

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 928**

51 Int. Cl.:

C07D 249/04 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

C07C 247/04 (2006.01)

C08G 63/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13706998 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2820002**

54 Título: **Copolímeros funcionales de PLA-PEG, las nanopartículas de los mismos, su preparación y uso para suministro dirigido de fármacos y formación de imágenes**

30 Prioridad:

28.02.2012 EP 12305236

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

22.09.2016

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BAZILE, DIDIER;
COUVREUR, PATRICK;
LAKKIREDDY, HARIVARDHAN REDDY;
MACKIEWICZ, NICOLAS y
NICOLAS, JULIEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 583 928 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

Copolímeros funcionales de PLA-PEG, las nanopartículas de los mismos, su preparación y uso para suministro dirigido de fármacos y formación de imágenes

5 La presente invención se refiere al campo de suministro dirigido de fármacos y formación de imágenes y, en particular, el suministro mediante encapsulación no covalente o conjugación de un fármaco en una nanopartícula de poli(etilenglicol)-poli(ácido láctico) (PEG-PLA).

10 La síntesis de nanopartículas de PLA-PEG y sus aplicaciones en suministro de fármacos se ha descrito en gran medida en la bibliografía. En una composición de PLA-PEG, el PLA (poli(ácido láctico)) es hidrófobo y el PEG es hidrófilo. PLA-PEG se ensambla en nanopartículas en medio acuoso, formando PLA el núcleo y formado PEG la corona. Tras inyección intravenosa, la corona de PEG en las nanopartículas de PLA-PEG ha demostrado proteger la nanopartícula de la fagocitosis ("efecto oculto") y por tanto minimiza la rápida eliminación sistémica de las nanopartículas, y de ese modo aumenta su semi-vida sistémica (patente de Estados Unidos 5.683.723 que describe nanopartículas basadas en copolímero de bloque de polioxietileno y poliácido láctico). Además, dichas nanopartículas se acumulan en tumor por el efecto previamente descrito de "permeabilidad y retención potenciadas" (EPR). En el campo del cáncer en particular, se desean tratamientos específicos de tumor debido a los fuertes efectos secundarios de las quimioterapias, y en este contexto, las nanopartículas poliméricas se han considerado sistemas prometedores de suministro de fármacos. Cuando se incorporan en las nanopartículas de PLA-PEG, los fármacos experimentan circulación sistémica prolongada y concentración potencialmente mayor en el tumor debido al efecto EPR. Para suministrar la nanopartícula con especificidad aumentada al tumor, podría emplearse el enfoque de direccionamiento/acumulación tisular usando un dispositivo localizador (Pulkkinen et al. Eur J Pharm Biopharm 70 (2008) 66-74, Zhan et al. J Control Rel 143 (2010) 136-142, Farokhzad et al. Cancer Res 64 (2004) 7668-7672, Gao et al. Biomaterials 27 (2006) 3482-3490).

Por tanto, se ha investigado el uso de nanopartículas de PLA-PEG funcionalizadas adicionalmente con un ligando de direccionamiento por los inventores.

30 Se ha descrito el uso de química clic (acoplamiento de Huisgen) en la bibliografía para la síntesis de diferentes nanopartículas poliméricas (Lv et al. J Colloid Interface Sci. 356 (2011) 16-23, Jubeli et al. J Polym Sci Part A: Polym Chem. 48 (2010) 3178-3187, Lecomte et al. Macromol Rapid Commun. 29 (2008) 982-997) o metálicas (Hanson et al. Documento US2010/0260676 A1, 2010).

35 La química clic es de interés porque este enfoque produce un alto rendimiento, las condiciones de reacción son fáciles de manipular y escalables porque la reacción es insensible a oxígeno y agua. El fondo de esta reacción es bien conocido, implica una baja cantidad de catalizador y conduce a un alto rendimiento de acoplamiento.

40 Recientemente, Deshayes et al. (Pharm. Res. (2011), 28, 1631-1642) informaron de la conjugación de un ciclopéptido (usado como ligando que se une específicamente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) de direccionamiento), a una nanopartícula de fluoruro de polivinilideno-poli(ácido acrílico) por química clic. La química clic ya se ha considerado para sintetizar macromoléculas que contienen polímeros tanto de PLA como de PEG. Tang et al. Macromolecules 2011, 44, 1491-1499 describieron el acoplamiento de un intermedio de PEG-g-PLA-alquino con un derivado azido (poli(azidopropil-L-glutamato)). Además, Yu et al. Macromolecules, 2011, 44(12), 4793-4800 describieron recientemente una nanopartícula hecha por la macromolécula PLA-g-paclitaxel-PEG donde el paclitaxel forma puentes con la estructura de PLA y las cadenas laterales de PEG. El fármaco, sin embargo, no se encapsula físicamente en la nanopartícula y la estructura no comprende un ligando de direccionamiento. Lu et al. Bioconjugate Chem 2009, 20, 87-94 también describieron una macromolécula que contiene PLA y PEG hecha por química clic y en la que se une un péptido (RGD = arginina-glicina-aspartato) para direccionamiento celular. La estructura de la macromolécula implica la síntesis de intermedios estructuralmente complejos: el copolímero de azida (poli(2-metil-2-carboxitrimetileno-carbonato-co-D,L-lactida)-g-PEG-azida) y los péptidos KGRGDS modificados con alquino.

55 Zhang et al. (Mol. Pharmaceutics 2012,9, 2228-2236) describen nanopartículas hechas de una macromolécula que contiene PLA y PEG, donde la superficie se conjuga con ligandos usando química clic, produciendo, por tanto, un ligando unido directamente al grupo triazol. Xiao et al. (International Journal of nanomedicine 5, 1, 2010, 1057-1065) se refiere, en líneas generales, a nanopartículas que contienen PEG-PLA. Arutselvan et al. (Chemical Communications 7, 2007, 695-697), el documento WO 2011/046946, (Steinmetz et al. Journal of the American Chemical Society 131, 47, 2009, 17093-17095) y Adibekian et al. (Nature Chemical Biology 7, 2011, 469-479) describen derivados de alquino-PEG.

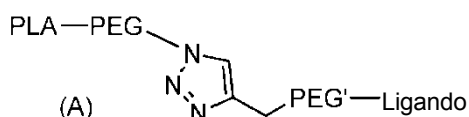
El documento US2010/104645 describe un compuesto que comprende los elementos triazol, PEG y PLA.

65 Existe, por lo tanto, la necesidad de diseñar un proceso directo de preparación de nanopartículas que contienen PEG-PLA capaces de encapsular un fármaco para suministro específico de sitio sobre el cual puede unirse un ligando funcional deseado usando química clic.

La presente invención, por tanto, se refiere a la provisión de nanopartículas de PLA-PEG que comprenden una cadena de PLA-PEG fácil de preparar unida covalentemente a un ligando de direccionamiento a través de un enlazador, que se puede obtener por química clic.

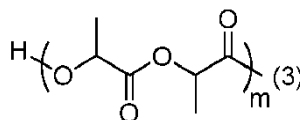
De acuerdo con la invención, la preparación de las nanopartículas implica la síntesis de un compuesto de PLA-PEG-azida que puede actuar como plataforma copolimérica susceptible a química clic sobre la cual puede acoplarse cualquier alquino-ligando funcional, por ejemplo, dispositivo localizador, agente de imágenes, agente sensible a estímulos, agente de conexión, agente potenciador de la penetración celular, agente destoxicante, fármaco, usando química clic mediante un enfoque versátil.

De acuerdo con un primer objetivo, la presente invención, por tanto, se refiere a un compuesto de fórmula (A)



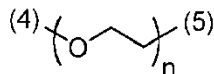
donde:

PLA representa un resto de poliácido láctico de fórmula:



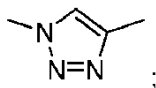
donde:

(3) es la unión del enlace al resto de PEG; y
m es el número de unidades y está comprendido entre 1 y 500;
PEG representa un resto de polietilenglicol de fórmula:



donde:

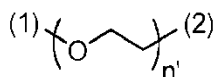
(4) es la unión del enlace a -PLA;
(5) es la unión del enlace al átomo de nitrógeno de



y

n es el número de unidades y está comprendido entre 1 y 300.

En enlazador PEG' es un resto de polietilenglicol de fórmula:



donde:

n' es el número de unidades y está comprendido entre 1 a 10
(1) es la unión del enlace al grupo -(CH₂)-triazol;
(2) es la unión del enlace al ligando.

El ligando es un resto de ligando funcional elegido entre dispositivos localizadores, agentes de diagnóstico, agentes de imágenes, agentes sensibles a estímulos, agentes de conexión, agentes de penetración celular, agentes destoxicantes y fármacos.

Como se usa en este documento, el término "resto" se refiere a un radical divalente o monovalente dependiendo de la molécula de la que deriva, o de un derivado de la misma.

En la fórmula general (A) anterior, pueden considerarse las siguientes realizaciones particulares o una cualquiera de las combinaciones de las mismas:

m corresponde a un peso molecular entre aproximadamente 144 y 72000. En una realización adicional, m es, en líneas generales, entre 100 y 300, correspondiente a un peso molecular entre aproximadamente 14400 y 43200 g/mol.

5 n corresponde a un peso molecular entre aproximadamente 44 y 13200 g/mol. En una realización adicional, n es entre 20 y 70, correspondiente a un peso molecular entre aproximadamente 880 y 3080 g/mol.

La unión entre PLA y PEG (PLA-PEG) consiste en un enlace éster bond entre el grupo carboxílico terminal del resto de PLA y el grupo hidroxilo terminal del resto de PEG.

10 La unión entre PEG' y el ligando (PEG'-Ligando) no está representada, pero consiste en un enlace amida formado por el grupo carboxílico del ligando y el grupo amino resultante del grupo hidroxilo terminal de PEG'.

15 En una realización particular de un compuesto de fórmula (A), el ligando puede elegirse entre anisamida, ácido fólico, y fluorocromos tales como FP-547.

En el contexto de la presente invención:

- 20 - se entiende que un átomo de halógeno significa flúor, cloro, bromo o yodo;
- se entiende que un grupo alquilo (C₁-C₆) significa un grupo alifático saturado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono (ventajosamente de 1 a 4 átomos de carbono) y que es lineal o ramificado. Puede hacerse mención, a modo de ejemplos, de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo y similares.

25 Los compuestos de fórmula (A) pueden proporcionarse en forma de una base libre o en forma de sales de adición con ácidos, que también forman parte de la invención.

Estas sales se preparan ventajosamente con ácidos farmacéuticamente aceptables, pero las sales con otros ácidos, útiles, por ejemplo, para la purificación o para el aislamiento de los compuestos de fórmula (A), también forman parte de la invención.

30 Los compuestos de fórmula (A) pueden formar nanopartículas. Por tanto, de acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a una nanopartícula que comprende uno o más compuestos de fórmula (A) idénticos o diferentes.

35 La expresión "compuestos idénticos o diferentes", como se usa en este documento, indica que dichos compuestos pueden tener la misma fórmula o tienen distinta fórmula dependiendo de las definiciones de los diversos PEG, PLA, PEG', R, m, n etc.

Dichas nanopartículas también pueden comprender uno o más compuestos de fórmula (I') idénticos o diferentes:



donde PLA, PEG se definen como en la fórmula (A) y R es H o un alquilo C₁-C₆, tal como metilo.

