

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 635**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 33/24** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10727016 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2435031**

54 Título: **Formulaciones de compartimentos múltiples a base de moléculas o macromoléculas anfífilas funcionales**

30 Prioridad:

**29.05.2009 FR 0902607**

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

**19.01.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (50.0%)**

**35 Place Pey Berland**

**33000 Bordeaux, FR y**

**UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARTHELEMY, PHILIPPE;**

**KHIATI, SALIM y**

**CAMPLO, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 556 635 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**

Formulaciones de compartimentos múltiples a base de moléculas o macromoléculas anfífilas funcionales

5 La invención se refiere a nuevas formulaciones de compartimentos múltiples a base de moléculas o macromoléculas anfífilas funcionales según la reivindicación 1 para el transporte o la vectorización de al menos un agente terapéutico, en particular un agente antitumoral así como su procedimiento de preparación, y sus usos.

Entre los agentes antitumorales, el cisplatino es un agente antitumoral ampliamente utilizado, principalmente para el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, su utilización se encuentra limitada por su toxicidad así como la aparición de una resistencia adquirida.

10 Para paliar estos inconvenientes, se han propuesto diferentes formulaciones en la técnica anterior: por ejemplo, la patente estadounidense 5178876 describe derivados de platino en forma de complejo hidrófobo destinados a una encapsulación en liposomas.

La patente estadounidense 6001817 describe composiciones que contienen cisplatino y un vector que comprende al menos un nucleósido o desoxinucleósido.

15 La patente estadounidense 7908160 se refiere a derivados de cisplatino unidos a ligandos, cuya actividad es reversible en función del enlace al ligando.

20 La solicitud WO01/32139 describe composiciones de cisplatino encapsulado en nanopartículas lipídicas obtenidas por ciclos repetidos de calentamiento y congelación, a base de lípidos naturales cargados negativamente, en particular la dioleilfosfatidilserina. Se señala en esta solicitud que el cisplatino forma, en agua, agregados cargados positivamente que presentan una solubilidad más elevada que las especies no cargadas, lo que permite su interacción con las membranas lipídicas cargadas negativamente y la reorganización de las membranas lipídicas alrededor de los agregados de cisplatino.

La solicitud estadounidense US-A-2008/089836 describe nanopartículas revestidas de una bicapa de moléculas formada a partir de:

(a) una capa de moléculas que une la superficie, en contacto directo con la nanopartícula, que comprende:

25 (i) un motivo hidrófobo, y

(ii) un motivo de unión que tiene una afinidad por la nanopartícula y

(b) una capa de moléculas anfífilas, en las que la capa (a) de moléculas que unen la superficie y la capa (b) de moléculas anfífilas están unidas por interacciones hidrófobas.

30 La solicitud WO-A-2009/098404 (mencionada a modo de estado de la técnica con arreglo al artículo 54(3) CBE) transmite un procedimiento de preparación de nanopartículas caracterizadas porque están formadas por un núcleo rico en agente terapéutico, preferentemente un agente antitumoral, rodeado por una o varias capas lipídicas formadas por un compuesto anfífilo funcional y su utilización para el transporte o la vectorización de agentes terapéuticos en particular de agente antitumoral.

35 Sin embargo, existe todavía la necesidad de resolver los problemas ligados a la vectorización de los agentes terapéuticos, en particular los agentes antitumorales.

Principalmente, se investiga un medio que permita un transporte de los agentes terapéuticos (principalmente el cisplatino y/o sus derivados) rápidamente al interior de las células tumorales con una actividad farmacológica elevada, a la vez que preserva las células sanas, es decir reduciendo la toxicidad neurológica, renal, auditiva, digestiva, etc. limitando simultáneamente los fenómenos de aparición de resistencia a este agente terapéutico.

40 También se investiga el proporcionar un vector que presente una estabilidad en el tiempo suficiente para evitar la liberación precoz del agente terapéutico y los inconvenientes ligados a la presencia del agente terapéutico libre en el medio biológico, principalmente en términos de pérdida de actividad y de toxicidad.

45 Por otra parte, la posibilidad de encapsular uno o varios agentes terapéuticos en una misma formulación en diferentes compartimentos de una misma formulación presenta el interés de permitir una liberación simultánea o escalonada de este(os) agente(s) sobre un mismo blanco, pudiendo servir cada uno de los compartimentos de depósito.

50 Se ha encontrado ahora que formulaciones de compartimentos múltiples, formadas a partir de moléculas o de macromoléculas anfífilas funcionales, presentaban propiedades de estabilidad mejorada, en particular a 37°C, permitiendo una vectorización prolongada en el tiempo de dichos agentes terapéuticos y permitiendo la liberación intracelular eficaz y rápida de agentes terapéuticos.

5 La invención tiene por lo tanto como objetivo, según un primer aspecto, una formulación de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula, que tiene un diámetro medio de aproximadamente 1 a 200 nm formada por un núcleo sólido que contiene un agente terapéutico, rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de moléculas o de macromoléculas anfifílicas funcionales, en la que cada capa lipídica está formada por al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se define más adelante.

Por "nanopartícula", se entiende una partícula que tiene un diámetro medio de aproximadamente 1 a 200 nm, preferentemente de 25 a 150 nm.

10 En la parte siguiente de la descripción se entiende por "nanopartícula según la invención" o "nanopartícula de compartimentos múltiples" una formulación de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula formada por un núcleo sólido que contiene un agente terapéutico, rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de moléculas o de macromoléculas anfifílicas funcionales, en la que cada capa lipídica está formada por al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se define más adelante.

Ventajosamente, cada capa lipídica constituye un compartimento susceptible de comprender un agente terapéutico idéntico o diferente al presente en el núcleo.

15 Según un aspecto ventajoso, las formulaciones de compartimentos múltiples según la invención se forman a partir de dichas capas lipídicas de polaridad diferente en presencia del o de los agente(s) terapéutico(s) y no a partir de una partícula preformada, lo que permite una encapsulación "a la carta" del principio activo en el o los compartimento(s) deseado(s), en función de la actividad deseada.

20 Esta estructura particular confiere a las nanopartículas de compartimentos múltiples según la invención una estabilidad (duración de vida) compatible con la liberación de un agente terapéutico, y permite su disgregación después de la liberación de este agente terapéutico.

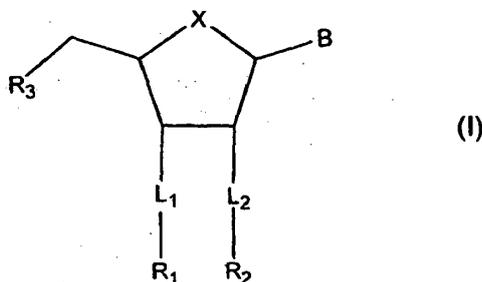
Preferentemente, la primera capa lipídica estará constituida por uno o varios lípido(s) aniónico(s) y la segunda capa lipídica estará constituida por uno o varios lípido(s) catiónico(s).

25 Por "de polaridad diferente", se entiende que cada capa lipídica sucesiva que rodea el núcleo está formada por lípidos diferentes a la anterior y que cada capa tiene una carga de superficie global bien negativa (formada por lípidos aniónicos), bien positiva (formada por lípidos catiónicos), o bien neutra (formada por lípidos neutros). Por ejemplo, una primera capa lipídica puede estar formada por lípidos aniónicos y llevará una carga de superficie negativa, mientras que la segunda capa lipídica puede estar formada por lípidos catiónicos y llevará una carga de superficie positiva.

30 La carga de superficie de cada una de las capas se mide por su potencial zeta, por ejemplo, según la técnica descrita en Andrea Mayer et al. Toxicology, 2009, 258, 139-147 o K. Furusawa y K. Uchiyama, 1988, 140, 217-226.

Según un aspecto ventajoso, las nanopartículas de compartimentos múltiples según la invención pueden comprender una alternancia de capas lipídicas aniónicas y catiónicas y una capa externa formada por uno o varios lípidos neutro(s).

35 Según la invención, cada capa lipídica está formada por al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I):



en la que:

- X representa un átomo de oxígeno, azufre o un grupo metileno,
  - B representa una base púrica o pirimídica tal como el uracilo, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina, o sus derivados, o incluso una base heterocíclica mono o bicíclica no natural en la que cada ciclo comprende 4 a 7 eslabones, eventualmente sustituida;
  - L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan el hidrógeno, un grupo oxicarbonilo -O-C(O)-, un grupo tiocarbamato -O-C(S)-NH-, un grupo carbonato -O-C(O)-O-, un grupo carbamato -O-C(O)-NH-, un átomo de oxígeno,
- 40

un grupo fosfato, un grupo fosfonato o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, sustituido o no sustituido con una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>,

o también, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, juntos, forman un grupo cetal de fórmula:



5 o también L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> representa hidrógeno, y el otro representa un grupo hidroxilo o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, no sustituido o sustituido con una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>:

- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan:

10 o una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente de C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub>, principalmente de C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub>, saturada o parcialmente insaturada, eventualmente total o parcialmente fluorada, no sustituida o sustituida en el carbono del extremo de la cadena con un átomo de flúor o con un éster o un éter bencílico o naftílico, o

o una cadena diacilo en la que cada cadena acilo de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, o

o un grupo diacilglicerol, esfingosina o ceramida, o

15 o cuando L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> representa hidrógeno, y el otro representa un grupo hidroxilo o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> no existen;

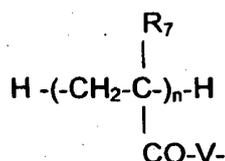
- R<sub>3</sub> representa:

o un grupo hidroxilo, amino, fosfato, fosfonato, fosfatidilcolina, O-alquil-fosfatidilcolina, tiofosfato, fosfonio, NH<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, NHR<sub>4</sub>R<sub>5</sub> o NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>R<sub>6</sub> en los que R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o hidroxialquilo lineal o ramificado de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o

20 o una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> eventualmente sustituida con un grupo hidroxilo, o

o un resto ciclodextrina, o

o un resto



en el que V representa un enlace -O-, -S-, o -NH-, R<sub>7</sub> representa H o CH<sub>3</sub>, y n= 1 a 500, o

25 o un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-V-R<sub>8</sub>, en el que R<sub>8</sub> representa un alquilo de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, y n=1 a 500, o

o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, no sustituido o sustituido con un alquilo de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, o con un grupo (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-R<sub>9</sub> en el que m = 1 a 6 y p = 0 a 10 y R<sub>9</sub> representa un grupo cetal cíclico que contiene 5 a 7 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con al menos un alquilo lineal o ramificado de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> o con un resto esterol, o también

30 o R<sub>3</sub> está unido por enlace covalente a otro sustituyente R<sub>3</sub>, idéntico o diferente, de otro compuesto de fórmula (I), idéntico o diferente, para formar un compuesto de fórmula (I) en forma de dímero,

y cada capa lipídica tiene una polaridad diferente de la de la anterior.

La carga de los compuestos de fórmula (I) está determinada por los grupos polares que contienen, estando éstos esencialmente presentes en o formados por los sustituyentes L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub>.

35 Compuestos de fórmula (I) aniónicos utilizables para preparar la primera capa lipídica pueden ser elegidos, por ejemplo, entre nucleolípidos aniónicos tales como compuestos de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado negativamente tal como, por ejemplo, un grupo fosfato, fosfonato, carboxilato, sulfato, etc., eventualmente sustituido.

Compuestos de fórmula (I) catiónicos utilizables para preparar la primera capa lipídica pueden ser elegidos, por ejemplo, entre nucleolípidos catiónicos tales como compuestos de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado positivamente tal como, por ejemplo, un grupo amonio, fosfonio, imidazol, etc., eventualmente sustituido.

