemplo 2	Ejemplo 10 (80)	Ejemplo 3 (15)	Ejemplo 12 (5)	27
9	Ejemplo 2	Ejemplo 10 (98)	Ejemplo 13 (2)	-	28
10	Ejemplo 2	Ejemplo 10 (100)	-	-	27
11	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (100)	-	-	26
12	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (96)	Ejemplo 12 (2)	Ejemplo 7 (2)	27
13	Ejemplo 2	Ejemplo 5 (50)	Ejemplo 10 (50)	-	28

Las cifras entre paréntesis indican la tasa de recubrimiento, por ejemplo para el n.º 1: el recubrimiento está compuesto al 40% por el compuesto del ejemplo 5 (ligando de aminoalcohol) y al 60% por el compuesto del ejemplo 3 (compuesto de bisfosfonato no unido a un ligando).

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de nanopartículas metálicas que comprenden un núcleo metálico N recubierto con una capa estabilizadora orgánica acoplada a al menos un ligando hidrófilo con efecto sobre la estabilidad/biodistribución de las nanopartículas, que comprende las etapas de:

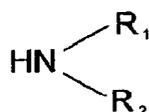
a) preparar el núcleo metálico N de las nanopartículas metálicas;

b) preparar elementos de direccionamiento de fórmula S-C en la que;

• S es un grupo de unión de gem-bisfosfonato de fórmula $X-L-CH(PO_3H_2)_2$;

• C es un ligando de biodistribución hidrófila elegido de:

- los aminoalcoholes de fórmula (II):



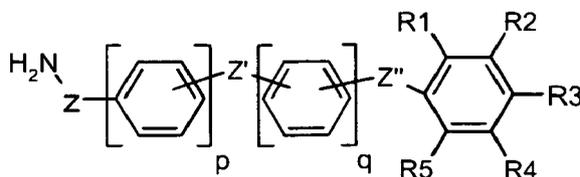
en la que:

R_1 y R_2 son idénticos o diferentes y representan una cadena hidrocarbonada alifática que comprende de 2 a 6 átomos de carbono, sustituida con de 6 a 10 grupos hidroxilo, o bien con de 4 a 8 grupos hidroxilo en el caso en el que R_1 y/o R_2 están interrumpidos por uno o varios átomos de oxígeno,

o R_1 y R_2 representan cada uno independientemente el grupo $-(CH_2)-(CHOH)_4-CH_2OH$ o $-(CH_2)-CHOH-CH_2OH$,

o R_1 representa un grupo $(CH_2)-(CHOH)_4-CH_2OH$ o $-(CH_2)-CHOH-CH_2OH$ mientras que R_2 representa un grupo $-CH_2-(CHOH)_4-CH_2OH$,

- los aminoalcoholes de fórmula (IV):



IV

en la que:

Z es un enlace, CH_2 , CH_2CONH o $(CH_2)_2NHCO$,

Z' es un enlace, O, S, NQ, CH_2 , CO, CONQ, NQCO, NQ-CONS o $CONQCH_2CONQ$,

Z'' es un enlace, CONQ, NQCO o $CONQCH_2CONQ$,

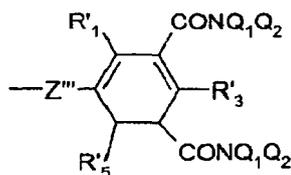
p y q son números enteros cuya suma vale de 0 a 3,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 representan cada uno independientemente H, Br, Cl, I, $CONQ_1Q_2$ o NQ_1COQ_2 ,

con Q_1 y Q_2 idénticos o diferentes elegidos de H, un grupo alquilo (C_1-C_8) mono o polihidroxilado y/o eventualmente interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno, de tal manera que Q_1 y Q_2 comprenden entre ellos dos de 4 a 10 grupos OH;

entendiéndose que al menos uno y como máximo dos de los grupos R_1 a R_5 representa $CONQ_1Q_2$ o NQ_1COQ_2 ;

o bien R_1 , R_3 , R_5 representan cada uno independientemente H, Br, Cl o I y R_2 y R_4 representan



en la que R'₁, R'₃ y R'₅, idénticos o diferentes, representan H, Br, Cl o I;

5 Q₁ y Q₂ tienen el mismo significado que anteriormente;

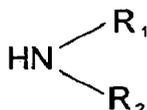
Z''' es un grupo elegido de CONQ, CONQCH₂CONQ, CONQCH₂, NQCONQ, CONQ(CH₂)₂NQCO; y

10 Q es H o alquilo (C₁-C₄), pudiendo dichos grupos alquilo ser lineales o ramificados y estando eventualmente hidroxilados,

- los polietilenglicoles que comprenden una cadena -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_k-CH₂OR₃ en la que k varía de 2 a 100, y R₃ se elige de H, alquilo o -(CO)Alk, en los que alquilo y alk designan un grupo alifático hidrocarbonado, lineal o ramificado, que tiene aproximadamente de 1 a 6 átomos de carbono en la cadena, o

15

- los polietilenglicoles de fórmula (III):



20 en la que:

R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan H, un grupo alquilo o una cadena de polietilenglicol de fórmula -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_k-CH₂OR₃, entendiéndose que al menos uno de los grupos R₁, R₂ representa una cadena de polietilenglicol,

25

en la que k varía de 2 a 100, y

R₃ se elige de H, alquilo C₁-C₆ o -(CO)Alk, designando "alk" un grupo alquilo C₁-C₆;

30 c) injertar en el núcleo N elementos de direccionamiento S-C;

donde:

35 • L representa un grupo orgánico que conecta la función X a la función gem-bisfosfonato -CH(PO₃H₂)₂, siendo L un grupo divalente elegido de:

- un grupo alifático eventualmente sustituido con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de cloro, de yodo o de bromo;

40 - un grupo -L₁-NHCO-L₂ en el que L₁ y L₂ son o bien idénticos o bien diferentes, y representan un grupo alifático; alicíclico; aromático; alicíclico-alifático o aromático-alifático, pudiendo dichos grupos estar eventualmente sustituidos con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de cloro, de yodo o de bromo;

• X representa una función química que puede acoplarse al ligando hidrófilo C y se elige de:

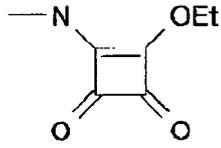
45

--COOH,

- -NH₂, -NCS, -NH-NH₂, -CHO, alquilpirocarbonilo (-CO-O-CO-alk), acilazidilo (-CO-N₃), iminocarbonato (-O-C(NH)-NH₂), vinilsulfurilo (-S-CH=CH₂), piridildisulfurilo (-S-S-Py), haloacetilo, maleimidilo, diclorotriazinilo, halógeno,

50

- el grupo de fórmula:



2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el núcleo metálico se elige de los siguientes: hidróxido de hierro, óxido de hierro hidratado, ferrita, óxido de hierro mixto.
- 5 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ligando hidrófilo de biodistribución es un ligando de aminoalcohol.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ligando hidrófilo de biodistribución es un ligando de polietilenglicol.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 a 4, en el que una parte de los ligandos de biodistribución hidrófila C son ligandos de aminoalcohol, y otra parte son ligandos de polietilenglicol.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que se injertan en el núcleo por un lado elementos de direccionamiento S-C, y por otro lado grupos de estabilización S no portadores de ligandos de biodistribución.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 1 a 6, en el que la tasa de injerto de los elementos de direccionamiento en el núcleo es del 1 al 10%, ventajosamente del 1, 2, 3, 5, 10%.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además injertar elementos S-C-T, en los que C es un ligando de polietilenglicol y T representa un grupo cromóforo.