45 Dichas nanopartículas pueden comprender, opcionalmente, un fármaco.

50 El término "fármaco", usado en este documento, se refiere a sustancias terapéuticas que pueden administrarse a un paciente que lo necesita. Cualquier fármaco relevante de interés (especialmente fármacos insolubles en agua) podría encapsularse de forma no covalente en la nanopartícula y/o conjugarse de forma covalente con la nanopartícula (opcionalmente a través de un enlazador), para suministrar al organismo.

El fármaco puede ser, en particular, un antibiótico, agente antineoplásico, agente antivírico, agente anti-inflamatorio, un antígeno de vacuna o un nutracéutico.

55 En particular, el fármaco puede ser un agente citotóxico, tal como un taxoide y más particularmente docetaxel.

Por tanto, en una realización, el fármaco se encapsula de forma no covalente (tal como encapsularse físicamente) dentro de las nanopartículas. En otra realización del mismo, el fármaco se conjuga covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, con las nanopartículas, en particular cuando el ligando es un fármaco.

60 En una realización particular, el ligando no es un fármaco, sino que el fármaco se encapsula no covalentemente en la nanopartícula.

65 Como se usa en este documento, el término "nanopartículas" se refiere a partículas que tienen un diámetro medio entre 10 nm y 900 nm. En una realización adicional, las nanopartículas de la invención tienen un diámetro medio entre 50 y 300 nm.

Típicamente muestran un índice de polidispersidad (Pdl) entre 0,01 y 0,4, más específicamente entre 0,1 y 0,4, y tienen un potencial zeta entre -30 y +30 mV.

5 Con un ligando catiónico, el potencial zeta puede ser entre 1 y 30 mV, con un ligando aniónico entre -30 y -1 mV.

Las nanopartículas de la invención se ilustran en las Figuras 2-3.

10 De acuerdo con la invención, dichas nanopartículas pueden prepararse por nanoprecipitación de compuestos de fórmula (A), opcionalmente en presencia de compuestos de fórmula (I') anterior y/u opcionalmente seguido de encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.

15 Como se usa en este documento, el término "nanoprecipitación" se refiere a un proceso que comprende precipitación o emulsificación y reducción del tamaño de uno o más compuestos en forma de nanopartículas en suspensión.

Típicamente, dicho proceso comprende centrifugación de la suspensión. El proceso también puede incluir una o más etapas elegidas entre:

- 20 - preparación de una fase orgánica de los compuestos de fórmula (A) y opcionalmente (I') en un disolvente adecuado o mezcla de disolventes, tal como cloruro de metileno, acetato de etilo, acetona, etanol, tetrahidrofurano, etc.
- preparación de una fase acuosa opcionalmente estabilizada con uno o más agentes estabilizantes, tales como colato sódico, alcohol polivinílico (PVA), poloxámero, fosfolípidos etc.;
- 25 - mezcla de las fases orgánica y acuosa;
- reducción del tamaño de la suspensión (por ejemplo, usando ultrasonificación);
- retirada de la fase orgánica, por ejemplo, por evaporación al vacío o bajo flujo de aire;
- centrifugación de la fase acuosa, en particular ultracentrifugación hasta 50000 g;
- recogida de las nanopartículas; y/o
- 30 - resuspensión de las nanopartículas obtenidas en medio acuoso.

35 Típicamente, las nanopartículas de la invención se obtienen usando un disolvente orgánico miscible acuoso (tal como acetona) como fase orgánica precipitada en una fase acuosa usando opcionalmente un agente estabilizante, o usando diclorometano o acetato de etilo como fase orgánica mezclada con la fase acuosa que contiene PVA o un poloxámero o colato sódico como agente estabilizante. Los poloxámeros adecuados para su uso en la preparación de las nanopartículas están disponibles en TM Pluronic. Un poloxámero adecuado es poloxámero 188 (disponible como Pluronic® F68 o Lutrol® F68, BASF).

40 De acuerdo con la invención, las nanopartículas hechas de PLA-PEG-ligando funcional pueden usarse para una diversidad de propósitos incluyendo el suministro de sustancias terapéuticas (fármacos) en el organismo humano. En una realización de la presente invención, la nanopartícula comprende adicionalmente un fármaco. En este caso, la sustancia terapéutica se encapsula de forma no covalente (encapsulación física) en la matriz de nanopartículas, y se suministra mejor al tejido pretendido.

45 En otra realización, el fármaco puede conjugarse covalentemente al compuesto de fórmula (A), por ejemplo, en lugar del ligando, opcionalmente a través de un enlazador. La conjugación covalente puede ser de interés para mantener la asociación del fármaco al vehículo *in vivo*, para el suministro del fármaco y aplicaciones de imágenes.

50 Mezclando diferentes compuestos de fórmula (A) con diferentes ligandos, pueden obtenerse nanopartículas multifuncionales. Estas nanopartículas multifuncionales pueden usarse para aplicaciones de combinación (véase la Figura 3).

55 De acuerdo con la invención, la nanopartícula puede prepararse por nanoprecipitación de uno o más compuestos de fórmula (A), y opcionalmente (I'), opcionalmente en presencia de un fármaco o diferentes fármacos (para terapia de combinación).

60 La expresión "ligando funcional", como se usa en este documento, en un compuesto de fórmula (A) o en las nanopartículas preparadas con el mismo se refiere a cualquier tipo de compuesto capaz de dirigir o rastrear el suministro de un fármaco en el organismo humano, o el propio fármaco, en particular, cuando el fármaco es específico de sitio, tal como un fármaco que se une específicamente a receptores. Los ligandos funcionales pueden elegirse, en particular, entre:

- 65 - compuestos capaces de seguir la captación y distribución de las nanopartículas en una célula, un tejido, un animal, o un paciente, por ejemplo, a través del aporte de un marcador que puede proporcionar una imagen de la distribución de nanopartículas;
- agentes químicos o biológicos, incluyendo fármacos, que realizan un efecto final deseado de las nanopartículas,

tal como desencadenar la muerte celular, o activar o inhibir un receptor, una enzima, o un gen;

- ligandos de receptor tales como un antagonista del receptor de estrógenos, un antagonista del receptor de andrógenos, ácido fólico, anisamida, un péptido RGD, anticuerpos, vectores génicos dirigidos a péptidos, aptámeros, y factor de necrosis tumoral.

5 Los ligandos funcionales pueden incluir un dispositivo localizador, un agente de imágenes, un agente sensible a estímulos (agente termosensible, agente sensible a pH, agente fotosensible, etc.), un agente de conexión, un agente potenciador de la penetración celular, un agente detoxificante, un fármaco, etc., dependiendo de las aplicaciones previstas.

10 Por ejemplo, podría usarse un dispositivo localizador que reconoce y se une a un tipo celular/tisular específico para dirigir nanopartículas cargadas de fármaco al órgano específico/tejido enfermo de interés, que también podría mencionarse como "direccionamiento de fármaco específico de sitio". Se espera que nanopartículas de PLA-PEG-dispositivo localizador mejoren el suministro del fármaco encapsulado al sitio enfermo pretendido, aumenten la concentración local de fármaco en el tejido abordado, y al mismo tiempo, faciliten una liberación sostenida de fármaco. Esto puede provocar una exposición potenciada y prolongada del tejido/células enfermas al fármaco y, por tanto, puede conseguirse un beneficio terapéutico mejorado y efectos secundarios reducidos. Dichos agentes localizadores pueden elegirse, en particular, entre ligandos de reconocimiento de membrana, tales como anisamida (que tienen afinidad por receptores sigma), ácido fólico (que tiene afinidad por receptores de folato sobre-
15 expresados en la superficie de algunas líneas de células tumorales), anticuerpos (tales como HER2, transferrina, anticuerpos anti-EGFR, etc.) capaces de reconocer el correspondiente antígeno de superficie, la secuencia RGD que se une a integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas en endotelio angiogénico tumoral, ácido hialurónico que se une a receptores CD44, transferrina que se une a receptores de transferrina, etc.

25 En otro caso, los ligandos también incluyen aquellos que reconocen y se unen a compuestos biológicos soluble o que circulan en los fluidos biológicos (por ejemplo, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)), para estrategia terapéutica o de detoxificación.

30 Si el ligando funcional acoplado en la nanopartícula de PLA-PEG es un agente de imágenes/agente de diagnóstico, entonces la nanopartícula puede emplearse para formación de imágenes/diagnóstico de una enfermedad o una imperfección en el organismo. Dichos agentes de imágenes/diagnóstico pueden elegirse, en particular, entre óxido de hierro, complejos de gadolinio, verde de indocianina, sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, emisores de positrones (por ejemplo, ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu).

35 Pueden usarse ligandos funcionales tales como sustancias sensibles a estímulos para guiar las nanopartículas de PLA-PEG al sitio pretendido usando, por ejemplo, campo magnético externo, creando cambios locales sensible a estímulos tales como calor después de irradiación por luz infrarroja cercana. Dichas sustancias sensibles a estímulos pueden elegirse, en particular, entre, por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de oro o cualquier sustancia activable por radiación.

40 Pueden usarse ligandos funcionales tales como agentes de conexión para la conexión del fármaco (por ejemplo, por el principio de apareamiento de iones), para protegerlo de la degradación y para suministrarlo en la localización apropiada en el organismo. Como ejemplo, el suministro por vía parenteral de oligonucleótidos puede hacerse más eficaz por conexión de los mismos a PEG-PLA acoplado a oligopéptido, donde el oligopéptido alberga una carga eléctrica opuesta a la del oligonucleótido. Dichos agentes de conexión pueden elegirse, en particular, entre oligopéptidos (por ejemplo, poli-lisina, poli(leucina-lisina), poli(leucina-lisina-lisina-leucina)).

45 Pueden usarse ligandos funcionales tales como agentes potenciadores de la penetración celular para mejorar la captación celular de la nanopartícula y, por tanto, su fármaco encapsulado que puede conducir a eficacia potenciada del fármaco. Dichos agentes de penetración celular pueden elegirse, en particular, de secuencias transactivadoras de la transcripción (TAT), penetratina, secuencias de poliarginina, secuencias proteicas VP22, etc.

50 Pueden usarse ligandos funcionales tales como agentes detoxificantes para la eliminación de sustancias tóxicas de la circulación sistémica. Dichos agentes detoxificantes pueden elegirse, en particular, de una diversidad de sustancias, por ejemplo, agentes quelantes (para detoxificación de metales), cobalamina, cobinamida, enzima rodanasa (para detoxificación de cianuro), enzima hidrolizante de organofósforo (para detoxificación de organofósforo), naloxona, atropina (para detoxificación de opioides), anticuerpos/fragmentos de anticuerpos que reconocen una toxina específica.