5 La carga de estos grupos polares también puede variar en función del pKa de estos grupos, por ejemplo cuando se trata de un grupo amina, imidazol, fosfato, etc.

Por "agente terapéutico", se entiende, por ejemplo, una molécula natural o sintética utilizada para la prevención o el tratamiento de una patología o la restauración de una función biológica, *in vitro* o *in vivo*, en particular en los animales, incluido el ser humano, o incluso en células aisladas, con excepción de los ácidos nucleicos o sus fragmentos.

10 Dicha molécula se puede elegir, por ejemplo, entre los principios activos de medicamentos, en particular entre los agentes antitumorales tales como, por ejemplo:

- los complejos de platino, entre los que se pueden citar principalmente el cisplatino, el carboplatino, el oxaliplatino, el nedaplatino, el lobaplatino, etc., o

15 • el rutenio capaz de unirse a complejos de platino, o incluso

- los complejos inorgánicos sin platino a base de rutenio II y/o III, de titanio, por ejemplo el dicloruro de titanoceno, o de galio, por ejemplo las sales de galio tales como el nitrato de galio, el cloruro de galio, el KP46, o

- los derivados de hierro, tales como, por ejemplo, las sales de ferroceno, los análogos nucleosídicos que contienen hierro, los complejos de hierro (II) que contienen ligandos piridil-pentadentato, o

20 • los derivados del cobalto, tales como, por ejemplo, los complejos de hexacarbonil-dicobalto, los complejos de alquino-cobalto, el complejo de Co(III) que contienen un ligando de mostaza de nitrógeno, o

- los derivados de oro tales como, por ejemplo, el Auranofin, los complejos de oro (I), (II) y (III), aurotioglucosa, etc.

25 Ventajosamente, la formulación de compartimentos múltiples según la invención permite encapsular estas moléculas y asegurar su liberación intracelular limitando los fenómenos de resistencia adquirida a estos compuestos.

Los complejos de platino, en particular el cisplatino, son agentes terapéuticos preferidos para los objetivos de la invención.

30 Complejos inorgánicos a base de rutenio II y/o III, pueden ser, por ejemplo, los complejos llamados NAMI-A, RAPTA-C, KP1019. Tales complejos no platinados se describen en Ott I. y Gust R., Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2007, 340, 117-126 ; Reedijk J., Curr Opin Chem Biol., 1999, 3, 236-40 ; Haimei Chen et al., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 173-186.

Análogos nucleosídicos que contienen hierro se describen en Schlawe D. et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 1731-1734.

35 De forma ventajosa, se ha encontrado que las estructuras moleculares y/o macromoleculares que forman los compuestos de fórmula (I), que comprenden al menos un ligando del agente terapéutico (nucleobase, nucleósido, nucleósido modificado, nucleótidos, oligonucleótido, heterociclo, etc.) representado por el sustituyente B, y que presenta un carácter anfífilo debido a la presencia de al menos una parte hidrófila (fosfato, carboxilato, etc.), y al menos una parte hidrófoba (segmentos hidrófobos monocatenarios, bicatenarios y partes polares derivadas de sintones de origen biológico, etc.), permitan formar con el agente terapéutico nanopartículas estables.

40 Por la combinación de las propiedades anfífilas de los compuestos de fórmula (I), de la presencia de ligandos del agente terapéutico (principio activo) en estos compuestos y de las eventuales interacciones electrostáticas entre los agentes terapéuticos y estos compuestos, las nanopartículas así obtenidas presentan una estructura que permite una liberación intracelular eficaz y rápida de los principios activos encapsulados, en particular de los agentes antitumorales.

45 Sin pretender ligar la invención a una teoría, se puede emitir la hipótesis según la cual las interacciones intermoleculares de los compuestos de fórmula (I) inducen un aumento de las fuerzas de cohesión en la superficie de las nanopartículas, lo que se traduce en una estabilidad mayor en el tiempo, en las condiciones de utilización.

La estructura de compartimentos múltiples de las nanopartículas según la invención, a base de capas lipídicas múltiples que tienen una polaridad modulable, les confiere numerosas ventajas, en particular:

50 • una estabilidad mayor, principalmente en medio biológico,

- la modulación del potencial de superficie (potencial zeta) en función de su eficacia en la utilización prevista,
- su funcionalización (introducción de una funcionalidad, agente de diana, etc.),
- la incorporación de diferentes agentes terapéuticos.

5 Ventajosamente, dichas nanopartículas presentan igualmente una duración de vida compatible con su utilización como vector de agente terapéutico.

En la fórmula (I) anterior, n está ventajosamente comprendido entre 1 y 500, preferentemente comprendido entre 1 y 100, principalmente comprendido entre 1 y 50, muy particularmente comprendido entre 1 y 10.

Por "alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>", se entiende por ejemplo un radical metilo, etilo, propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, terc-butilo, preferentemente metilo o etilo.

10 Igualmente, en la fórmula (I) anterior, la base púrica o pirimídica, o la base heterocíclica no natural se puede sustituir con al menos un sustituyente elegido, por ejemplo, entre un halógeno, un grupo amino, un grupo carboxi, un grupo carbonilo, un grupo carbonilamino, un grupo hidroxilo, azido, ciano, alquilo, cicloalquilo, perfluoroalquilo, alquilo (por ejemplo, metoxi), oxicarbonilo, vinilo, etinilo, propinilo, acilo, etc.

15 Se entiende por "base heterocíclica no natural" una base diferente al uracilo, adenina, guanina, citosina, timina o hipoxantina, que no existe en la naturaleza.

Por "grupo heteroarilo que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno", se entiende un grupo carbocíclico monocíclico o bicíclico, aromático o parcialmente insaturado, que contiene 5 a 12 átomos, interrumpido con 1 a 4 átomos de nitrógeno, en particular los grupos pirazol, triazol, tetrazol o imidazol.

20 Para la preparación de los compuestos de fórmula (I), se puede hacer referencia a la solicitud WO 2005/116043, que describe diferentes vías de acceso a este tipo de compuestos (véase principalmente p. 8-17 y ejemplos).

25 La invención se refiere igualmente, según un aspecto posterior, a un procedimiento de preparación de una formulación de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula sólida formada por un núcleo que contiene un agente terapéutico, rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de moléculas o macromoléculas anfífilicas funcionales tal como se ha definido en la reivindicación 1, en la que cada capa lipídica constituye un compartimento susceptible de comprender un agente terapéutico idéntico a o diferente del que está presente en el núcleo, que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una mezcla de al menos un compuesto anfífilico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, y de un agente terapéutico,

30 b) someter dicha mezcla a ciclos repetidos de calentamiento y congelación, de forma que se obtengan nanopartículas que contienen dicho agente terapéutico, y

c) recuperar las nanopartículas que contienen dicho agente terapéutico así obtenidas,

d) poner dichas nanopartículas en presencia de al menos un compuesto anfífilico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, que tenga una polaridad diferente al que se ha preparado en la etapa a), y

e) recuperar las nanopartículas multi-compartimentos así obtenidas.

35 Preferentemente, el agente terapéutico es un agente antitumoral, en particular un complejo de platino, en particular el cisplatino.

Ventajosamente, las etapas del procedimiento podrán repetirse el número de veces necesario para obtener el número de capas lipídicas deseado.

40 De forma opcional, se podría realizar entre la etapa d) y la etapa e) una etapa suplementaria que consiste en la formación de una capa lipídica neutra formada por al menos una molécula o macromolécula anfífilica funcional, en particular un compuesto anfífilico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, siendo dicha molécula o dicho compuesto de fórmula (I) neutro.

Según un aspecto preferido, se utilizará en la etapa a) y/o la etapa d), como complemento del compuesto anfífilico funcional, al menos un co-lípido.

45 Por "co-lípido", se entiende un compuesto utilizado en asociación con el compuesto de fórmula (I), que participa en la elaboración de la estructura de la o de las capa(s) lipídica(s) de la nanopartícula.

Se utilizará, preferentemente, un co-lípido de ión híbrido.

Dicho co-lípido se puede elegir, por ejemplo, entre la dioleilfosfatidilcolina (DOPC), la dioleilfosfatidiluridina-fosfatidilcolina (DOUPC) o la dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE).

5 Estos compuestos pueden desempeñar un papel de co-lípidos cuando se utilizan mezclados con un compuesto de fórmula (I). Alternativamente, pueden estar comprendidos en la fórmula (I), como por ejemplo, la dioleilfosfatidiluridina-fosfatidilcolina (DOUPC). En este caso, desempeñarán, bien el papel de compuesto de fórmula (I), o bien, en combinación con otro compuesto de fórmula (I), el papel de co-lípido.

Según otro aspecto ventajoso, se introduce en la etapa d) un agente terapéutico idéntico o diferente al utilizado en la etapa a).

10 Preferentemente, el o los compuesto(s) anfifílico(s) funcional(es) de fórmula (I) utilizado(s) en la etapa a) es (son) aniónico(s) y el o los compuesto(s) anfifílico(s) funcional(es) de fórmula (I) utilizado(s) en la etapa d) es (son) catiónico(s).

Ventajosamente, se utilizará un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) neutro para formar la capa lipídica más externa, que se podrá efectuar entre la etapa d) y la etapa e).

15 Más particularmente, el procedimiento de preparación de las formulaciones de compartimentos múltiples puede comprender las etapas realizadas en las siguientes condiciones generales, que ilustran, por ejemplo, la obtención de una formulación de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula formada por un núcleo sólido que contiene un agente terapéutico, rodeado de dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de compuestos de fórmula (I):

20 **1) Formación de nanopartículas según la invención que comprenden un núcleo rico en agente terapéutico y una primera capa lipídica**

- se pone en disolución un compuesto de fórmula (I) en un disolvente orgánico para formar una mezcla lipídica, y luego el disolvente se evapora para formar una primera película lipídica;
- paralelamente, la cantidad deseada de agente terapéutico, preferentemente un agente antitumoral, se pone en disolución en agua destilada;
- 25 • la primera película lipídica se rehidrata en la disolución de agente terapéutico, preferentemente un agente antitumoral. Se obtiene una disolución clara por sonicación y calentamiento;
- la disolución se enfría rápidamente, por ejemplo por inmersión en nitrógeno líquido. Este ciclo calentamiento/enfriamiento se efectúa preferentemente de 1 a 10 veces, en particular de 5 a 10 veces, principalmente 10 veces;
- 30 • después de sonicación y centrifugación de la suspensión obtenida, se separa el sobrenadante y el residuo se vuelve a poner en suspensión;
- después de centrifugación, el residuo se separa y el sobrenadante se recupera.

**2) Formación de nanopartículas según la invención que comprenden un núcleo rico en agente terapéutico y dos capas lipídicas de polaridad diferente**

- 35 • se prepara una segunda película lipídica a partir de un compuesto de fórmula (I) de polaridad diferente a la del compuesto de fórmula (I) utilizado en la primera parte del procedimiento;
- se rehidrata la segunda película lipídica con el sobrenadante anteriormente recuperado,
- después de sonicación y centrifugación de la suspensión obtenida, se separa el sobrenadante y el residuo se vuelve a poner en suspensión;
- 40 • después de centrifugación, el residuo se separa y el sobrenadante se recupera, conteniendo las nanopartículas de compartimentos múltiples que comprenden dos capas lipídicas de polaridad diferente.

Ventajosamente, se repiten las etapas del procedimiento anterior el número de veces necesario para obtener el número de capas lipídicas deseadas.

Preferentemente, el número de capas lipídicas estará comprendido entre 2 y 6.

45 De forma opcional, se podrá efectuar durante la 2ª parte del procedimiento, antes de la etapa final, una etapa suplementaria que consiste en la formación de una capa lipídica formada por al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, siendo dicho compuesto de fórmula (I) neutro, permitiendo la recuperación de las nanopartículas de compartimentos múltiples según la invención.