60 Por consiguiente, un ligando por tanto puede elegirse, como se ha mencionado anteriormente, de:

ligandos de reconocimiento de membrana seleccionados de un antagonista del receptor de estrógenos, un antagonista del receptor andrógenos, ácido fólico, anisamida, un anticuerpo capaz de reconocer el correspondiente antígeno de superficie tal como HER2, transferrina, o anticuerpos anti-EGFR, una secuencia RGD que se une a integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas en endotelio angiogénico tumoral, ácido hialurónico que se une a receptores CD44, transferrina que se une a receptores de transferrina, vectores génicos dirigidos a péptidos, aptámeros, y

factor de necrosis tumoral

agentes de diagnóstico/imágenes seleccionados de óxido de hierro, complejos de gadolinio, verde de indocianina, sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, o emisores de positrones (por ejemplo, ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu),

5 sustancias sensibles a estímulos seleccionadas de nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de oro, o cualquier sustancia activable por radiación,

agentes de conexión seleccionados de oligopéptidos (por ejemplo, poli-lisina, poli(leucina-lisina), poli(leucina-lisina-lisina-leucina),

un agente de penetración celular seleccionado de secuencias transactivadoras de la transcripción (TAT), penetratina, secuencias de poliarginina, o secuencias proteicas VP22,

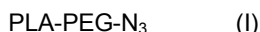
10 un agente detoxificante seleccionado de cobalamina, cobinamida, enzima rodanasa, una enzima hidrolizante de organofósforo, naloxona, atropina, o anticuerpos/fragmentos de anticuerpo que reconocen una toxina específica; o un fármaco seleccionado de un antibiótico, agente antineoplásico, agente antivírico, agente anti-inflamatorio, un antígeno de vacuna o un nutraceutico.

15 De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere al proceso de preparación de los compuestos de fórmula (A) anterior.

Dicho proceso de preparación de un compuesto de fórmula (A) comprende acoplar:

- un compuesto de fórmula (I):

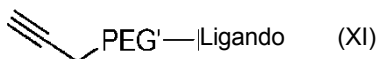
20



con

- un compuesto de fórmula (XI):

25



donde PLA, PEG, PEG', y Ligando se definen como en la fórmula (A) anterior.

30

El acoplamiento puede hacerse por la llamada "química clic". Esta expresión se refiere a cualquier proceso donde un compuesto de azida (N3) se hace reaccionar con un grupo alquino para formar un 1,2,3-triazol.

35 La reacción de acoplamiento de química clic puede realizarse de acuerdo con la reacción de Huisgen aplicando o adaptando cualquier procedimiento experimental de Huisgen conocido, en líneas generales, por los expertos en la materia, en particular, con referencia a las condiciones descritas en *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015. Generalmente, dicha reacción de acoplamiento de química clic se realiza de acuerdo con la reacción de Huisgen, en condiciones orgánicas o acuosas.

40 Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma de una solución en un disolvente orgánico o en forma de nanopartículas en un medio acuoso, opcionalmente que contiene compuestos de fórmula (I') como se define a continuación.

45 En condiciones orgánicas, dicha reacción de acoplamiento de química clic se realiza típicamente en presencia de bromuro de cobre(I) (CuBr) y N,N,N',N',N"-pentametil-dietilentriamina (PMDETA) (*Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015). Esta reacción puede realizarse, entre otras cosas, en un disolvente orgánico tal como dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, ventajosamente en condiciones anhidras. Generalmente, se usa un exceso del compuesto de fórmula (XI).

50

En condiciones acuosas, dicha reacción de acoplamiento de química clic se realiza típicamente de acuerdo con *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015, en particular en presencia de agua, y derivados de cobre tales como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. La presencia de un agente reductor para el catalizador, tal como ascorbato sódico puede ser ventajosa. Generalmente, las condiciones acuosas se usan cuando los compuestos de fórmula (I) están en forma de nanopartículas, en particular en una suspensión acuosa.

55

En la reacción clic, las nanopartículas que comprenden compuestos de fórmula (I) también pueden comprender compuestos de fórmula (I'):

60



donde PLA y PEG se definen como en la fórmula (A) y R es H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, tal como metilo.

Los compuestos de fórmula (I') donde R es metilo se describen, por ejemplo, en el documento US 5.683.723.

65

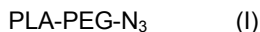
Si fuera necesario, la suspensión de nanopartículas también puede incluir un agente estabilizante, tal como alcohol

polivinílico (PVA), Pluronic® (por ejemplo, Pluronic® F68) o colato sódico.

Los compuestos de fórmula (I) implicados en la preparación de los compuestos de fórmula (A) son otro objetivo distintivo de la invención.

5

La presente invención, por tanto, también se refiere a un compuesto de fórmula (I):



10 donde PLA y PEG se definen como en el compuesto de fórmula (A).

Los compuestos de fórmula (I) pueden formar nanopartículas que son otro objetivo de la presente invención.

Dichas nanopartículas también pueden comprender uno o más compuestos de fórmula (I') idénticos o diferentes:

15



como se ha definido anteriormente.

20 Dichas nanopartículas se ilustran en la Figura 1.

Dichas nanopartículas pueden obtenerse por nanoprecipitación de uno o más compuestos de fórmula (I) idénticos o diferentes como se ha definido anteriormente, opcionalmente en presencia de uno o más compuestos de fórmula (I') idénticos o diferentes.

25

La nanoprecipitación puede realizarse de acuerdo con el método descrito anteriormente respecto a las nanopartículas que comprenden uno o más compuestos de fórmula (A).

30

La nanopartícula que comprende compuestos de fórmula (A) también puede prepararse haciendo reaccionar una nanopartícula que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención y descritos a continuación, con uno o más compuestos de fórmula (XI) como se ha definido anteriormente, opcionalmente seguido de encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.

35

El proceso de la invención es muy versátil porque permite una fácil modificación de las funcionalidades de las nanopartículas formadas por los compuestos de fórmula (A).

40

El proceso de la invención incluye la posibilidad de alterar o ajustar, según se desee, la densidad de los ligandos sobre la superficie de las nanopartículas, mezclando los compuestos de fórmula (I) con copolímero de PLA-PEG en diferentes relaciones para preparar nanopartículas que comprenden compuestos de fórmula (I) o (A) junto con copolímeros de PLA-PEG que no están funcionalizados por un grupo azida (véase la Figura 1), haciéndose reaccionar, después, dichas nanopartículas con los compuestos de fórmula (XI).

45

El proceso de la invención permite el uso de compuestos de fórmula (I) o (A) usando diferentes longitudes de cadena de PEG y PLA (véase la Figura 2) para diversas aplicaciones. Por ejemplo, pueden acoplarse sustancias terapéuticas que son sensibles a degradación en el compartimento sistémico (por ejemplo, oligonucleótidos), a través de un ligando de agente de conexión al PLA-PEG que contiene PEG de longitud de cadena corta y después mezclarse con copolímero de PLA-PEG hecho de PEG de cadena larga, de modo que el PEG de cadena larga forme una superficie de tipo cepillo en que la sustancia terapéutica está enmascarada y protegida de ese modo de la rápida degradación en la circulación sistémica.

50

Además, el proceso de la invención permite combinar diferentes tipos de PLA-PEG-ligando funcional (por ejemplo, PLA-PEG-dispositivo localizador + PLA-PEG-agente de imágenes + PLA-PEG-sustancia sensible a estímulos) para la formación de nanopartículas multifuncionales para aplicaciones de combinación (véase la Figura 3).

55

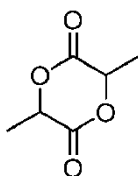
Los compuestos de fórmula (I) son centrales para la invención ya que actúan como una plataforma de copolímero biodegradable susceptible a química clic, sobre la cual podría acoplarse cualquier alquino-ligando funcional usando química clic (por medio de los compuestos de fórmula (XI)), para una diversidad de aplicaciones dependiendo del tipo de ligando funcional, tal como suministro de fármacos, formación de imágenes, destoxificación, etc. Por tanto, las ventajas de la presente invención incluyen, entre otras cosas, la flexibilidad de sintetizar una diversidad de nanopartículas de copolímero acoplado a ligando que podrían administrarse por vía parenteral. Además, la densidad de ligando funcional sobre la superficie de la nanopartícula puede ajustarse mezclando relaciones apropiadas de compuestos de fórmula (I) y compuestos de fórmula (I'). Además, las nanopartículas pueden construirse para que posean restos de PEG de diferente longitud de cadena, para facilitar el suministro intravenoso de sustancias terapéuticas que sean químicamente sensibles en circulación sistémica. Además, la reacción clic para el acoplamiento del ligando funcional puede realizarse antes de la formación de la nanopartícula o sobre la nanopartícula preformada, dependiendo de la naturaleza química del ligando.

65

De acuerdo con un objetivo adicional, la presente invención también se refiere a un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (I), que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



donde PEG se define como en la fórmula (A), y X representa la función azida (N_3) o un halógeno, tal como un átomo de Br, con el compuesto de lactida de fórmula:



seguida, cuando X es un átomo de halógeno, por la reacción del compuesto de fórmula (III) obtenido:



donde PLA y PEG se definen como en la fórmula (A), y Hal representa un átomo de halógeno, tal como Br, con NaN_3 .

20 Esta reacción con la lactida se realiza generalmente por polimerización con apertura de anillo (ROP). Típicamente, esta reacción se realiza en presencia de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Puede realizarse en masa, generalmente bajo calentamiento, o en un disolvente orgánico adecuado con un alto punto de ebullición tal como tolueno o xileno.

25 Generalmente, la cantidad de los compuestos de lactida depende del n deseado en el compuesto de fórmula (I) sabiendo que la reacción siempre puede detenerse antes de completarse. Típicamente, la relación molar entre el macro-iniciador PEG y el catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ está comprendida entre 1 y 10.

La reacción se realiza preferiblemente en condiciones anhidras y/o a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción.

30 La reacción con NaN_3 se realiza generalmente en un disolvente orgánico aprótico tal como DMF, dimetilacetamida (DMA), acetona etc., con un exceso de NaN_3 .

El compuesto de fórmula (II):



puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula (IV):



donde Pg representa un grupo protector de hidroxilo, tal como bencilo (fenil- CH_2 -) y PEG se define como en la fórmula (A) por una reacción de sustitución, seguida de una reacción de desprotección.

45 Un grupo protector Pg, como se menciona a continuación, corresponde a un grupo que posibilita, por un lado, la protección de una función reactiva tal como un hidroxilo o una amina durante una etapa de síntesis y, por otro lado, recuperar la función reactiva intacta a final de la etapa de síntesis. Ejemplos de grupos protectores, así como métodos para proteger y desproteger diversos grupos funcionales, se dan en P. G. M. Wuts y T. W. Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4. ed. (2007), John Wiley & Sons y en J. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973.

50 La reacción de sustitución comprende sustituir el grupo OH con un átomo de halógeno o un grupo azida, mediante el reactivo apropiado, tal como N-halogenosuccinimida (por ejemplo, N-bromosuccinimida (NBS)) o azida sódica, respectivamente.

55 Cuando tiene que sustituirse un grupo halógeno, esta reacción se realiza generalmente con el reactivo apropiado de N-halogenosuccinimida, con PPh_3 en un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano.

60 Cuando tiene que sustituirse un grupo azida, puede realizarse una sustitución inicial con un grupo saliente, del siguiente modo:

- 1) sustitución del grupo OH del compuesto de fórmula (IV) con un grupo saliente,
- 2) sustitución del grupo saliente del compuesto obtenido en la etapa 1) con un grupo azida (N_3).

5 Como se usa en este documento, un "grupo saliente" corresponde a un grupo que puede escindirse fácilmente de una molécula rompiendo un enlace heterolítico (es decir, un enlace cuya fisión genera un catión y un anión), con salida de un par electrónico. Este grupo después puede remplazarse fácilmente por otro grupo funcional, durante una reacción de sustitución, por ejemplo. Dichos grupos salientes pueden consistir en átomos de halógeno o grupos hidroxil activados, tales como grupos mesilato, tosilato, triflato o acetilo, etc. Ejemplos de grupos salientes, así como referencias relacionadas con su preparación, se dan en «Advances in Organic Chemistry», J. March, 3ª Edición, Wiley Interscience, pág. 310-316.

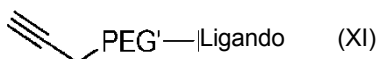
10 Por ejemplo, en la etapa 1), el grupo saliente es un mesilato y, por tanto, la sustitución se realiza en presencia de cloruro de mesilo ($MsCl$). Típicamente, esta reacción se realiza en presencia de DMAP, en un disolvente orgánico tal como diclorometano.

15 La sustitución del grupo saliente con el grupo azida en la etapa 2) puede realizarse en presencia de azida sódica, en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF.

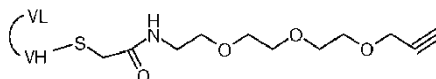
20 La etapa de desprotección comprende hidrolizar el grupo protector Pg del compuesto sustituido con halógeno o azido obtenido, para obtener el compuesto de fórmula (II).

25 La hidrólisis se realiza típicamente en condiciones ácidas, de acuerdo con procedimientos bien conocidos, en particular usando HCl concentrado cuando Pg- es $fenil-CH_2-$.

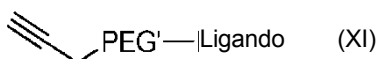
También se describe un compuesto de fórmula (XI):



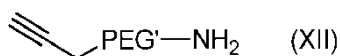
30 donde PEG' y Ligando se definen como en la fórmula (A); en particular, compuestos (XI) con la excepción de



35 El proceso de preparación de compuesto (A) puede comprender la etapa adicional de preparar el compuesto de fórmula (XI):



40 que comprende acoplar
- un compuesto de fórmula (XII);



45 con
- un precursor de ligando
donde PEG' y Ligando se definen como en la fórmula (A) anterior.

50 Un "precursor de ligando" es un compuesto que, cuando se hace reaccionar con el grupo $-NH_2$ de un compuesto de fórmula (XII) conduce al grupo -Ligando, donde Ligando es un resto de un ligando funcional como se define en la fórmula (A).

55 Dicho acoplamiento puede realizarse en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico, en presencia de una base.

Dicho agente de acoplamiento peptídico puede elegirse de agentes conocidos de acoplamiento peptídico y más particularmente de PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) o EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida).

60 La base puede ser cualquier base orgánica o mineral, más particularmente una base mineral tal como trietilamina (TEA) o N,N-diisopropiletildiamina (DIPEA).

En cuanto a combinaciones particular, en una realización, se usa PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) con N,N-diisopropiletildiamina (DIPEA) y, en otra realización, se usa EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida) con trietilamina.

- 5 La reacción puede realizarse en un disolvente orgánico adecuado tal como diclorometano, DMF o dimetilsulfóxido (DMSO).

Precusores de ligando representativos incluyen:



que es un precursor de anisamida, que conduce a Ligando- =



- que es un resto de anisamida;
 ácido fólico;
 FP-547-NHS que conduce a Ligando- = -NH-C(=O)-(CH₂)₂-FP547 que es un resto de FP547.

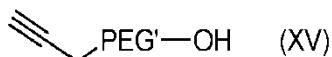
- 20 De acuerdo con una realización, el compuesto de fórmula (XII) puede prepararse por:
 - reacción de un compuesto de fórmula (XIII):



- 25 con un compuesto de fórmula (XIV):



- 30 y una base,
 donde PEG' se define como en la fórmula (A) y Hal' representa un átomo de halógeno tal como Br,
 para formar el compuesto de fórmula (XV):



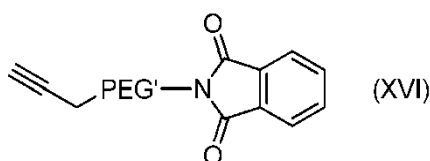
- 35 seguido de:
 - transformación del compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII).

La reacción del compuesto de fórmula (XIII) con el compuesto de fórmula (XIV) se realiza generalmente en presencia de una base fuerte, tal como NaH, en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF.

- 40 La transformación del compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII) puede conseguirse por diversos métodos.

En particular, puede comprender:

- 45 - reacción del compuesto de fórmula (XV) con ftalimida y PPh₃ para formar el compuesto de fórmula (XVI):



seguido de:

- reacción del compuesto de fórmula (XVI) con hidrazina hidrato para formar el compuesto de fórmula (XII).

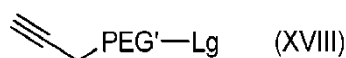
La reacción del compuesto de fórmula (XV) con ftalimida y PPh_3 se realiza generalmente en un disolvente orgánico adecuado tal como THF, en presencia de azodicarboxilato de diisopropilo (DIPAD), típicamente a temperatura ambiente.

La reacción del compuesto de fórmula (XVI) obtenido con hidrazina hidrato ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) puede realizarse en etanol como disolvente.

- 10 Como alternativa, la transformación del compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII) comprende:
- reacción del compuesto de fórmula (XV) con un compuesto de fórmula (XVII):



- 15 donde Lg es un grupo saliente y Hal'' es un átomo de halógeno, para formar el compuesto de fórmula (XVIII):



- 20 seguido de:
- reacción del compuesto de fórmula (XVIII) obtenido con hidrazina hidrato ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y ftalato de potasio, para formar el compuesto de fórmula (XII).

En la fórmula (XVII), Lg es ventajosamente un grupo metanosulfonilo (Ms) y Hal'' puede ser un átomo de Cl.

Esta reacción generalmente se realiza en presencia de una base, tal como una base orgánica, por ejemplo, trietilamina (Et_3N), y opcionalmente un catalizador tal como dimetilaminopiridina (DMAP) y/o en un disolvente orgánico adecuado tal como diclorometano.

- 30 La reacción del compuesto de fórmula (XVIII) obtenido se realiza generalmente añadiendo primero ftalato de potasio y cantidades catalíticas de yoduro sódico (NaI) en un disolvente tal como DMF, seguido de retirada del disolvente y añadiendo hidrazina hidrato ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un disolvente tal como etanol.

De acuerdo con una realización adicional, el compuesto de fórmula (XII) también puede prepararse por:

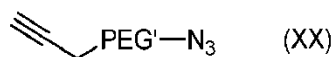
- 35 - reacción de un compuesto de fórmula (XIX):



con un compuesto de fórmula (XIV):



donde Hal' es un átomo de halógeno, tal como Br y PEG' se define como en la fórmula (A), para formar el compuesto de fórmula (XX):

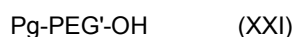


- seguido de:
- reacción del compuesto de fórmula (XX) con trifetilfosfina (PPh_3), que conduce al compuesto de fórmula (XII).

La reacción de un compuesto de fórmula (XIX) con un compuesto de fórmula (XIV) se realiza generalmente en presencia de una base, tal como NaH, en un disolvente orgánico tal como DMF.

La reacción del compuesto de fórmula (XX) con trifetilfosfina (PPh_3) se realiza generalmente en un disolvente tal como tetrahidrofurano (THF), opcionalmente en presencia de agua.

El compuesto de fórmula (XIX) puede prepararse a partir del compuesto de fórmula (XXI):



donde Pg se define como en la fórmula (IV), por una reacción de sustitución, seguido de una reacción de desprotección.

Las reacciones de sustitución y desprotección pueden realizarse como respecto al compuesto (II) como se ha analizado anteriormente.

5 El proceso de la invención también puede comprender la etapa de aislar o purificar los compuestos obtenidos después de cada etapa, si se desea o requiere, y/o realizar las etapas deseadas en secuencia.

10 El compuesto así preparado puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse por destilación del disolvente de la mezcla de reacción o, si fuera necesario después de retirar por destilación el disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de la extracción con un disolvente orgánico inmisible en agua y retirando por destilación el disolvente del extracto. Además, el producto puede purificarse adicionalmente, si se desea, por diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, de forma notable cromatografía en columna o cromatografía preparativa en capa fina.

15 En los procesos anteriores, los compuestos de partida y reactivos, salvo que se indique de otro modo, están disponibles en el mercado o se describen en la bibliografía, o pueden prepararse de acuerdo con métodos descritos en la bibliografía, como se describe en los ejemplos a continuación o como saben los expertos en la materia.

20 Los expertos en la materia apreciarán variaciones en los procesos descritos anteriormente como necesarios y también son parte de la invención. Las modificaciones y sustituciones apropiadas son fácilmente evidentes y bien conocidas o fácilmente obtenibles a partir de la bibliografía científica para los expertos en la materia. En particular, dichos métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH publishers, 1989.

25 El compuesto de fórmula (A) o las nanopartículas que comprenden al menos un compuesto de fórmula (A) de la invención pueden ser útiles para la preparación de medicamentos.

30 Por lo tanto, otro objetivo de la invención es un medicamento, que comprende al menos un compuesto de fórmula (A), opcionalmente en forma de una nanopartícula de la invención.

Otro objetivo de la invención es también una composición farmacéutica, que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (A) opcionalmente en forma de una nanopartícula de la invención con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 Estas composiciones farmacéuticas comprenden una dosis eficaz de al menos un compuesto (A) de acuerdo con la invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Dichos excipientes se eligen de acuerdo con la forma farmacéutica y la vía de administración deseada, entre excipientes habituales conocidos por los expertos en la materia.

45 En las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica o rectal, el principio activo puede administrarse como forma monodosis, en mezcla con excipientes farmacéuticos habituales, a animales y seres humanos.

50 Las formas monodosis apropiadas comprenden las formas orales, tales como comprimidos, cápsulas duras o blandas de gelatina, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, las formas sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, por inhalación, formas tópica, transdérmica, sub-cutánea, intramuscular, intravenosa o intra-arterial, rectal y los implantes. Para la aplicación tópica, los compuestos de la invención pueden usarse como cremas, geles, pomadas o lociones.

Como un ejemplo, una forma monodosis para un compuesto de acuerdo con la invención, en forma de un comprimido, puede comprender los siguientes ingredientes:

El compuesto de acuerdo con la invención	50,0 mg
Manitol	223,75 mg
Croscarmelosa sódica	6,0 mg
Almidón de maíz	15,0 mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	2,25 mg
Estearato de magnesio	3,0 mg

55 En casos específicos, pueden ser apropiadas dosificaciones superiores o inferiores; estas dosificaciones están comprendidas dentro del alcance de la presente invención. De acuerdo con la práctica habitual, la dosificación

adecuada para cada paciente se determina por el médico de acuerdo con la vía de administración, el peso y respuesta del paciente.

Figuras

5 La Figura 1 ilustra nanopartículas PLA-PEG-N₃ susceptible a química clic de superficie expuesta con diferente densidad de N₃. La densidad de N₃ sobre la superficie de la nanopartícula puede alterarse según se desee mezclando una relación apropiada de PLA-PEG-N₃ con copolímero de PLA-PEG.

10 La Figura 2 ilustra una nanopartícula de PLA-PEG susceptible a química clic sintetizada usando diferentes longitudes de cadena de PEG (más cortas y más largas) para facilitar la carga y suministro intravenoso de sustancias químicamente sensibles (por ejemplo, oligonucleótidos).

15 La Figura 3 ilustra una nanopartícula multifuncional preparada mezclando una diversidad de copolímeros de PLA-PEG-ligando funcional en relaciones apropiadas para aplicaciones de combinación (por ejemplo, una nanopartícula que contiene dispositivo localizador, agente de imágenes, agente sensible a estímulos).