Según un aspecto preferido, se utilizará durante la formación de la mezcla lipídica en la primera parte de la preparación descrita anteriormente, o en su segunda parte, como complemento del compuesto de fórmula (I), al menos un co-lípido, tal como se ha definido anteriormente.

5 Formulaciones preferidas según la invención son aquellas en las que la primera capa lipídica es aniónica y la segunda capa lipídica es catiónica.

El disolvente orgánico se puede elegir, por ejemplo, entre los disolventes orgánicos habituales en este campo, tales como el cloroformo o el diclorometano, un alcohol tal como el metanol o el etanol, etc.

10 El calentamiento se efectúa, preferentemente, a una temperatura del orden de 20°C a 80°C, y el enfriamiento a una temperatura del orden de -190°C (nitrógeno líquido) a 0°C (hielo). Un ciclo calentamiento/enfriamiento apropiado puede, por ejemplo, ser de 45°C para el calentamiento y de -78°C para el enfriamiento.

Preferentemente, el agente terapéutico se elige entre los complejos de platino (cisplatino, carboplatino, ...), siendo el cisplatino particularmente preferido, o bien el rutenio capaz de unirse a complejos de platino, o incluso los complejos inorgánicos sin platino a base de rutenio II o III, de titanio, de galio, de cobalto, de hierro o de oro mencionados anteriormente.

15 La relación molar R del compuesto de fórmula (I)/agente terapéutico puede estar comprendida, por ejemplo, entre 0,01 a 50, en particular R = 0,2.

Las nanopartículas obtenidas se pueden extraer eventualmente con un filtro de policarbonato que tenga, por ejemplo, un diámetro de poros del orden de 100 o 200 nm.

20 Se obtienen así nanopartículas de compartimentos múltiples que están formadas por un núcleo sólido rico en agente terapéutico (principio activo) rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas por el compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, con o sin co-lípido.

Según un aspecto del procedimiento, dicha mezcla lipídica contiene únicamente al menos un compuesto de fórmula (I) y no contiene co-lípido.

25 Se utilizará preferentemente el agente terapéutico a una concentración del orden de 0,1 ng/mL a 10 mg/mL en la fase acuosa, de forma que la liberación intracelular del principio activo sea importante.

Compuestos preferidos de fórmula (I) utilizables para formar una capa lipídica son aquellos en los que X representa el oxígeno.

Los compuestos de fórmula (I) en los que B representa la timina o la adenina son igualmente compuestos preferidos.

30 Los compuestos de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado negativamente tal como, por ejemplo, un grupo fosfato, fosfonato, carboxilato, sulfato, etc., eventualmente sustituidos, son compuestos preferidos para obtener una capa lipídica aniónica.

Los compuestos de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado positivamente tal como, por ejemplo, un grupo amonio, fosfonio, imidazolio, etc., eventualmente sustituidos, son compuestos preferidos para obtener una capa lipídica catiónica.

35 Según un aspecto preferido, la invención se refiere a nanopartículas de compartimentos múltiples tal como se han definido anteriormente que comprenden estos compuestos de fórmula (I) y un agente terapéutico, en particular un agente antitumoral, en particular los complejos de platino (tales como, por ejemplo, el cisplatino, el carboplatino, el oxaliplatino, el nedaplatino, el lobaplatino), o el rutenio capaz de unirse a complejos de platino, o incluso complejos inorgánicos sin platino a base de rutenio, titanio, galio, cobalto, hierro u oro mencionados anteriormente. El cisplatino es un agente antitumoral preferido para los fines de la invención.

40 Los compuestos de fórmula (I) también pueden comprender derivados de base púrica o pirimídica que tengan una actividad antineoplásica, tales, como por ejemplo, la ara-citosina (AraC), el 5-fluorouracilo (5-FU), la iododesoxiuridina (IdU), la 2'-desoxi-2'-metilidencitidina (DMDC) o la 5-cloro-6-azido-5,6-dihidro-2'-desoxiuridina.

45 La invención tiene también como objetivo la utilización de las nanopartículas de compartimentos múltiples descritos anteriormente, como agentes para el transporte o la vectorización de agentes terapéuticos, en particular de agentes antitumorales.

En particular, la invención se refiere a la utilización de las nanopartículas de compartimentos múltiples descritas anteriormente, como agentes para la liberación intracelular de agentes terapéuticos, en particular de agentes antitumorales.

50 La invención se refiere también a la utilización de las nanopartículas de compartimentos múltiples descritas anteriormente, para la preparación de medicamentos antitumorales.

La invención se refiere también a las nanopartículas de compartimentos múltiples descritas anteriormente, para el tratamiento de enfermedades tumorales, en particular de cánceres, tales como, por ejemplo, los cánceres de ovario, de testículo, de colon, del cuello del útero, del pulmón, o el adenocarcinoma, etc.

5 Dichas nanopartículas de compartimentos múltiples son susceptibles de ser obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente.

10 La invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden formulaciones de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula formada por un núcleo sólido que contiene un agente terapéutico, rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de moléculas o macromoléculas anfifílicas funcionales (o nanopartículas de compartimentos múltiples), tal como se han descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

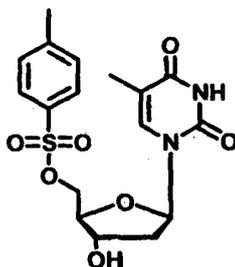
La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

15 El conjunto de los productos de partida proceden de proveedores de productos químicos (Aldrich, Alfa Aesar y Avanti Polar Lipid) y son utilizados sin purificación posterior. Los disolventes se han utilizado sin destilación suplementaria. Los compuestos sintetizados se han caracterizado mediante la ayuda de métodos analíticos espectroscópicos estándar tales como RMN  $^1\text{H}$  a 300,13 MHz,  $^{13}\text{C}$  a 75,46 MHz y  $^{31}\text{P}$  a 121,49 MHz) y espectroscopía de masas (Características). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en RMN se expresan en ppm y con respecto al TMS. Las constantes de acoplamiento J en RMN del  $^1\text{H}$  se expresan en Hz. Se han utilizado placas Merck RP-18 F254s para la cromatografía en capa fina (CCM). Se ha utilizado sílice SEPHADEX LH-20 (25-100  $\mu\text{m}$ ) para las purificaciones mediante cromatografías cuantitativas.

20 Los ejemplos siguientes, titulados "Preparación" describen la preparación de intermedios de síntesis utilizados para preparar los compuestos de fórmula (I). La preparación de los compuestos de fórmula (I) y el estudio de las nanopartículas según la invención se describen a continuación en los ejemplos de síntesis y los ensayos titulados "Ejemplo".

#### Preparación 1

##### 25 5'- paratoluensulfonilimidina



30 En un matraz de dos bocas en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 2 g de timidina (8,26 mmol) en disolución 0,1 M en piridina anhidra. La disolución se enfría entonces a 0°C y se añaden 3,935 g de cloruro de ácido paratoluenosulfónico (2,5 equivalentes, 20,6 mmol) en pequeñas fracciones. Se deja que el medio de reacción vuelva a temperatura ambiente y luego se agita durante 10 horas. La reacción se detiene entonces por adición de 10 mL de metanol, manteniendo la agitación durante 30 min. Se añaden a la mezcla 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y luego se lava sucesivamente con 20 mL de una disolución al 5% de  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mL de una disolución saturada de  $\text{NaCl}$  y 20 mL de una disolución al 5% de  $\text{NaHCO}_3$ . El disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene puro mediante recristalización en metanol.

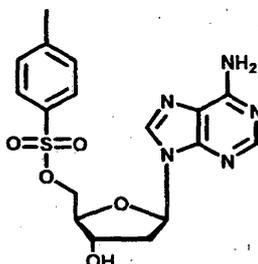
35 RF: 0,47 (AcOEt/MeOH 9/1)

Rendimiento: 75 %

RMN  $^1\text{H}$  (300,13 MHz, DMSO  $d_6$ ):  $\delta$  1,77 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  2,11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  3,52 (t,  $j = 6$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,18 (m, 1H, CH),  $\delta$  4,25 (m, 3H, CH,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  5,42 (s, 1H, OH),  $\delta$  6,15 (t,  $j = 6$  Hz, H, CH),  $\delta$  7,38 (s, 1 H, CH),  $\delta$  7,46 (s, 1 H, CH),  $\delta$  7,49 (s, 1 H, CH),  $\delta$  7,78 (s, 1H, CH),  $\delta$  7,81 (s, 1 H, CH),  $\delta$  11,28 (s, 1 H, NH).

40 RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz, DMSO  $d_6$ ):  $\delta$  12,5 ( $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  21,6 ( $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  38,9 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  70,4 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  70,6 (CH),  $\delta$  83,7 (CH),  $\delta$  84,5 (CH),  $\delta$  110,3 (C),  $\delta$  128,1 (CH ar),  $\delta$  130,6 (2 CH ar),  $\delta$  132,6 (C ar),  $\delta$  136,4 (C ar),  $\delta$  145,6 (C),  $\delta$  150,8 (C=O),  $\delta$  164,1 (C=O).

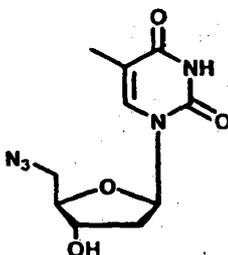
EM Alta  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 397,1

**Preparación 2****2'-desoxi-5'-toluenosulfoniladenosina**

- 5 En un matraz de dos bocas en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 2 g de 2'-desoxiadenosina (8 mmol) en disolución 0,1 M en piridina anhidra. La disolución se enfría entonces a 0°C y se añaden 3,793 g de cloruro de ácido paratolueno sulfónico (2,5 equivalentes, 20 mmol) en pequeñas fracciones. Se deja que el medio de reacción vuelva a temperatura ambiente y luego se agita durante 10 horas. La reacción se detiene entonces por adición de 10 mL de metanol, manteniendo la agitación durante 30 min. Se añaden a la mezcla 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego se lava sucesivamente con 20 mL de una disolución al 5% de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mL de una disolución saturada de NaCl y 20 mL de una disolución al 5% de NaHCO<sub>3</sub>. El disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene
- 10 puro mediante recristalización en metanol. Se aíslan así 2,1 g de un producto blanco.

RF: 0,37 (AcOEt/MeOH 9/1)

Rendimiento: 63%

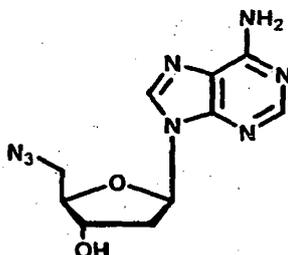
**Preparación 3****15 5'-azido-5'-desoxitimidina**

- 20 En un matraz de dos bocas provisto de un refrigerante y en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 2 g de 5'-paratoluenosulfoniltimidina (5 mmol) tal como se ha descrito en la preparación 1 en disolución 0,1M en DMF. Se añaden 1,3 g de aziduro de sodio (4 equivalentes, 20 mmol). Se agita entonces la disolución y se calienta a 110°C durante 10 h. La mezcla se enfría a temperatura ambiente. Se añaden a la mezcla 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego se lava sucesivamente 2 veces con 15 mL de agua y luego con 15 mL de una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio y luego el disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene puro mediante recristalización en metanol. Se obtienen así 0,8 g de un sólido blanco.