20 La Figura 4 representa la evaluación de la capacidad de unión del receptor de nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico usando experimentos de resonancia de plasmón superficial. El gráfico indica la evolución de la señal específica (unidad de resonancia, indicada RU) respecto a la concentración de ácido fólico en las nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico.

25 La Figura 5a ilustra la citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico (■ = S1) comparativamente con nanopartículas de PLA-PEG-OMe (◆ = S2) sobre células KB-3-1 que sobre-expresan los receptores de folato.

La Figura 5b ilustra la citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-anisamida (■ = S3) comparativamente con las nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-OMe (◆ = S4) sobre células PC-3 que expresan los receptores sigma.

30 La Figura 6a ilustra la capacidad de penetración celular de las nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-ácido fólico (■ = S3') y las nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-OMe (◆ = S4') sobre células KB-3-1 que sobre-expresan los receptores de folato.

35 La Figura 6b ilustra la capacidad de penetración celular de las nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-ácido fólico (■ = promedio de S1', S3' y S5') y las nanopartículas fluorescentes de PLA-PEG-OMe (◆ = promedio de S2', S4' y S6') sobre células KB-3-1 que sobre-expresan los receptores de folato. Las señales de fluorescencia se han racionalizado respecto a la fluorescencia de cada muestra antes del experimento.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos describen la síntesis de algunos compuestos de acuerdo con la invención. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes y solamente ilustran la presente invención. Los números de los compuestos ejemplificados se refieren a los de la tabla dada posteriormente, que ilustra las estructuras químicas y las propiedades físicas de varios compuestos de acuerdo con la invención.

Abreviaturas:

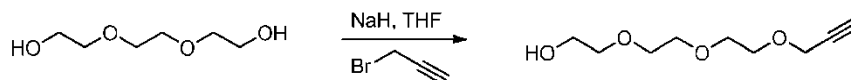
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximatoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
ACN	Acetonitrilo
50 N ₃	Azida
Bz	Bencilo
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
CuBr	Bromuro de cobre(I)
CuSO ₄	Sulfato de cobre(II)
55 cHex	Ciclohexano
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
Et ₂ O	Éter dietílico
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
60 DMSO	Dimetilsulfóxido
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DLS	Dispersión de luz dinámica
65 EPR	Permeabilidad y retención potenciadas
equiv., eq.	Equivalente

	EtOH	Etanol
	AcOEt	Acetato de etilo
	EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
	FBS	Suero bovino fetal
5	FC	Canal de flujo
	FP-547	Fluoprobe-547
	FBP	Proteína de unión a folato
	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	N ₂ H ₄ ·H ₂ O	Hidrazina hidrato
10	HBr	Ácido bromhídrico
	HCl	Ácido clorhídrico
	IgG	Inmunoglobulina G
	MgSO ₄	Sulfato de magnesio
	MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
15	MeOH	Metanol
	Ome	Metoxi
	EDC	Clorhidrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
	PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -pentametildietilentriamina
	DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
20	NP	Nanopartícula
	NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
	NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
	RMN	Resonancia magnética nuclear
	<i>Mn</i>	Peso molecular promedio en número
25	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	PLA	Poli(ácido D,L-láctico)
	PLGA	Poli(D,L-lactida-co-glicólida)
	PEG	Poli(etilenglicol)
	Pdl	Índice de polidispersidad
30	PVA	Poli(alcohol vinílico)
	R.U.	Unidad de resonancia
	ROP	Polimerización con abertura de anillo
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño
35	NaN ₃	Azida sódica
	NaCl	Cloruro sódico
	NaCh	Colato sódico
	NaH	Hidruro sódico
	NaOH	Hidróxido sódico
40	NaI	Yoduro sódico
	Sn(Oct) ₂	Octoato estañoso
	SPR	Resonancia de plasmón superficial
	THF	Tetrahidrofurano
	Et ₃ N (TEA)	Trietilamina
45	PPh ₃	Trifenilfosfina
	<i>Mw</i>	Peso molecular promedio en peso

Ejemplo 1: Preparación de precursores para preparar nanopartículas

50 Preparación 1: Síntesis de un compuesto de fórmula (XII)

1. Procedimiento para la síntesis de mono-alquino polietilenglicol (Preparación 1 A)



55 Procedimiento experimental:

Se disolvió trietilenglicol (Sigma-Aldrich, 5620 mg, 37,4 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (50 ml) y la solución resultante se enfrió hasta 0°C en condiciones secas. Se añadió lentamente hidruro sódico (988 mg, 1,1 equiv.) seguido de adición gota a gota de bromuro de propargilo (80% en peso en tolueno, 4360 µl, 1,1 equiv.). La reacción se agitó durante 12 h a temperatura ambiente en atmósfera inerte.

Proceso de tratamiento:

El THF se retiró a presión reducida y el residuo se recogió en cloruro de metileno (diclorometano, DCM) y se lavó

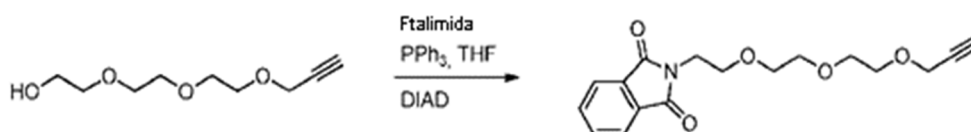
varias veces con salmuera. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio (MgSO_4), se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: ciclohexano (cHex)/acetato de etilo (AcOEt): 8/2) y se recuperaron 3,31 g de un aceite amarillo (47% de rendimiento).

Caracterización de RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4,15 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,70 - 3,60 (m, 10H), 3,57 - 3,53 (m, 2H), 2,70 (m, 1 H), 2,41 (t, $J = 2,4$ Hz, 1 H).

2. La síntesis del compuesto de ftalimida-alquino trietilenglicol se ha hecho usando dos rutas diferentes, por una etapa o por dos etapas mediante un intermedio de mesilato.

2a) Procedimiento de una etapa para la síntesis de ftalimida-alquino trietilenglicol (Preparación 1B)



Procedimiento experimental:

Se disolvieron preparación 1A (2000 mg, 10,6 mmol, 1 equiv.), ftalimida (2345 mg, 1,5 equiv.) y trifetilfosfina (4179 mg, 1,5 equiv.) en THF anhidro (50 ml) en condiciones secas. Se añadió lentamente azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (3,14 ml, 1,5 equiv.) y la reacción se agitó durante 48 h a temperatura ambiente en atmósfera inerte.

Proceso de tratamiento:

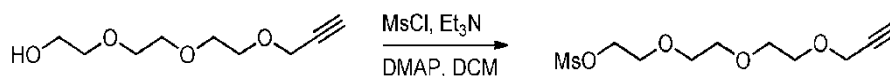
El THF se retiró a presión reducida y el residuo se recogió en DCM y se lavó varias veces con salmuera. La capa orgánica resultante se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: cHex/AcOEt: 8/2) y se recuperaron 3,37 g de un aceite amarillo (60% de rendimiento).

Caracterización de RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (dd, $J = 5,4, 3,1$ Hz, 2H), 7,64 (dd, $J = 5,4, 3,1$ Hz, 2H), 4,08 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,74 (dt, $J = 11,4, 6,0$ Hz, 4H), 3,60 - 3,50 (m, 8H), 2,38 (t, $J = 2,4$ Hz, 1 H).

2b) Para la síntesis de dos etapas de ftalimida-alquino trietilenglicol, primero se sintetizó el mesilato del siguiente modo:

Procedimiento para la síntesis de mesil-alquino trietilenglicol (Preparación 1C)



Procedimiento experimental:

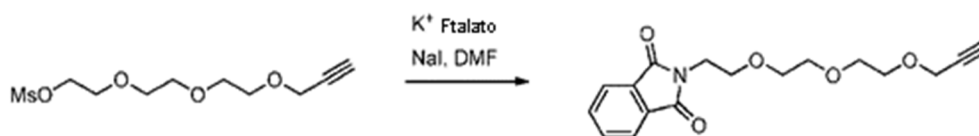
A una solución de alquino trietilenglicol (preparación 1A, 4 g, 212 mmol, 1 equiv.) en DCM (60 ml) se añadió en atmósfera inerte una cantidad catalítica de DMAP, cloruro de metanosulfonilo (3,3 ml, 2 equiv.) y trietilamina (5,9 ml, 2 equiv.) gota a gota. La reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente.

Proceso de tratamiento:

La solución se lavó con salmuera (tres veces con 50 ml), la fase acuosa después se extrajo con DCM (50 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida.

El producto final se implicó directamente (sin caracterización) en la siguiente etapa.

2c) Procedimiento para la síntesis de ftalimida-alquino trietilenglicol (Preparación 1D)

Procedimiento experimental:

- 5 A una solución de mesil-alkino trietilenglicol (preparación 1C, 5,1 g, 19,2 mmol, 1 equiv.) en DMF (100 ml) se añadió ftalato potásico (7,87 g, 2,2 equiv.) y una cantidad catalítica de yoduro sódico (menos de un equivalente, por ejemplo, una punta de espátula). La solución se agitó a 80°C durante una noche y el disolvente se retiró a presión reducida.

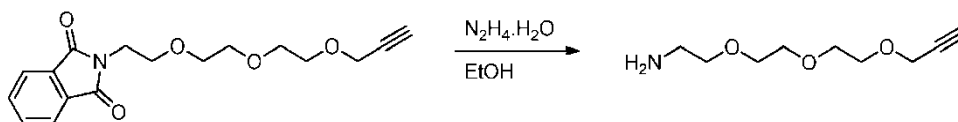
10 Proceso de tratamiento:

El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: cHex/AcOEt: 2/8 a 4/6). Se recuperaron 5,7 g de aceite amarillo (94% de rendimiento).

15 Caracterización de RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,81 (dd, $J = 5,5, 3,0$ Hz, 2H), 7,69 (dd, $J = 5,5, 3,0$ Hz, 2H), 4,13 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,80 (dt, $J = 11,4, 6,0$ Hz, 4H), 3,65 - 3,56 (m, 8H), 2,40 (t, $J = 2,4$ Hz, 1 H).

- 20 3) Procedimiento para la síntesis de amino-alkino trietilenglicol (Preparación 1E)

Procedimiento experimental:

- 25 Se disolvió preparación 1B (2034 mg, 6,4 mmol, 1 equiv.) en etanol (EtOH) (200 ml) y se añadió hidrazina hidrato (3,1 ml, 10 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante una noche en condiciones de reflujo.

Proceso de tratamiento:

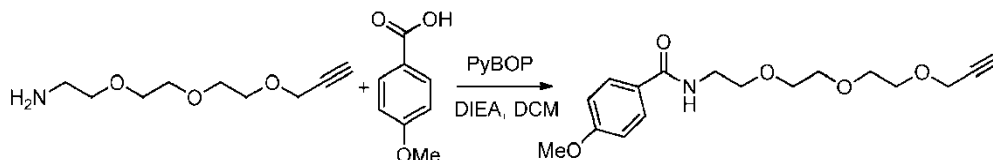
- 30 La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadieron 8 ml de ácido clorhídrico concentrado a la reacción (pH ~2-3). El precipitado se retiró por filtración y se aumentó el pH por encima de 10 usando NaOH (2 M). La fase acuosa se extrajo tres veces con DCM. La capa orgánica resultante se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. Se recuperaron 911 mg de aceite amarillo (76% de rendimiento).

35 Caracterización de RMN:

- 40 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4,13 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,69 - 3,50 (m, 8H), 3,43 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,79 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,38 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 1,33 (s, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 79,64, 74,53, 73,47, 70,59, 70,40, 70,25, 69,09, 58,37, 41,80.

Preparación 2: Síntesis de un compuesto de fórmula (XI)

- 45 1) Procedimiento para la síntesis de anisamida-alkino trietilenglicol (Preparación 2A)

Procedimiento experimental:

- 50 A una solución de preparación 1E (200 mg, 1,07 mmol, 1 equiv.) en DCM (20 ml) se añadió, en atmósfera inerte, PyBOP (780 mg, 1,4 equiv.), ácido *p*-metoxibenzoico (229 mg, 1,4 equiv.) y DIEA (260 μl , 1,4 equiv.). La reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente.

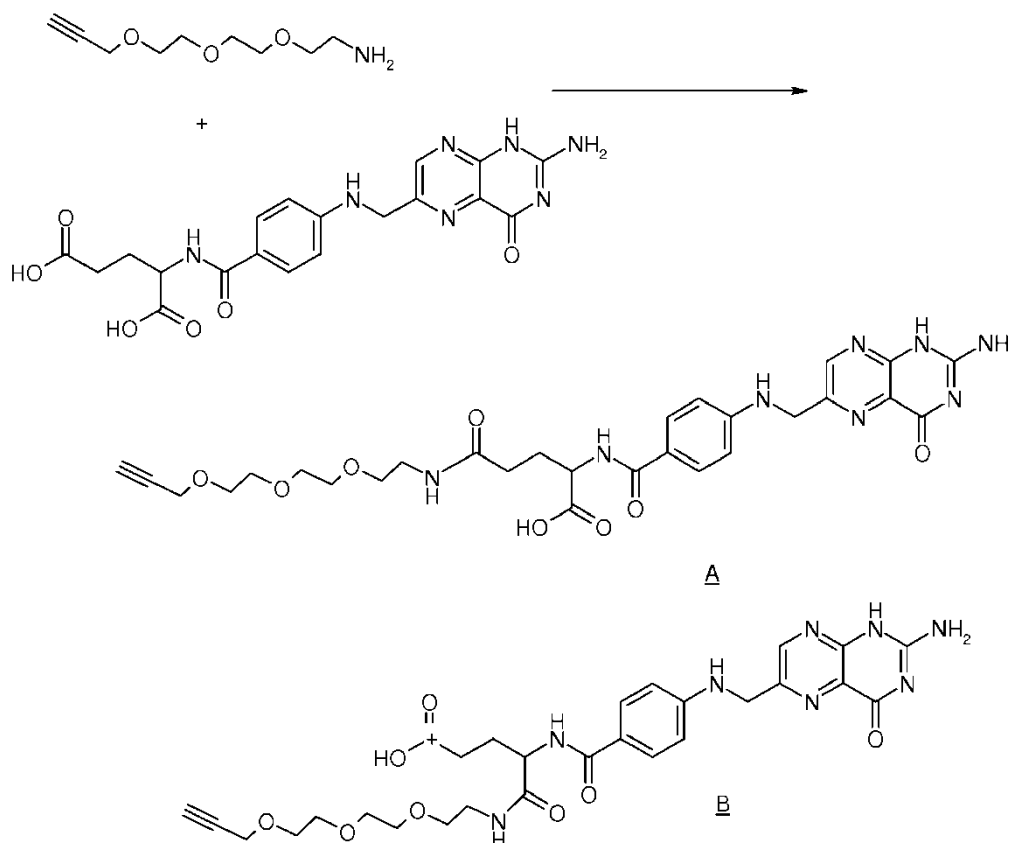
Proceso de tratamiento:

La solución se lavó con salmuera (tres veces con 20 ml), la fase acuosa después se extrajo con DCM (20 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: cHex/AcOEt: 5/5 a 7/3) y se recuperaron 300 mg de aceite amarillo (90% de rendimiento).

Caracterización de RMN:

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,87 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,84 (ancho, 1 H), 4,14 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,71 - 3,53 (m, 12H), 2,42 (t, J = 2,4 Hz, 1 H).

2) Procedimiento para la síntesis de ácido fólico-alquino trietilenglicol (Preparación 2B)



Procedimiento experimental:

A una solución de preparación 1E (319 mg, 1,70 mmol, 1 equiv.) en DMF (70 ml) se añadió, en atmósfera inerte, EDC (393 mg, 1,2 equiv.), NHS (236 mg, 1,2 equiv.) y unas pocas gotas de trietilamina (Et₃N). La reacción se calentó hasta 50°C y se añadió ácido fólico (Sigma-Aldrich, 754 mg, 1 equiv.) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se agitó durante una noche a 50°C.

Proceso de tratamiento:

La solución se concentró a presión reducida. El residuo se precipitó en DCM y acetona, se filtró y se secó al vacío.

El producto obtenido se analiza en una columna en fase inversa (C18, Kromasil 10 μm, 4,6 x 250 mm), por ejemplo, usando un gradiente de acetonitrilo del 5 al 95% en tampón acetato amónico (ajustado a pH 5) 20 mM en 20 min, después acetonitrilo al 95% durante 5 min.

El producto se solubiliza en DMF al 20% en el eluyente. La purificación se realiza en Kromasil C18 10 μm compactada en una columna de 100 mm (1,5 kg de fase) y elución en un tampón acetato amónico al 85% pH 5, 20 mM y acetonitrilo al 15%, se eluyen 200 mg de producto sin procesar al mismo tiempo como el pico de inyección de DMF.

Proceso de purificación (Compuesto B):

La purificación final se hace solubilizando 200 mg del producto sin procesar usando HPLC preparativa con una columna en fase inversa Waters XBridge C18 (30 x 100 mm), 5 μ m.

- 5 El producto primero se disuelve en DMSO (5 ml) y 5 ml de solución de tampón (carbonato de amonio 10 mM ajustado a pH 9,3 con una solución acuosa al 28% de amoniaco). Se hicieron 10 inyecciones de 1 ml usando un gradiente que va desde 95:5 (solución de tampón (carbonato de amonio)/acetonitrilo) a 5:95 en 12 min a 30 ml/min.

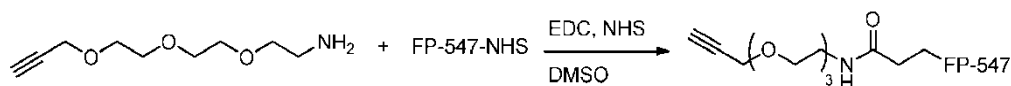
Caracterización de RMN (Compuesto B):

- 10 ^1H RMN (400 MHz, DMSO, d_6) δ 12,0-11,0 (s ancho, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,29 (s ancho, 1 H), 7,8 (t, $J = 6,1$ Hz, 1 H), 7,67 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,03 (s ancho, 2H), 6,85 (t ancho, $J = 6,3$ Hz, 1 H), 6,62 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 4,44 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H), 4,31 (m, 1 H), 4,12 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H), 3,57 - 3,36 (m, 11 H), 3,35 - 3,1 (m, 2H), 2,23 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,91 (m, 2H)

Caracterización LCMS:

611 [M+H]⁺

- 20 3) Procedimiento para la síntesis de FP547-alquino trietilenglicol (Preparación 2C)



Procedimiento experimental:

- 25 A una solución de FP-547-NHS (Interchim, 2,5 mg, 2,55 μ mol, 1 equiv.) en DMSO (356 μ l) se añadió una solución de DMSO (92 μ l) que contenía EDC (0,49 mg, 1 equiv.), NHS (0,29, 1 equiv.), TEA (0,35 μ l, 1 equiv.) y preparación 1E (1,07 mg, 2,2 equiv.).

- 30 La solución se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 h.

Proceso de tratamiento:

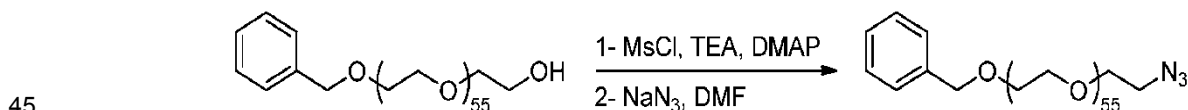
- 35 La reacción se concentró a presión reducida, se disolvió en DCM y se extrajo con salmuera. Se obtuvo un aceite rosa.

Caracterización de espectroscopía ultravioleta visible (UV/Vis) y fluorescencia:

- 40 Los espectros obtenidos fueron similares al dado por la fuente comercial del compuesto fluoróforo.

Preparación 3: Síntesis de un compuesto de fórmula (II)

- 1) Procedimiento para la síntesis de benciloxi-azida PEG2500 (Preparación 3A)



Procedimiento experimental:

- 50 A una solución de PEG2500-bencilo (Polymer Source, $M_n = 2572$ g.mol⁻¹, 2,43 g, 0,94 mmol, 1 equiv.), DMAP (58 mg, 0,5 equiv.) y TEA (747 μ l, 5,6 equiv.) en DCM (65 ml), enfriada hasta 0°C, se añade lentamente MsCl (326 μ l, 4,4 equiv.) durante 20 min. La reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El residuo se disuelve en DMF (20 ml) y se añade azida sódica (330 mg, 5,3 equiv.) a la solución. La reacción se agita a 50°C durante 24 h.

- 55 Proceso de tratamiento:

La reacción se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en DCM (50 ml) y se lava con salmuera (tres veces con 50 ml). La capa orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra y se concentra a presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Lo último se precipita en éter dietílico. Se obtienen 2,16 g de un polvo blanco.

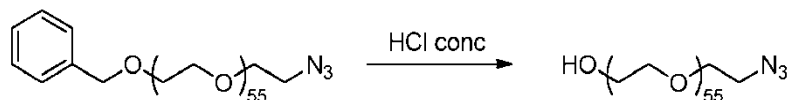
- 60

Caracterización de RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,30 - 7,05 (m, 5H), 4,43 (s, 2H), 3,93 - 3,03 (m, 222H), 3,27 (t, 2H).

2) Procedimiento para la síntesis de azida PEG2500 (Preparación 3B)

5



Procedimiento experimental:

10 Se solubiliza preparación 3A (2,16 g, 0,83 mmol, 1 equiv.) en HCl concentrado (20 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 2 días.

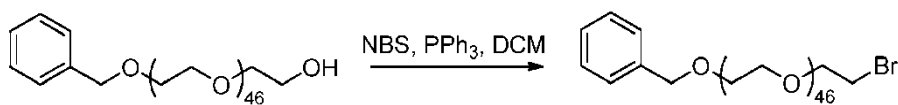
Proceso de tratamiento:

15 La solución se basicifica hasta pH 1 con una solución de NaOH conc. La fase acuosa se extrae con DCM (cuatro veces con 50 ml) y las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentran a presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Lo último se precipita en éter dietílico. Se obtienen 1,89 g de un polvo blanco.

20 Caracterización de RMN:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,73 - 3,33 (m, 222H), 3,27 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 2,75 (s, 1 H).