RF: 0,47 (AcOEt/MeOH 9/1)

- 25 Rendimiento: 60%

EM [M+H]<sup>+</sup>: 268.1

**Preparación 4****5'-azido-5',2'-didesoxiadenosina**

En un matraz de dos bocas provisto de un refrigerante y en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 2 g de 2'-desoxi-5'-paratoluenosulfoniladenosina tal como se ha descrito en la preparación 2 (5 mmol) en disolución 0,1M en DMF. Se añaden 1,3 g de aziduro de sodio (4 equivalentes, 20 mmol). Se agita entonces la disolución y se calienta a 110°C durante 10 h. La mezcla se enfría a temperatura ambiente. Se añaden a la mezcla 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego se lava sucesivamente 2 veces con 15 mL de agua y luego con 15 mL de una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio y luego el disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene puro mediante recristalización en metanol. Se obtienen así 0,8 g de un sólido blanco.

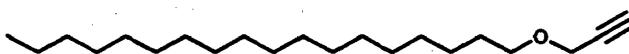
RF: 0,37 (AcOEt/MeOH 9/1)

Rendimiento: 60%

10 EM Alta resolución [M+H]<sup>+</sup>: masa calculada: 277,1161, masa medida: 277,1157

### Preparación 5

#### 1-propargilooctadecano



15 En un matraz limpio y seco, en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 673 mg de alcohol propargílico (12 mmol) en disolución 0,5M en DMF. La disolución se enfría entonces a 0°C y se añaden 180 mg de hidruro de sodio (0,625 equivalentes, 7,5 mmol) en pequeñas fracciones. El medio de reacción se deja volver a temperatura ambiente. Se añaden 2 g de 1-bromo-octadecano (0,5 equivalentes, 6 mmol). La agitación se mantiene durante 5 horas. La reacción se detiene entonces por adición de 10 mL de metanol y la agitación se mantiene durante 30 min. Se añaden a la mezcla 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego se lava sucesivamente 2 veces con 20 mL y luego con 20 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca entonces sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y luego el disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene puro después de separación en columna cromatográfica (hexano). Se aíslan así 1,2 g de un producto blanco.

RF: 0,82 (Hexano)

Rendimiento: 65%

25 RMN <sup>1</sup>H (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0,90 (t, j = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), δ 1,28 (s, 30H, CH<sub>2</sub>), δ 1,61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), δ 2,43 (t, j = 3 Hz, 1H, CH), δ 3,53 (t, j = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), δ 4.15 (d, j = 3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 14,2 (CH<sub>2</sub>), δ 22,7 (CH<sub>2</sub>), δ 26,1 (CH<sub>2</sub>), δ 29,4 (CH<sub>2</sub>), δ 29,5 (CH<sub>2</sub>), δ 29,6 (CH<sub>2</sub>), δ 32,0 (CH<sub>2</sub>), δ 58,0 (CH<sub>2</sub>), δ 70,4 (CH<sub>2</sub>), δ 74,1 (CH), δ 80,1 (C).

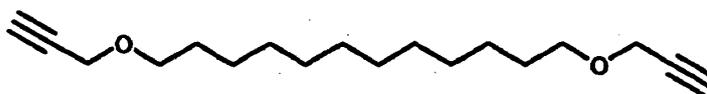
### Preparación 6

30 **1,12-propargiloxidodecano**

#### 12-propargiloxidodecan-1-ol

35 En un matraz limpio y seco, en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introduce 1 g de dodecan-1,12-diol (5 mmol) en disolución 0,5M en DMF. La disolución se enfría entonces a 0°C y se añaden 360 mg de hidruro de hidrógeno (3 equivalentes, 15 mmol) en pequeñas fracciones. El medio de reacción se deja volver a temperatura ambiente. Se añaden 1.49 g de bromuro de propargilo (2,5 equivalentes, 12,5 mmol). La agitación se mantiene durante 5 horas. La reacción se detiene entonces por adición de 10 mL de metanol, manteniendo la agitación durante 30 min. Se añaden a la mezcla 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego se lava sucesivamente 2 veces con 20 mL y luego con 20 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca entonces sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y luego el disolvente se elimina a presión reducida. Los productos obtenidos se separan entonces en columna cromatográfica (Hex/ActEth 9/1). Dos productos se aíslan, es decir 370 mg de un aceite pardo correspondiente al 1,12-propargiloxidodecano y 430 mg de un sólido pardo correspondiente al 12-propargiloxidodecan-1-ol.

#### 1,12-propargiloxidodecano



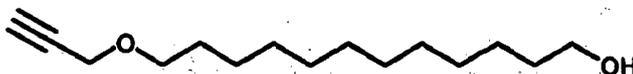
RF: 0,53 (Hexano/AcOEt 9/1)

45 Rendimiento: 27%

RMN  $^1\text{H}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1,31 (m, 16H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,61 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,43 (t,  $j = 3$  Hz, 1H, CH),  $\delta$  3,52 (t,  $j = 6$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,15 (d,  $j = 3$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  26,1 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,4 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,5 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,6 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  58,0 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  70,3 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  74,1 (CH),  $\delta$  80,1 (C).

5 **12-propargiloxidodecan-1-ol**



RF: 0,10 (Hexano/AcOEt 9/1)

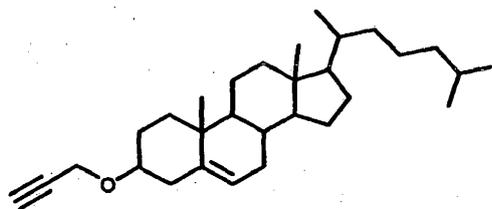
Rendimiento: 36%

10 RMN  $^1\text{H}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1,32 (m, 16H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,43 (t,  $j = 3$  Hz, 2H, CH),  $\delta$  3,52 (t,  $j = 6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3,65 (t,  $j = 6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,15 (d,  $j = 3$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  25,8 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  26,0 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,4 (2  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,5 (2  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  29,6 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  32,7 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  57,9 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  62,7 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  70,2 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  74,2 (CH),  $\delta$  79,9 (C).

**Preparación 7**

***o*-propargilcolesterol**



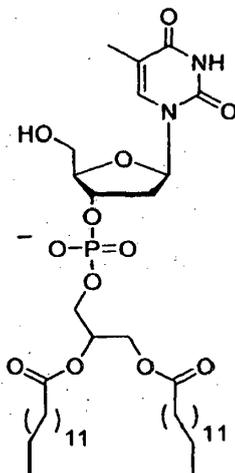
15 En un matraz limpio y seco, en atmósfera de nitrógeno anhidro, se introducen 500 g de colesterol (1,3 mmol) en disolución 0,5M en DMF. La disolución se enfría entonces a 0°C y se añaden 47 mg de hidruro de sodio (1,5 equivalentes, 2 mmol) en pequeñas fracciones. Se deja volver el medio de reacción a temperatura ambiente y se añaden 238 mg de bromuro de propargilo (1,5 equivalentes, 2 mmol). La agitación se mantiene durante 5 horas. La reacción se detiene entonces por adición de 10 mL de metanol y la agitación se mantiene durante 30 min. Se añaden a la mezcla 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y luego se lava sucesivamente 2 veces con 20 mL y luego con 20 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca entonces sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y luego el disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto esperado se obtiene después de purificación en columna cromatográfica (hexano /AcOEt 8/2). Se aíslan así 215 mg de un producto blanco.

25 RF: 0,83 (Hexano/AcOEt 8/2)

Rendimiento: 39%

**Ejemplo 1**

**3'-(1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato) de timidina (di c14dT)**



5'-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxitimidina,3'-[(2-ciano-etil)-N,N-diisopropil] fosforamidita (0,500 g, 1 eq, 0,67 mmol), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol (0,447 g, 1,3 eq, 0,87 mmol) y una disolución de tetrazol 0,45M en acetonitrilo (2 mL, 1,3 eq, 0,87 mmol), se disuelven en 4 mL de acetonitrilo anhidro en nitrógeno. El medio de reacción se pone con agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se oxida a continuación por adición de 43 mL de una disolución de dióxido 0,02M en THF/Pyr/H<sub>2</sub>O. Después de 12 h a temperatura ambiente, el disolvente se evapora a vacío. Se disuelve el residuo en 8 mL de diclorometano. A continuación, se añaden 0,2 mL de 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (1,3 eq, 0,87 mmol) al medio de reacción durante 5 h. El medio de reacción se lava con una disolución de HCl 0,1N y luego con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. La fase orgánica se concentra a vacío. El compuesto se obtiene después de purificación por cromatografía ultrarrápida (381 mg) utilizando un gradiente de elución (MeOH/DCM 9:1 hasta 1:1).

Rendimiento: 69%

Rf: 0,34 (DCM/MeOH 9 :1)

*RMN 1H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 0,84 (t, 6H, J=6,92 Hz, 2\*CH<sub>3</sub>), 1,21 (m, 40H, 20\*CH<sub>2</sub>), 1,42 (dd, 4H, J1=8,45 Hz, J2=15,68 Hz, 2\*CH<sub>2</sub>), 1,89 (s, 3H, Me), 2,30 (dd, 4H, J1=7,43 Hz, J2=15,92 Hz, 2\*CH<sub>2</sub>), 2,83 (t, 2H, J=5,84, H<sub>2'</sub>), 3,84 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 4,09-4,35 (m, 7H, 2\*CH<sub>2</sub>(glicerol), H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>), 5,27 (s, 1H, CHglicerol), 6,22 (t, 1H, J=6,81 Hz, H<sub>1'</sub>), 7.61 (s, 1H, Hbase).

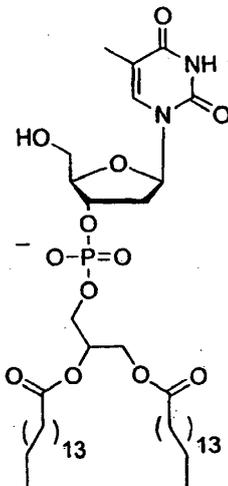
*RMN 13C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 19,29 (CH<sub>3</sub>), 23,71 (CH<sub>2</sub>), 26,57 (CH<sub>2</sub>), 28,73 (CH<sub>2</sub>), 32,76 (CH<sub>2</sub>), 37,85 (CH<sub>2</sub>), 48,90 (CH<sub>2</sub>), 166,15 (C=O).

*RMN 31P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 0,61.

Masa Alta Resolución FAB- teórico m/z = 815,4823 observado m/z = 815,4794.

## Ejemplo 2

### 3'-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato) de timidina (di c16dT)



5'-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxitimidina,3'-[(2-ciano-etil)-N,N-diisopropil] fosforamidita (0,500 g, 1 eq, 0,67 mmol), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol (0,496 g, 1,3 eq, 0,87 mmol/solubilizado en 3 mL de THF) y una disolución de tetrazol 0,45M en acetonitrilo (2 mL, 1,3 eq, 0,87 mmol), se disuelven en 3 mL de acetonitrilo anhidro en nitrógeno. El medio de reacción se pone con agitación magnética a temperatura ambiente y en nitrógeno durante 24 horas. La mezcla se oxida a continuación por adición de 43 mL de una disolución de dióxido 0,02M en THF/Pyr/H<sub>2</sub>O. Después de 12 h a temperatura ambiente, el disolvente se evapora a vacío y se seca en bomba con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante toda la noche. Se disuelve el residuo en 8 mL de diclorometano; A continuación, se añaden 0,2 mL de 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (1,3 eq, 0,87 mmol) al medio de reacción durante 5 h. El medio de reacción se lava con una disolución de HCl 0,1N y luego con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La fase orgánica se concentra a vacío. El compuesto se obtiene después de purificación por cromatografía ultrarrápida (180 mg) utilizando un gradiente de elución (MeOH/DCM 98:2 hasta 1:1).

Rendimiento: 24%

Rf: 0,3 (DCM/MeOH 8:2)

*RMN 1H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 0,88 (t, 6H, J=6,9 Hz, 2\*CH<sub>3</sub>), 1,25 (m, 48H, 24\*CH<sub>2</sub>), 1,42 (dd, 4H, J1=8,4 Hz, J2=15,6 Hz, 2\*CH<sub>2</sub>), 1,90 (s, 3H, Me), 2,33 (m, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>), 2,83 (t, 2H, J=5,6 Hz, H<sub>2'</sub>), 3,84 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 4,09-4,35 (m, 7H, 2\*CH<sub>2</sub>(glicerol), H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>), 5,27 (s, 1H, CH glicerol), 6,21 (t, 1H, J=6,7 Hz, H<sub>1'</sub>), 7,54 (s, 1H, H base).

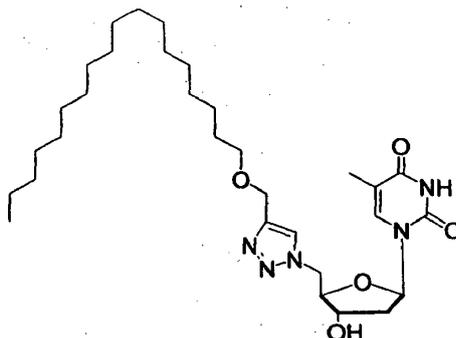
*RMN 13C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 12,4 (CH<sub>3</sub> base), 14,1 (CH<sub>3</sub> cadena), 19,6 (CH<sub>2</sub>), 19,7 (CH<sub>2</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 24,8 (CH<sub>2</sub>), 29,1-29,6 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 33,9 (CH<sub>2</sub>), 34,1 (CH<sub>2</sub>), 61,5 (CH<sub>2</sub>), 61,7 (CH<sub>2</sub>), 62,5 (CH<sub>2</sub>), 62,6 (CH<sub>2</sub>), 66,1 (CH<sub>2</sub>), 66,2 (CH<sub>2</sub>), 69,1 (CH), 78,8 (CH), 85,5 (CH), 86,1 (CH), 111,3 (C base), 136,8 (CH base), 150,5 (C=O base), 164,1 (C=O base), 173,0 (C=O cadena), 173,5 (C=O cadena).

5 *RMN 31P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>):* δ en ppm 2,1.

Masa ESI-: teórico m/z = 872,5 observado m/z = 871,3.

### Ejemplo 3

#### 5'-(4-hexadeciloximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoxitimidina



10 En un matraz, se introducen 200 mg de 5'-azido-5'-desoxitimidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,75 mmol) y 231 mg de 1-propargiloxioctadecano tal como se ha descrito en la preparación 5 (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden entonces, sucesivamente: 30 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,15 mmol) y 12 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,075 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. Se obtienen 180 mg de un sólido blanco después de cromatografía en columna de sílice (AcOEt/MeOH 8/2).

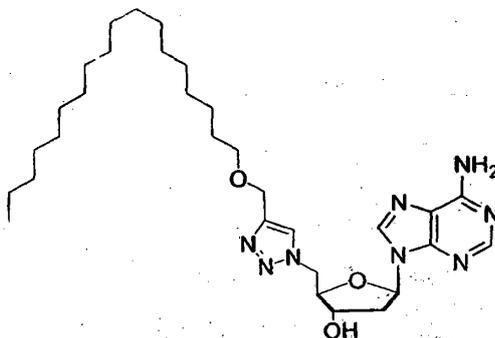
RF: 0,72 (AcOEt/MeOH 8/2)

Rendimiento: 42%

EM Alta resolución [M+H]<sup>+</sup>: masa calculada: 576,4125, masa medida: 576,4120

### 20 Ejemplo 4

#### 5'-(4-Hexadeciloximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoxiadenosina



25 En un matraz, se introducen 200 mg de 5'-azido-5',2'-didesoxiadenosina tal como se ha descrito en la preparación 4 (0,72 mmol) y 223 mg de 1-propargiloxioctadecano tal como se ha descrito en la preparación 5 (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden entonces, sucesivamente: 30 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,15 mmol) y 12 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,075 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas y luego la mezcla se enfría a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. Se obtienen 150 mg de un sólido blanco después de cromatografía en columna de sílice (AcOEt/MeOH 8/2).

30 RF: 0,65 (AcOEt/MeOH 8/2)

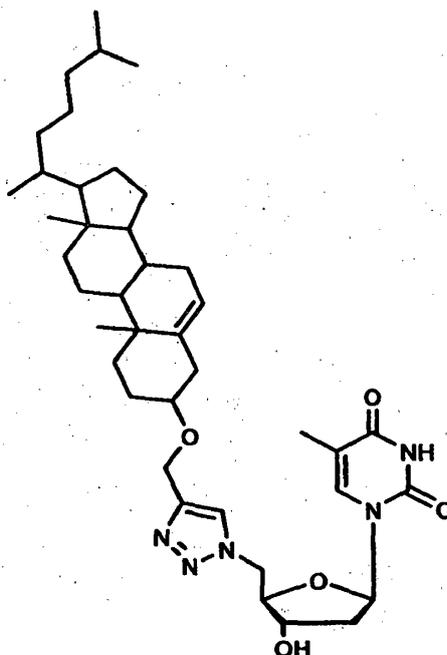
Rendimiento: 35%

RMN  $^1\text{H}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  0,89 (t,  $j = 6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,26 (m, 30H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,54 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3,06 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3,45 (t,  $j = 6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,50 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ , CH),  $\delta$  4,89 (m, ???),  $\delta$  5,88 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ),  $\delta$  6,40 (t,  $j = 6$  Hz, 1H, CH),  $\delta$  7,42 (s, 1H, CH),  $\delta$  7,81 (s, 1H, CH),  $\delta$  8,35 (s, 1H, CH).

EM Alta resolución  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : masa calculada: 585,4241, masa medida: 585,4254

## 5 Ejemplo 5

### 5'-(4-((O-colesteril)-metil)-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoxitimidina



En un matraz, se introducen 170 mg de 5'-azido-5'-desoxitimidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,63 mmol) y 270 mg de *o*-propargilcolesterol tal como se ha descrito en la preparación 7 (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden, sucesivamente: 20 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,13 mmol) y 10 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,063 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. El compuesto se obtiene puro por cromatografía en columna (AcOEt/MeOH 8/2). Se obtienen 260 mg de un sólido blanco.

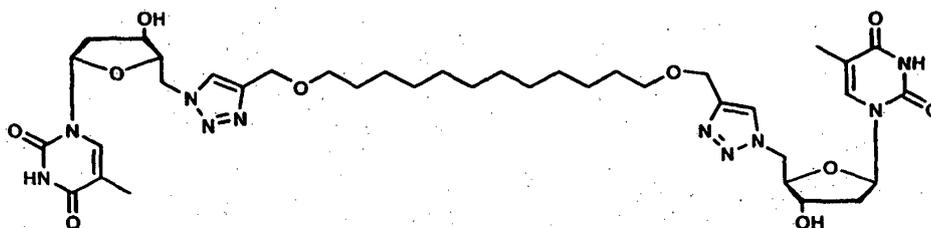
15 RF: 0,57 (AcOEt/MeOH 8/2)

Rendimiento: 59%

EM  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 692,3

## Ejemplo 6

### 1,12-bis-[5'-(4-(metil)-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoxitimidina]-oxidodecano



20 En un matraz, se introducen 100 mg de 5'-azido-5'-desoxitimidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,375 mmol) y 52 mg de 1,12-dipropargiloxidodecano preparado a partir del compuesto descrito en la preparación 6 (0,5 equivalentes) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añade, sucesivamente: 15 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,075 mmol) y 6 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,0375 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación.

25

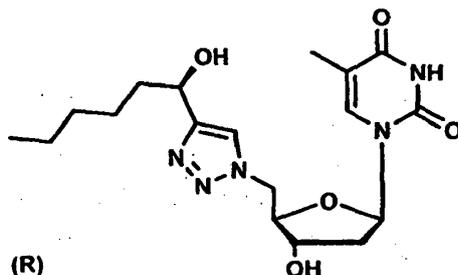
El compuesto se obtiene puro por cromatografía en columna (AcOEt/MeOH 8/2). Se obtienen 90 mg de un sólido blanco.

Rendimiento: 59%

5 RMN <sup>1</sup>H (300,13 MHz, MeOH d<sub>4</sub>): δ 1,28 (m, 16H, CH<sub>2</sub>), δ 0,83 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ 1,89 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ 2,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), δ 2,25 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ 3,51 (t, *j* = 6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), δ 4,18 (m, 2H, CH) δ 4,42 (m, 2H, OH) δ 4,58 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), δ 4,76 (qd, *j* = 6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), δ 6,21 (t, *j* = 6 Hz, 2H, CH), δ 7,23 (s, 2H, CH), δ 7,99 (s, 2H, CH).

### Ejemplo 7

#### 5'-(4-(1(*R*)-hidroxi-hexil)-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoximidina



10 En un matraz, se introducen 215 mg de 5'-azido-5'-desoximidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,8 mmol) y 101,5 mg de (*R*)-oct-1-in-3-ol (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden, sucesivamente: 31,5 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,15 mmol) y 13 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,075 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe entonces inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. El compuesto se obtiene puro por cromatografía en columna (AcEt/MeOH 9/1). Se obtienen 240 mg de un sólido blanco.

15

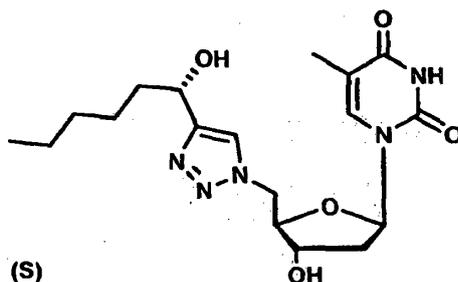
RF: 0,48 (AcEt/MeOH 9/1)

Rendimiento: 76%

EM Alta resolución [M+H]<sup>+</sup>: masa calculada: 576,4125, masa medida: 576,4120

### 20 Ejemplo 8

#### 5'-(4-(1(*S*)-hidroxi-hexil)-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoximidina

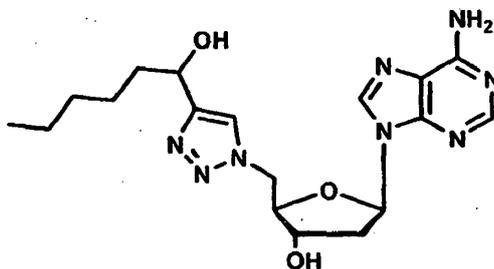


25 En un matraz, se introducen 215 mg de 5'-azido-5'-desoximidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,8 mmol) y 101,5 mg de (*S*)-oct-1-in-3-ol (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden, sucesivamente: 31,5 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,15 mmol) y 13 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,075 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe entonces inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. El compuesto se obtiene puro por cromatografía en columna (AcOEt/MeOH 85/15). Se obtienen 255 mg de un sólido blanco.

30 RF: 0,48 (AcOEt/MeOH 85/15)

Rendimiento: 78%

EM Alta resolución [M+H]<sup>+</sup>: masa calculada: 576,4125, masa medida: 576,4120

**Ejemplo 9****5'-(4-(1-hidroxi-hexil)-[1,2,3]triazol-1-il)-5',2'didesoxiadenosina**

5 En un matraz, se introducen 200 mg de 5'-azido-5'-desoxitimidina tal como se ha descrito en la preparación 3 (0,75 mmol) y 95 mg de la mezcla racémica de oct-1-in-3-ol (1 equivalente) en disolución 0,1M en una mezcla de THF y agua (1/1). Se añaden, sucesivamente: 30 mg de ascorbato de sodio (0,2 equivalentes, 0,15 mmol) y 12 mg de sulfato de cobre (0,1 equivalentes, 0,075 mmol). El medio de reacción se agita y se calienta a 60°C durante 5 horas. La mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente. El medio de reacción se absorbe inmediatamente sobre sílice y el disolvente se elimina por evaporación. El compuesto se obtiene puro por cromatografía en columna (AcOEt/MeOH 8/2). Se obtienen 240 mg de un sólido blanco.