25 3) Procedimiento para la síntesis de benciloxi-bromo PEG2100 (Preparación 3C)



Procedimiento experimental:

30 A una mezcla de PEG2100-bencilo preparado de acuerdo con Nicolas et al. Macromol 2008, 41, 8418 ($M_n = 2176$ g.mol⁻¹, 500 mg, 0,23 mmol, 1 equiv.) y NBS (50 mg, 1,2 equiv.) se añade una solución fría de trifetilfosfina (PPh₃) (75 mg, 1,2 equiv.) en DCM (50 ml). La reacción después se agita durante una noche a temperatura ambiente.

Proceso de tratamiento:

35 La reacción se concentra a presión reducida hasta 25 ml y se diluye con hexano (100 ml). El precipitado (óxido de trifetilfosfina) se retira por filtración y el polímero se precipita dos veces en éter dietílico (200 ml).

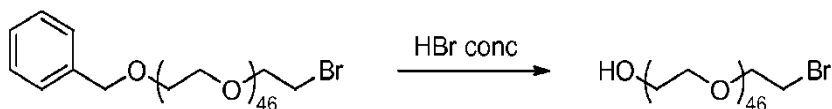
Caracterización de RMN:

40

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,30 - 7,16 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 3,85 - 3,15 (m, 188H)

4) Procedimiento para la síntesis de bromo PEG2100 (Preparación 3D)

45



Procedimiento experimental:

50 Se solubiliza preparación 3C (500 mg, 0,22 mmol, 1 equiv.) en HBr concentrado (20 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 2 días.

Proceso de tratamiento:

55 La solución se basicifica hasta pH 1 con una solución de NaOH conc. La fase acuosa se extrae con DCM (cuatro veces con 50 ml) y las capas orgánicas combinadas se secan sobre MgSO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Lo último se precipita en éter dietílico para obtenerlo en forma de polvo.

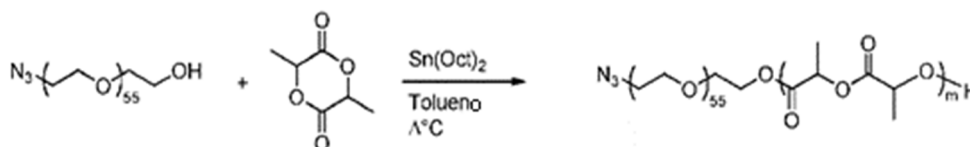
Caracterización de RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3,82 - 3,13 (m, 188H), 2,79 (s, 1 H)

Preparación 4: Síntesis de un compuesto de fórmula (I)

Los compuestos de fórmula (I) se han sintetizado usando 2 rutas diferentes. La primera (4A) es por una etapa y la segunda (4B) es por dos etapas.

Preparación 4A: Síntesis de copolímero de bloque de PLA-PEG- N_3 por polimerización con apertura de anillo (ROP)



siendo m el número de unidades PLA

Procedimiento experimental:

A una mezcla de azido-poli(etilenglicol) (3B, $M_n = 2507 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 293 mg, 0,12 mmol) y D,L-lactida (7,01 g, 48,62 mmol) se añadió, en condiciones secas, una solución de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (18,7 mg, 46,1 μmol) en tolueno anhidro (11,2 ml). La mezcla de reacción se desgasificó por burbujeo de argón durante 20 min y después se agitó en un baño de aceite pre-calentado a 120°C durante 90 min en atmósfera inerte. La reacción se detuvo a aproximadamente el 55% de conversión.

Proceso de tratamiento:

El tolueno se retiró a presión reducida y el producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó adicionalmente en éter dietílico. El precipitado después se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó adicionalmente en agua y posteriormente se secó por congelación durante una noche para producir un polvo blanco.

Caracterización de RMN:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,41 - 4,83 (m, 456H), 4,38 - 4,15 (m, 3H), 3,84 - 3,40 (m, 220H), 3,36 (t, $J = 4,8 \text{ Hz}$, 2H), 1,82 - 1,21 (m, 1372H).

Tabla 1:

M_n (teoría)	m teórico (unidades PLA)	M_n experimental (RMN)	m medido (unidades PLA)
62460	415	35340	228

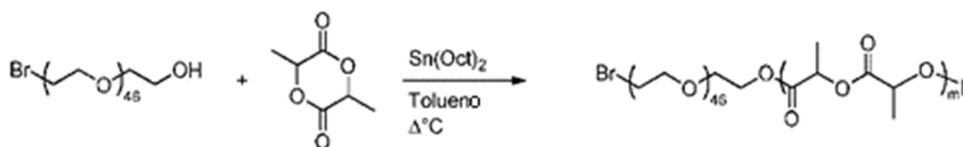
M_n = peso molecular promedio en número determinado por RMN

Teoría: al 100% de conversión

NB: se han sintetizado y usado diferentes lotes del polímero de preparación 4A.

El valor m varía con cada lote. m estaba típicamente entre 180 y 250.

Preparación 4B(1): Síntesis de copolímero de bloque de PLA-PEG-Br por polimerización con apertura de anillo (ROP)



siendo m el número de unidades PLA

Procedimiento experimental:

A una mezcla de bromo-poli(etilenglicol) (3D, $M_n = 2149 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 49 mg, 22,8 μmol) y D,L-lactida (0,72 g, 4,97 mmol) se añadió, en condiciones secas, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (1 mg, 2,5 μmol). La mezcla de reacción se desgasificó con argón durante 20 min y después se agitó en condiciones a granel en un baño de aceite pre-calentado a 120°C durante 20 horas en atmósfera inerte. La reacción se detuvo en conversión completa.

Proceso de tratamiento:

El producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó adicionalmente en éter dietílico. El precipitado después se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó adicionalmente en agua y posteriormente se secó por congelación durante una noche para producir un polvo blanco.

Tabla 2:

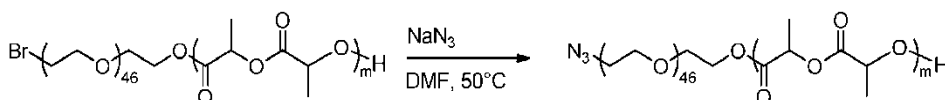
Mn (teoría)	m teórico (unidades PLA)	Mn experimental (RMN)	m medido (unidades PLA)
33510	218	34120	222

Mn = peso molecular promedio en número determinado por RMN

Teoría: al 100% de conversión

m = (Mn experimental determinado por RMN - Mn de PEG-Br)/PM del monómero de lactida = (34120-2100)/144=222

NB: el valor m varía con cada lote. m estaba típicamente entre 100 y 300, más particularmente entre 180 y 250.

Preparación 4B(2): Procedimiento para la síntesis de azida-PEG2100-PLA

m definido como en la tabla anterior.

Procedimiento experimental:

A una solución de preparación 4B(1) (200 mg, 5,9 μ mol, 1 equiv.) en DMF (10 ml) se añade azida sódica (20 mg, 54 equiv.) en condiciones inertes. La reacción después se agita a 50°C durante 3 días en atmósfera inerte.

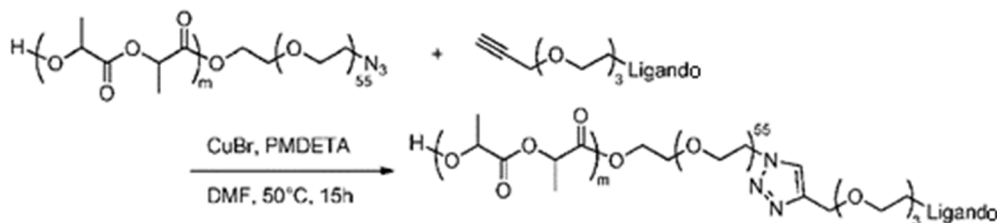
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 - 4,83 (m, 440H), 4,38 - 4,11 (m, 3H), 3,83 - 3,40 (m, 192H), 3,35 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 1,73 - 1,31 (m, 1320H).

Proceso de tratamiento:

La solución se concentra a presión reducida y el residuo se solubiliza en una cantidad mínima de THF. Lo último después se precipita en agua.

Preparación 5: Síntesis de compuestos de fórmula (A)

Procedimiento típico para la reacción de Huisgen en condiciones orgánicas



siendo m el número de unidades PLA, que varía con cada lote.

Ejemplo de procedimiento experimental optimizado:

A una solución previamente desgasificada de compuesto de fórmula (I) PLA-PEG- N_3 preparado de acuerdo con el método descrito para las preparaciones 4A (200 mg, cantidad molar dependiendo del lote, en un caso representativo: 6,7 μ mol, 1 equiv.) y derivado alquino de fórmula (XI) (0,12 mmol, 18 equiv.) en DMF anhidra (2,5 ml), se añadió con una jeringa, una solución desgasificada de CuBr (5,8 mg, 6,1 equiv.) y PMDETA (16,8 μ l, 17,8 equiv.) en DMF anhidra (400 μ l). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a 50°C en atmósfera inerte. Se usó la misma metodología para todas las preparaciones.

Ejemplo de proceso de tratamiento optimizado:

La solución se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó adicionalmente en agua. El precipitado se secó por congelación, se disolvió de nuevo en una cantidad mínima de

THF y se precipitó adicionalmente en agua. El precipitado se secó por congelación para producir un polvo blanco.

Si el derivado de alquino es insoluble en agua entonces puede añadirse una etapa intermedia disolviendo el primer precipitado secado por congelación en una cantidad mínima de DCM y se precipita adicionalmente en éter dietílico.

La última etapa debe ser una precipitación de THF en agua. Además, pueden añadirse etapas de purificación si algo de los materiales de partida permanece posteriormente. Se usó la misma metodología para todas las preparaciones en la fabricación de un compuesto de fórmula (A) (véase la siguiente tabla 3).

Tabla 3:

Ligando	Copo (mg)	Mn* _(Copo) (g/mol)	Alquino-ligando (mg)	Eq. de alquino	CuBr (mg)	Eq. de CuBr	PMDETA (μl)	DMF (ml)	Temp. (°C)	Tiempo (h)
Anisamida	200	35050	32,0	18,0	5,5	6,9	12,0	6,0	40	18
Ácido fólico(*)	200	29580	67,5	16,3	5,8	5,9	16,8	2,9	50	15
FP-547	300	35050	3,0	0,3	6,0	5,1	18,0	4,0	50	15

(*) reacción realizada sobre la mezcla de compuestos A y B de la preparación 2B

Mn*: peso molecular promedio en número determinado por RMN

Copo: PLA-PEG-N₃

Eq.: Equivalente

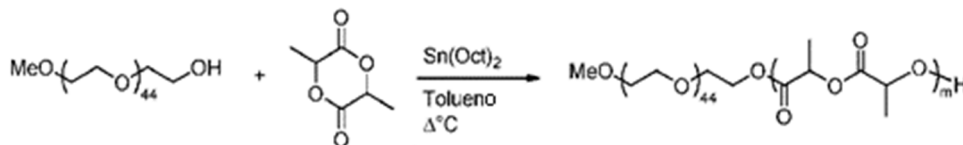
Caracterización de RMN de PLA-PEG-Triazol-PEG'-Anisamida

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (m ancho, 1 H), 8,02 (s, 1 H), 7,81 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 4,97 - 5,48 (m, 389H), 4,50 (s ancho, 4H), 4,10 - 4,26 (m, 3H), 3,80 (s ancho, 5H), 3,30 - 3,67 (m, 198H), 1,28 - 1,62 (m, 1164H)

Rendimiento: 90%

Preparación 6: Síntesis de un compuesto de fórmula (I')

Procedimiento para la síntesis de copolímero de bloque PLA-PEG-OMe por polimerización con apertura de anillo (ROP)



m es el número de unidades PLA

Procedimiento experimental:

A una mezcla de metoxipoli(etilenglicol) (Sigma-Aldrich, $M_n = 2012 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 245 mg, 0,12 mmol) y D,L-lactida (7,01 g, 48,62 mmol) se añadió, en condiciones secas, una solución de Sn(Oct)₂ (18,7 mg, 46,1 μmol) en tolueno anhidro (11,2 ml). La mezcla de reacción se desgasificó por burbujeo de argón durante 20 min y después se agitó en un baño de aceite precalentado a 120°C durante 30 min en atmósfera inerte. La reacción se detuvo a aproximadamente el 54,2% de conversión.