10 RF: 0,47 (AcOEt/MeOH 8/2)

Rendimiento: 80%

EM Alta resolución [M+H]<sup>+</sup>: masa calculada: 576,4125, masa medida: 576,4120

**Ejemplo 10: preparación de las nanopartículas de compartimentos múltiples**

15 Se utiliza como compuesto de fórmula (I) aniónico el compuesto 3'-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato) de timidina (di C16 dT) preparado en el ejemplo 2, como co-lípido la dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y como compuestos de fórmula (I) catiónica el compuesto tosilato de (N-[5'-(2',3'-dioleoil)uridina]-N',N',N'-trimetilamonio) (DOTAU) preparado tal como se describe en Pauline Chabaud et al., Bioconjugate Chem., 2006, 17, 466-472.

**1) Preparación de las disoluciones madre**

20 a) Preparación de la disolución de cisplatino:

Se disuelven 15 mg de cisplatino en 10 mL de agua milliQ (concentración final: 5 mM). Esta suspensión se agita durante 1 minuto (vortex), y luego se incuba a 37°C durante 24 h.

b) Preparación de las disoluciones de lípidos:

25 Disolución A: se disuelven 20 mg del diC16dT en 2 mL de diclorometano (10 mg/mL). Esta muestra se almacena a -20°C.

Disolución B: DOPC: disolución de 20 mg/mL en diclorometano almacenada a -20°C.

Disolución C: DOTAU: disolución de 20 mg/mL en diclorometano almacenada a -20°C.

**2) Preparación de la formulación lipídica para la primera capa**

30 En un tubo Eppendorf® de 2 mL, se mezclan 52,3 µL de la disolución A con 47,2 µL de la disolución B. Estos volúmenes corresponden a una relación de 1/1 de los dos lípidos en moles.

El diclorometano se evapora en nitrógeno de forma que se obtenga una película lipídica homogénea.

**3) Preparación de las nanopartículas (primera capa lipídica aniónica)**

35 Se utilizan 1,2 mL de la disolución de cisplatino preincubada a 37°C para rehidratar la película lipídica previamente preparada. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante una noche. Se realiza una serie de 10 ciclos de calentamiento (baño maría a 55°C) y de congelación (nieve carbónica/metanol -72°C).

**4) Lavado y recuperación de las nanopartículas que comprenden una primera capa lipídica aniónica**

Una vez haya terminado la serie de 10 ciclos, la suspensión se agita y se pone en un tubo de hemólisis de vidrio y luego se somete a sonicación durante 7 minutos. Después de sonicación, la suspensión se centrifuga a 10.000

rpm/5min/20°C. El sobrenadante se tira y el residuo de las nanopartículas se vuelve a poner en suspensión en 1 mL de agua milliQ. Esta etapa se repite una segunda vez.

La suspensión se centrifuga a 1.000 rpm/2,5min/20°C. El residuo se tira y el sobrenadante contiene las nanopartículas aniónicas.

- 5 El potencial zeta, medido según la técnica descrita en Andrea Mayer et al. Toxicology, 2009, 258, 139-147 o K. Furusawa y K. Uchiyama, 1988, 140, 217-226, es de  $-43,3 \pm 6$  mV.

**5) Preparación de las nanopartículas que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica.**

- 10 En un tupo Eppendorf® de 2 mL, se depositan 180 µL de la disolución C. El diclorometano se evapora con nitrógeno comprimido de forma que se obtenga una película lipídica homogénea.

**6) Lavado y recuperación de las nanopartículas de compartimentos múltiples (capa de superficie catiónica)**

La película lipídica catiónica se rehidrata con la suspensión de las nanopartículas aniónicas preparada en la etapa 4).

Se realiza una agitación con vortex durante 5 minutos seguida de sonicación de un minuto.

- 15 La suspensión se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos a 20 °C para eliminar los lípidos no unidos a las nanopartículas. El sobrenadante se elimina y luego el residuo se rehidrata con 1 mL de agua milliQ.

La suspensión se centrifuga a 1.000 rpm/2,5min/20°C. El residuo se tira y el sobrenadante contiene las nanopartículas multi-compartimentos de capa de superficie catiónica.

El potencial zeta, medido como antes, es de  $42,3 \pm 8$  mV.

**20 Ejemplo 11: ensayo de estabilidad (% de cisplatino liberado)**

Las nanopartículas preparadas según el protocolo del ejemplo 10 se dosifican por ICP-óptico (el valor medido corresponde a la concentración total). La suspensión de las nanopartículas es alicuotada en 5 tubos Eppendorf® (150 µL). Estos últimos se incuban a 37°C con agitación (300 rpm) durante diferentes tiempos (0, 2,5, 5, 10 y 24 h).

- 25 Para un tiempo dado (x), el tubo se centrifuga a 14.000 rpm/10min/20°C y se dosifican 50 µL de sobrenadante (recuperado lentamente para no volver a poner el residuo en suspensión).

Se preparan nanopartículas a base de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DOPS) con 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) como co-lípido según el mismo protocolo a modo comparativo. Estas nanopartículas comprenden una sola capa lipídica aniónica.

El porcentaje de liberación de cisplatino se calcula según la siguiente ecuación:

30 
$$\% \text{ de cisplatino liberado} = \frac{C_x - C_0}{C_t - C_0}$$

Cx: concentración encontrada a un tiempo dado (x).

C0: concentración encontrada en el sobrenadante antes de incubación.

Ct: concentración total encontrada sin incubación y sin centrifugación.

La curva de liberación del cisplatino en función del tiempo de incubación se representa en la figura 1.

- 35 Las nanopartículas que comprenden una sola capa lipídica aniónica obtenidas al término de la etapa 4 del ejemplo 10 (denominadas NP-) se representan por el símbolo  $\blacklozenge$ , las nanopartículas según la invención (denominadas NP+) que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica obtenidas al término de la etapa 6 del ejemplo 10 se representan por el símbolo  $\blacksquare$  y las nanopartículas a base de DOPC/DOPS (denominadas PS) por el símbolo  $\blacktriangle$ .

- 40 Los resultados muestran que el tiempo de semivida (tiempo de incubación necesario para liberar el 50% del cisplatino) es superior a 24 h para las nanopartículas NP+ según la invención, mientras que para las nanopartículas de base DOPC/DOPS es del orden de 6,5 h.

- 45 Además, después del mismo tiempo de incubación (6,5 h), se observa que las nanopartículas NP- (monocapa) han liberado más del 30% de su contenido en cisplatino, mientras que las nanopartículas NP+ según la invención han liberado menos del 20% de cisplatino, lo que subraya las propiedades destacadas de estabilidad de las nanopartículas NP+ a 37°C.

**Ejemplo 12: ensayo de estabilidad (% de cisplatino liberado) en presencia de suero de feto de ternera**

Las nanopartículas preparadas según el protocolo del ejemplo 10 se dosifican por ICP-óptico (el valor medido corresponde a la concentración total). La suspensión de las nanopartículas es alicuotada en 5 tubos Eppendorf® (150 µL). Estos últimos se centrifugan a 10.000 rpm durante 5 min a 20°C. 50 µL del sobrenadante se dosifican por ICP óptico y los 100 µL restantes se separan. El residuo que contiene las nanopartículas se rehidrata con 150 µL de suero de feto de ternera (SVF, ref Invitrogen10270-106). Las muestras se incuban a 37°C con agitación (300 rpm) durante diferentes tiempos (0, 2,5, 5, 10 y 24 h).

Para un tiempo dado (x), el tubo se centrifuga a 14.000 rpm/10min/20°C y se dosifican 50 µL de sobrenadante (recuperado lentamente para no volver a poner el residuo en suspensión).

10 Se preparan nanopartículas a base de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DOPS) con 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) como co-lípido según el mismo protocolo a modo comparativo.

El porcentaje de liberación de cisplatino se calcula según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de cisplatino liberado} = \frac{C_x - C_0}{C_t - C_0}$$

Cx: concentración encontrada a un tiempo dado (x).

15 C0: concentración encontrada en el sobrenadante antes de incubación y antes de contacto con el SVF.

Ct: concentración total encontrada sin incubación y sin centrifugación.

La curva de liberación del cisplatino en función del tiempo de incubación se representa en la figura 2.

20 Las nanopartículas según la invención (denominadas NP+) que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica obtenidas en el ejemplo 10 se representan por el símbolo -■- y las nanopartículas a base de DOPC/DOPS (denominadas PS) por el símbolo -▲-

Los resultados muestran que el tiempo de incubación necesario para liberar el 90% del cisplatino es superior a 24 h para las nanopartículas NP+ según la invención, mientras que para las nanopartículas PS es inferior a 2 h.

**Ejemplo 13: dosificación del cisplatino intracelular****Protocolo**

25 Se tratan células IGROV1 (línea de adenocarcinoma ovárico sensible al cisplatino) al 80% de confluencia (placa de 10 cm de diámetro) con 100 µM de cisplatino libre o encapsulado en las nanopartículas del ejemplo 10 durante 2, 4 ó 6 h. Al final de este tratamiento se efectúan dos lavados con PBS. Las células se tratan con tripsina y se ponen en suspensión en PBS. Se efectúan dos lavados de las suspensiones celulares con PBS (centrifugación 1.000 rpm/1min). Las células se ponen en suspensión en 1 mL de PBS y se cuentan.

30 Se procede de la misma manera con células SKV03 (línea de adenocarcinoma ovárico resistente al cisplatino).

**Dosificación por ICP-óptico**

10<sup>6</sup> células son lisadas con 500 µL de la disolución de lisis celular (tampón de lisis de SIGMA). El volumen se completa con agua milliQ al 1% de ácido HNO<sub>3</sub> para alcanzar 5 mL.

**Resultados**

35 Los resultados se representan en la figura 3, que muestra la concentración de cisplatino liberado después de la lisis celular (expresado en nanomoles/10<sup>6</sup>células/100µM de tratamiento) en función del tiempo, correspondiente a la concentración de cisplatino internalizado en las células tratadas.

Las columnas sombreadas verticalmente (a la izquierda), horizontalmente (centro) y punteadas (a la derecha) corresponden a un tratamiento de las células durante 2h, 4h y 6h respectivamente.

40 Los resultados muestran que la internalización de cisplatino es claramente más eficaz en presencia de las nanopartículas según la invención (denominadas NP+) que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica obtenidas en el ejemplo 10 que en el caso de las nanopartículas PS y del cisplatino libre.

45 Por ejemplo, en condiciones idénticas (10<sup>6</sup> células IGROV1, 100 µM, 2 h) 0,5 nanomoles de cisplatino se internalizan en el caso del cisplatino libre mientras que la internalización es 40 veces mayor (20 nanomoles) en el caso de las nanopartículas NP+ según la invención (figura 3A).

Con respecto a la línea celular resistente al cisplatino SKOV3, en condiciones idénticas ( $10^6$  células SKOV3, 1.00  $\mu\text{M}$ , 2 h), la internacionalización es 60 veces mayor (30 nanomoles) en el caso de las nanopartículas NP+ según la invención que para el cisplatino libre (0,5 nanomoles) (figura 3B).

5 **Ejemplo 14: Estudio de los efectos citotóxicos de las nanopartículas de compartimentos múltiples sobre diferentes líneas tumorales**

**Protocolo**

***al Preparación y tratamiento de las células:***

El estudio consiste en determinar la concentración que inhibe el 50% de proliferación celular 50 ( $CI_{50}$ ) en un panel de líneas tumorales, por ejemplo

- 10
- A2780 (Human ovarian carcinoma epithelial tumor) sensible al cisplatino y A2780/CisPt resistente al cisplatino (Human ovarian carcinoma epithelial tumor)
  - IGROV-1 sensible al cisplatino (Human ovarian carcinoma) y IGROV-1/CisPt resistente al cisplatino (Human ovarian carcinoma)
  - L1210 (mouse lymphocytic leukemia) sensible al cisplatino y L1210/CisPt (mouse lymphocytic leukemia)
- 15
- NIH: OVCAR3 (carcinoma ovárico), y
  - P388 (mouse lymphoma)

20 En una placa de 96 pozos, se incuban 2.500 células (líneas de adenocarcinomas ováricos, etc.) por pozo en 100  $\mu\text{L}$  del medio con suero. Después de 24 h el medio se aspira y las células se tratan con cisplatino libre o encapsulado en las nanopartículas del ejemplo 10 en 100  $\mu\text{L}$  del medio sin suero a diferentes concentraciones (500, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001  $\mu\text{M}$ ). Después de 24 h de tratamiento, el medio se retira y las células se lavan 2 veces con 100  $\mu\text{L}$  de PBS y luego se incuban con 100  $\mu\text{L}$  del medio con suero.

***bl Revelado de la toxicidad:***

25 48 h después de los dos lavados, la viabilidad celular se revela añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de MTS. La absorbancia a 490 nm se mide después de 2 a 4 horas de incubación a 37°C. La absorbancia es proporcional a la viabilidad celular.

***cl Resultados***

30 Los resultados se representan en la figura 4, que muestra la concentración necesaria para obtener 50% de muerte celular ( $CI_{50}$ ) con cisplatino libre (columna gris claro a la izquierda) o las nanopartículas según la invención que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica obtenidas al terminar la etapa 6 del ejemplo 10 (denominadas NP+) que contienen cisplatino (columna gris oscuro a la derecha).

Los resultados muestran que las nanopartículas según la invención son más eficaces que el cisplatino libre en todas las líneas celulares sensibles o resistentes al cisplatino.

35 Por ejemplo, para la línea celular A2780 sensible al cisplatino, se obtiene el 50% de muerte celular con 0,23  $\mu\text{M}$  de nanopartículas según la invención mientras que hace falta utilizar 4,68  $\mu\text{M}$  de cisplatino libre para obtener la misma mortalidad.

En la línea A2780 resistente al cisplatino; se obtiene el 50% de muerte celular con 0,21  $\mu\text{M}$  de nanopartículas según la invención contra 29,21  $\mu\text{M}$  de cisplatino libre. En este caso las nanopartículas según la invención son respectivamente 18 y 140 veces más eficaces que el cisplatino libre en las líneas A2780 sensibles y A2780 resistentes.

40 **Ejemplo 15: Estudio de los efectos citotóxicos de las nanopartículas de compartimentos múltiples sobre diferentes líneas tumorales IGROV-1 y SKOV3**

**Protocolo**

***al Preparación y tratamiento de las células:***

45 En una placa de 96 pozos, se incuban 2.500 células (IGROV1, SKOV3, líneas de adenocarcinomas ováricos) por pozo en 100  $\mu\text{L}$  del medio con suero. Después de 24 h el medio se aspira y las células se tratan con cisplatino libre o encapsulado en las nanopartículas del ejemplo 10 en 100  $\mu\text{L}$  del medio sin suero a diferentes concentraciones (500, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001  $\mu\text{M}$ ). Después de 24 horas de tratamiento, el medio se retira y las células se lavan 2 veces con 100  $\mu\text{L}$  de PBS y luego se incuban con 100  $\mu\text{L}$  del medio con suero.

**bl Revelado de la toxicidad:**

48 h después de los dos lavados, la viabilidad celular se revela añadiendo 20 µL de MTS. La absorbancia a 490 nm se mide después de 2 a 4 horas de incubación a 37°C. La absorbancia es proporcional a la viabilidad celular.

**cl Resultados**

5 Los resultados se representan en la figura 5, que muestra la concentración necesaria para obtener 50% de muerte celular (CI50) con cisplatino libre (columna 1, izquierda), las nanopartículas control a base de DOPC/DOPS (denominadas PS) (columna 2, centro izquierda), las nanopartículas que comprenden una sola capa lipídica aniónica obtenidas al término de la etapa 4 del ejemplo 10 (denominadas NP-) (columna 3, centro derecha) y las nanopartículas según la invención (denominadas NP+) que comprenden una primera capa lipídica aniónica y una segunda capa lipídica catiónica obtenidas al término de la etapa 6 del ejemplo 10 (columna derecha).

La figura 5A se refiere a la línea celular IGROV1 y la figura 5B se refiere a la línea celular SKOV3.

Los resultados muestran que las nanopartículas NP+ que contienen cisplatino según la invención son más eficaces que el cisplatino libre en las dos líneas celulares, IGROV1 (sensible al cisplatino) y SKOV3 (resistente al cisplatino).

15 En la línea IGROV1, se obtiene un 50% de muerte celular con 0,18 µM de nanopartículas que contienen cisplatino NP+ mientras que es necesario utilizar 2,41 µM de cisplatino libre para obtener este resultado. En la línea SKOV3, se obtiene un 50% de muerte celular con 0,29 µM de nanopartículas NP+ que contienen cisplatino contra 4,3 µM de cisplatino libre.

Las nanopartículas que contienen cisplatino según la invención (NP+) son respectivamente 13 y 14 veces más eficaces que el cisplatino libre en las líneas IGROV1 y SKOV3 respectivamente.

20 **Ejemplo 16: Demostración de la estructura de compartimentos múltiples de las nanopartículas según la invención**

Se han preparado formulaciones de nanopartículas con diferentes marcadores, con el fin de estudiar, por una parte, la localización del marcador en la capa lipídica y, por otra parte, el estado de las nanopartículas después de su entrada en las células.

25 Se han insertado sondas fluorescentes lipófilas en las formulaciones como marcador, por una parte, y como compuesto lipídico que imita un profármaco (por ejemplo, un conjugado lipídico análogo a un nucleósido anticanceroso tal como el 5-FU), por otra parte.

Se han realizado las diferentes formulaciones siguientes:

Formulación A: diC16dT/DOPC 50/50

30 Formulación B: DOTAU/DOPC 50/50

Formulación C: diC16dT/DOPC/DOPE/fluoresceína 49,25/49,25/0,5 (λ ex = 483 nm, (λ emisión = 518 nm)

Formulación D: DOTAU/DOPC/DOPE/rodamina 49,25/49,25/0,5 (λ ex = 550 nm, (λ emisión = 590 nm)

Se han preparado así las nanopartículas NP1, NP2 y NP3 según la invención de diferentes composiciones, definidas como sigue:

Nanopartícula	Primera capa	Segunda capa
NP1	formulación C	formulación B
NP2	formulación A	formulación D
NP3	formulación C	formulación D

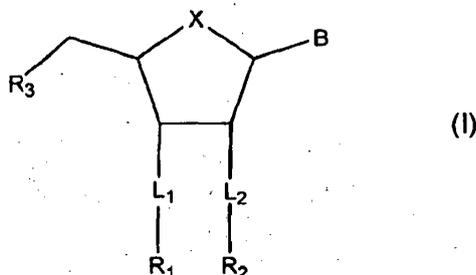
35 Las nanopartículas NP1, NP2 y NP3 se representan en la figura 6. En cada una de las nanopartículas, la capa blanca representa una capa lipídica no marcada, la capa gris representa la capa marcada con fluoresceína (formulación C), la capa negra representa la capa marcada con la rodamina (formulación D) y el centro punteado representa el cisplatino incorporado.

40 Se han realizado medidas de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) en las células SKV03 que han sido incubadas:

- en ausencia de nanopartículas según la invención a modo de control (figura 7A)
  - en presencia de nanopartículas NP1 en las que la primera capa está marcada (figura 7B),
  - en presencia de nanopartículas NP2 en las que la segunda capa está marcada (figura 7C), y
  - en presencia de nanopartículas NP3 en las que las dos capas están marcadas (figura 7D).
- 5 Los datos de FACS obtenidos muestran la presencia de los dos marcadores fluorescentes (fluoresceína, rodamina) en las células SKV03 después de incubación en presencia de las nanopartículas NP3 que llevan estos marcadores. Estos resultados muestran, por una parte, que las nanopartículas según la invención tienen una estructura con compartimentos múltiples, y por otra parte, que permanecen intactos después de la internalización en las células.
- 10 Experimentos de microscopía de fluorescencia han confirmado los resultados obtenidos por FACS. Las imágenes muestran que las nanopartículas marcadas NP1, NP2 y NP3 son internalizadas intactas en las células SKV03.

## REIVINDICACIONES

1. Formulación de compartimentos múltiples en forma de nanopartícula que tiene un diámetro medio de aproximadamente 1 a 200 nm formada por un núcleo sólido que contiene un agente terapéutico, rodeado por al menos dos capas lipídicas de polaridad diferente formadas a partir de moléculas o de macromoléculas anfífilas funcionales, en la que cada capa lipídica está formada por al menos un compuesto anfífilo funcional de fórmula (I):

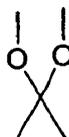


en la que:

- X representa un átomo de oxígeno, de azufre o un grupo metileno,
- B representa una base púrica o pirimídica tal como el uracilo, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina, o sus derivados, o incluso una base heterocíclica mono o bicíclica no natural en la que cada ciclo comprende 4 a 7 eslabones, eventualmente sustituida;

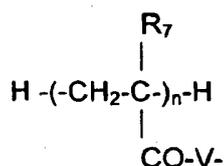
- L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan el hidrógeno, un grupo oxicarbonilo -O-C(O)-, un grupo tiocarbamato -O-C(S)-NH-, un grupo carbonato -O-C(O)-O-, un grupo carbamato -O-C(O)-NH-, un átomo de oxígeno, un grupo fosfato, un grupo fosfonato o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, sustituido o no sustituido con una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>,

o también, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, juntos, forman un grupo cetal de fórmula:



o también L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> representa hidrógeno, y el otro representa un grupo hidroxilo o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, no sustituido o sustituido con una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>:

- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan:
  - una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub>, principalmente C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub>, saturada o parcialmente insaturada, eventualmente total o parcialmente fluorada, no sustituida o sustituida en el carbono del extremo de la cadena con un átomo de flúor o con un éster o un éter bencílico o naftílico, o
  - una cadena diacilo en la que cada cadena acilo de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, o
- un grupo diacilglicerol, esfingosina o ceramida, o
- cuando L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> representa hidrógeno, y el otro representa un grupo hidroxilo o un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> no existen;
- R<sub>3</sub> representa:
  - un grupo hidroxilo, amino, fosfato, fosfonato, fosfatidilcolina, O-alquil-fosfatidilcolina, tiofosfato, fosfonio, NH<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, NHR<sub>4</sub>R<sub>5</sub> o NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>R<sub>6</sub> en los que R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o hidroxialquilo lineal o ramificado de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o
  - una cadena alquilo lineal o ramificada de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> eventualmente sustituida con un grupo hidroxilo, o
  - un resto ciclodextrina, o
  - un resto



en el que V representa un enlace -O-, -S-, o -NH-, R<sub>7</sub> representa H o CH<sub>3</sub>, y n = 1 a 500, o

un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-V-R<sub>8</sub>, en el que R<sub>8</sub> representa un alquilo de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, y n = 1 a 500, o

- 5 - un grupo heteroarilo que comprende 1 a 4 átomos de nitrógeno, no sustituido o sustituido con un alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, o con un grupo (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-R<sub>9</sub> en el que m = 1 a 6 y p = 0 a 10 y R<sub>9</sub> representa un grupo cetálico que comprende 5 a 7 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con al menos un alquilo lineal o ramificado de C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> o con un resto esterol, o también
- R<sub>3</sub> está unido por enlace covalente a otro sustituyente R<sub>3</sub>, idéntico o diferente, de otro compuesto de fórmula (I), idéntico o diferente, para formar un compuesto de fórmula (I) en forma de dímero,
- 10 y cada capa lipídica tiene una polaridad diferente de la de la anterior.
2. Formulación según la reivindicación 1, caracterizada porque cada capa lipídica constituye un compartimento susceptible de comprender un agente terapéutico idéntico a o diferente del presente en el núcleo.
3. Formulación según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque un co-lípido puede estar presente en al menos una capa lipídica.
- 15 4. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el agente terapéutico es un agente antitumoral.
5. Formulación según la reivindicación 4, caracterizada porque el agente terapéutico se elige entre los complejos de platino o el rutenio capaz de unirse a complejos de platino, o también los complejos inorgánicos sin platino a base de rutenio II o III, de titanio, de galio, de cobalto, de hierro o de oro.
- 20 6. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el agente terapéutico se elige entre el cisplatino, el carboplatino, el oxaliplatino, el nedaplatino y el lobaplatino.
7. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque en la fórmula (I), X representa el oxígeno.
- 25 8. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque en la fórmula (I), B representa la timina o la adenina.
9. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque se utiliza al menos un compuesto de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado negativamente para obtener una capa lipídica aniónica.
- 30 10. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque se utiliza al menos un compuesto de fórmula (I) en la que L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> representan un grupo cargado catiónico para obtener una capa lipídica catiónica.
11. Procedimiento para la preparación de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- 35 a) preparar una mezcla de al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido en la reivindicación 1, y de un agente terapéutico,
- b) someter dicha mezcla a ciclos repetidos de calentamiento y congelación, de forma que se obtengan nanopartículas que contienen dicho agente terapéutico, y
- c) recuperar las nanopartículas que contienen dicho agente terapéutico así obtenidas,
- 40 d) poner dichas nanopartículas en presencia de al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, que tenga una polaridad diferente del que se ha aplicado en la etapa a), y
- e) recuperar las nanopartículas multi-compartmentos así obtenidas.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque se utiliza un colípido durante las etapas a) y/o d).

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 ó 12, caracterizado porque comprende una etapa suplementaria que consiste en la formación de una capa lipídica neutra formada por al menos un compuesto anfifílico funcional de fórmula (I) tal como se ha definido en la reivindicación 1, siendo dicho compuesto de fórmula (I) neutro, para formar la capa lipídica externa.
- 5 14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque se introduce en la etapa d) un agente terapéutico diferente al utilizado en la etapa a).
15. Agente de transporte, de vectorización, o de liberación intracelular de agentes terapéuticos, en particular de agentes antitumorales, que comprende una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 10 16. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su utilización en el tratamiento de enfermedades tumorales.
17. Composición farmacéutica que comprende una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

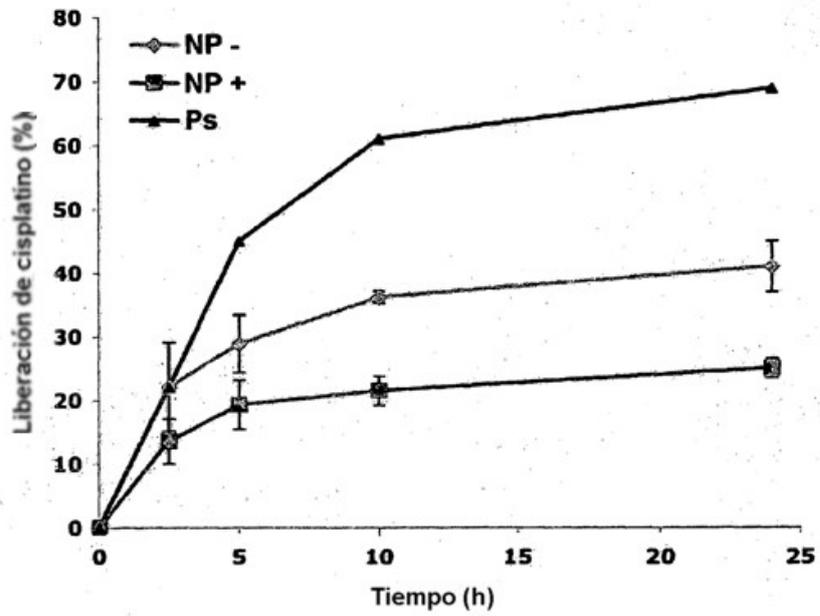


Figura 1

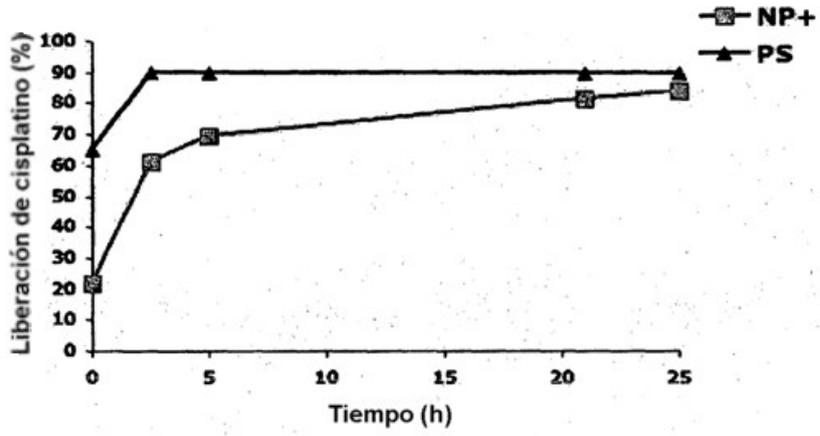


Figura 2

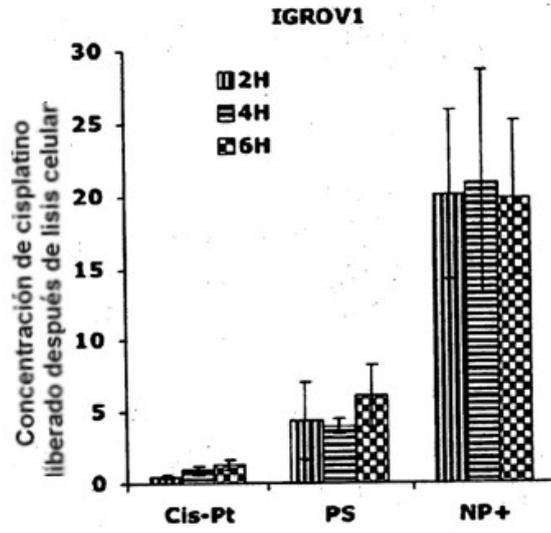


Figura 3A

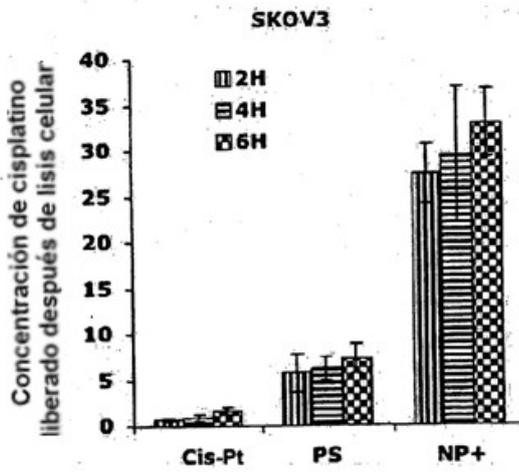


Figura 3B

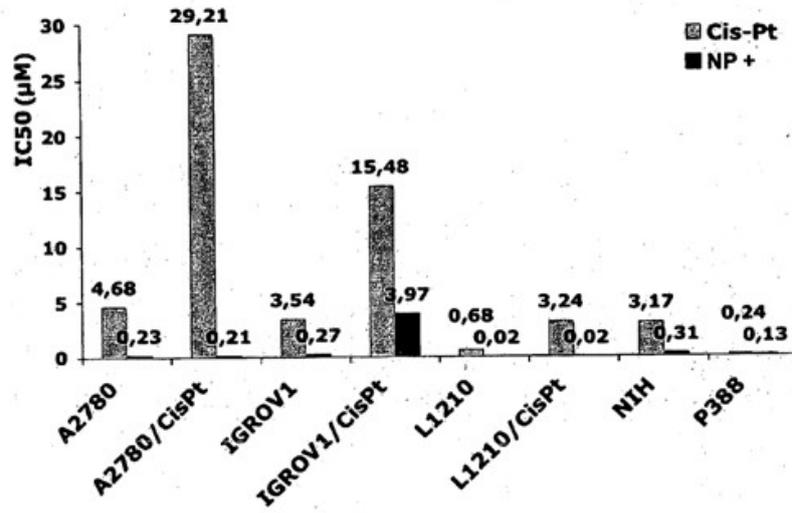


Figura 4

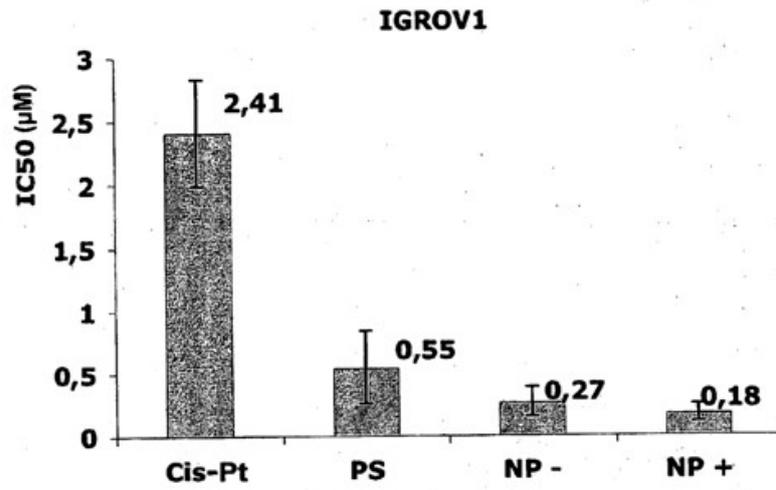


Figura 5A

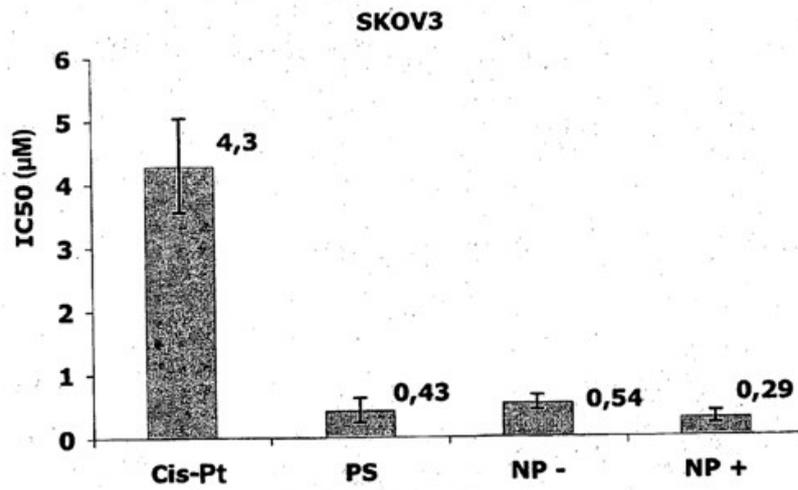


Figura 5B

**Figura 6**



**NP1**



**NP2**



**NP3**

Figura 7