Proceso de tratamiento:

El tolueno se retiró a presión reducida y el producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó adicionalmente en éter dietílico. El precipitado después se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó adicionalmente en agua y posteriormente se secó por congelación durante una noche para producir un polvo blanco.

Caracterización de RMN:

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,34 - 4,85 (m, 434H), 4,40 - 4,17 (m, 3H), 3,86 - 3,41 (m, 178H), 3,36 (s, 3H), 1,77 - 1,19 (m, 1302H).

Tabla 4:

Mn (teoría)	m teórico (unidades PLA)	Mn (RMN)	m medido (unidades PLA)
59560	400	33260	217

Mn = peso molecular promedio en número determinado por RMN
Teoría: al 100% de conversión

5 **Ejemplo 2: Formación de nanopartículas**

Las nanopartículas se prepararon de acuerdo con el siguiente protocolo y usando los componentes y cantidades especificados en las siguientes tablas.

10 Protocolo general

- 1- El copolímero o una mezcla de copolímeros se disuelve en el disolvente orgánico (con una concentración final de polímero acuoso que varía entre 1 a 40 mg/ml)
- 2- La fase orgánica se mezcla con la fase acuosa (con una relación de volumen acuoso/orgánico que varía entre 2,5 a 5) que contiene el estabilizante (concentración que varía entre el 0,1% al 1% p/v). Para la preparación de nanopartículas usando la técnica de emulsificación y reducción de tamaño, la mezcla se agita vigorosamente usando un agitador de vórtice durante 1 minuto para obtener una emulsión. La emulsión se sónica (usando una sonda con un tiempo que varía de 1 a 10 minutos).
- 3- La fase orgánica se retira por evaporación (a presión reducida o flujo de aire)
- 4- Las nanopartículas se ultracentrifugan a 30000 g durante 30 minutos
- 5- Las nanopartículas se resuspenden en medio acuoso
- 6- Las nanopartículas se filtran sobre una disco de filtro de vidrio de 1 µm (Acrodisc)
- 7- Las nanopartículas se almacenan a 4°C hasta su uso

25 Como un ejemplo, se usó el siguiente protocolo donde se usaron 1,2 ml de AcOEt como disolvente orgánico (véanse los últimos 3 ejemplos en la siguiente Tabla 6)

- 1- El copolímero o una mezcla de copolímeros (masa total: 30 mg) se disuelve en AcOEt (1,2 ml)
- 2- La fase orgánica se añade a 3,3 ml de una fase acuosa que contiene un 1% de Pluronic F68
- 3- La mezcla se agita vigorosamente con un agitador de vórtice durante 1 minuto
- 4- La emulsión se ultrasónica (usando una sonda) durante 3 minutos
- 5- La fase orgánica se retira a presión reducida usando evaporador rotario
- 6- Las nanopartículas se ultracentrifugan a 30000 g durante 30 minutos
- 7- Las nanopartículas se resuspenden en 3 ml de solución tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4
- 8- Las nanopartículas se filtran sobre un disco de filtro de vidrio de 1 µm (Acrodisc)
- 9- Las nanopartículas se almacenan a 4°C hasta su uso

Las nanopartículas se caracterizaron usando DLS (dispersión de luz dinámica) y un aparato de Malvern (Zetasizer Nano ZS). Cada copolímero mencionado en las siguientes tablas tiene un peso molecular medio comprendido entre 30000 Da y 35000 Da.

Tabla 5: Nanopartículas hechas de copolímero de PLA-PEG-OMe y PLA-PEG-N₃

Copolímero (%)		Fase orgánica (ml)			Fase acuosa (ml)			Concentración final de Copo (g/l)	Caracterización		
PLA-PEG-OMe	PLA-PEG-N ₃	DCM	EtOAc	Acetona	(colato de Na %)	(PVA. %)	(Pluronic® .%)		Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
100				6,7	12 (0%)			2,8	33	0,22	
100		2,3			11,7 (0,1%)			1,2	Precipitación		
100		2,3			11,7 (0,2%)			10	149	0,15	
100		2,3			11,7 (0,5%)			1,2	133	0,13	
100		2,3			11,7 (1%)			1,2	115	0,17	
100		1			2,5 (1%)			10,2	133	0,07	
100		2,3				11,7 (1%)		10	192	0,12	
100		1				2,5		10,1	300	0,07	

100	2,3	(1%)	11,7 (1%)	10	Precipitación		
100	0,5		2 (1%)	15,4	174	0,12	-8,7
100	1,2		3 (1%)	10,3	129	0,09	-8,3
100	3		7,5 (1%)	4,1	109	0,16	-7,2
100	1,2		4,8 (1%)	6,4	89	0,19	-7,8
100	1,2		3,3 (1%)	9,3	108	0,12	-6,6
83	17	2,3	11,7 (0,2%)	9,9	148	0,14	
83	17	2,3	11,7 (1%)	10	202	0,1	
90	10	1	2,5 (1%)	10,1	227	0,1	
50	50	1	2,5 (1%)	9,9	221	0,14	

Las concentraciones de la concentración de tensioactivos indicadas en la tabla anterior son en % p/v.

Pluronic® = Pluronic F68; Copo= copolímero; Pdl= índice de polidispersidad

PVA = poli(alcohol vinílico) ~9500 Da

PLA = 30.000 Da (promedio); PEG = 2500 Da para PLA-PEG-N₃ y 2000 Da para PLA-PEG-OMe

5 PLA-PEG-OMe preparado de acuerdo con la preparación 6

PLA-PEG-N₃ preparado de acuerdo con la preparación 4A

Tabla 6: Nanopartículas hechas de copolímero de PLA-PEG-Ligando mezclando o no con copolímero de PLA-PEG-OMe

Copolímero PLA-PEG-Ligando (%)	Fase orgánica (ml)			Fase acuosa (ml)			Concentración final de Copo (g/l)	Caracterización					
	Anisamida	Ácido fólico	FP547	DCM	EtOAc	Acetona		colato de Na. (%)	(PVA. %)	(Pluronic® . %)	Tamaño (nm)	Pdl	Zeta (mV)
90	10				1		2,5 (1%)			4	163	0,05	
85	10		5	1			2,5 (1%)			10,1	95	0,18	-29
85	10		5	1			2,5 (1%)	2,5 (1%)		10,1	220	0,16	-13,7
90	10			1			2,5 (1%)			10	224	0,09	
50	50			1			2,5 (1%)			10,1	246	0,14	
90	10				4				10 (1%)	1	90	0,08	
95			5	1			2,5 (1%)			10	90	0,15	-29
95			5	1			2,5 (1%)	2,5 (1%)		10	205	0,11	-13,7
85		10	5	1			2,5 (1%)			10,1	95	0,15	-29
85		10	5	1			2,5 (1%)	2,5 (1%)		10,1	205	0,13	-13,7
90		10		1			2,5 (1%)			10	230	0,07	
50		50		1			2,5 (1%)			10,1	288	0,07	
47,5		47,5	5	1			2,5			10,4	220	0,15	-13,7

50	50	1,2	(1%) 3,3	9,4	113	0,13	-5,7
90	10	1,2	(1%) 3,3	9,3	110	0,14	-5,3
90	10	1,2	(1%) 3,3	9,1	107	0,13	-8,5
	90 10	1,2	(1%) 3,3	9,1	116	0,14	-7,6

Las concentraciones de la concentración de tensioactivos indicadas en la tabla anterior son en % p/v.

Pluronic® = Pluronic F68; Copo= copolímero; Pdl= índice de polidispersidad

PVA = poli(alcohol vinílico) ~9500 Da,

PLA = 30.000 Da (promedio); PEG = 2500 Da para PLA-PEG-N₃ y PEG = 2000 Da para PLA-PEG-OMe

5 PLA-PEG-OMe - preparación 6

PLA-PEG-Anisamida - preparación 5

PLA-PEG-ácido fólico - preparación 5

PLA-PEG-FP547 - preparación 5

10 Las tablas anteriores muestran que:

- DCM/PVA condujo a nanopartículas físicamente estables con un intervalo de diámetro medio de 230 nm

- EtOAc/NaCh produjo nanopartículas físicamente estables con un intervalo de diámetro medio de 160 nm

- EtOAc/Pluronic® condujo a nanopartículas físicamente estables con un intervalo de diámetro medio de 110 nm

- El uso de acetona produjo micelas con un intervalo de diámetro medio de 30 nm

15

Número de ligandos por nanopartícula:

$$N_p = \frac{6 \tau}{d_p \cdot \pi \cdot D^3}$$

20 N_p = Número de nanopartículas (NPs.l⁻¹ de suspensión)

τ = contenido de sólidos (g.l⁻¹)

D = diámetro promedio (cm)

d_p = densidad del polímero (g.cm⁻³)

Para polímeros de PLA la densidad promedio a menudo se cita como 1,24 o 1,27 g.cm⁻³.

25 El diámetro promedio es aproximadamente 110 nm (1,1 x 10⁻⁵ cm).

El contenido de sólidos del polímero es de aproximadamente 10 g.l⁻¹ para la solución madre.

Por lo tanto: $N_p \sim 10^{16}$ NPs.l⁻¹

Considerando que el copolímero tiene un peso molecular de aproximadamente 35000 g.mol⁻¹

30 Considerando que la concentración máxima para ácido fólico sobre la superficie de las nanopartículas (para que las nanopartículas sean estables en solución de PBS pH 7,4) es aproximadamente el 30%.

El número de Avogadro es $N_A = 6,022 \times 10^{23}$ mol⁻¹

Considerando los datos dados anteriormente, hay por nanopartícula:

17000 moléculas de copolímero y 5100 moléculas de ácido fólico (si $Mn_{(copo)}=35000$ g.mol⁻¹)

35 20000 moléculas de copolímero y 6000 moléculas de ácido fólico (si $Mn_{(copo)}=30000$ g.mol⁻¹)

Ejemplo 3: Resonancia de plasmón superficial (SPR) usando nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico

Preparación de chip detector CM5 Serie S (GE Healthcare)

40

Este chip detector se cubre con una matriz de dextrano carboximetilado unido covalentemente a la superficie de oro del chip y compuesto de 4 canales.

Inmovilización de proteína de unión a folato ((FBP), Sigma-Aldrich):

45

El protocolo usado para la inmovilización de la proteína es el descrito por Johnson (Johnson et al Anal. Biochem. 1991, 198, 268-277). En resumen, después de equilibrar el instrumento con PBS pH 7,4, se inyectaron de forma automática y sucesiva las siguientes muestras en el BIAcore T100: (i) NHS/EDC en una solución mixta (1:1, v/v) durante 420 s para activar el dextrano carboxilado; (ii) FBP disuelto a una concentración de 125 µg/ml en tampón acetato (pH 5,0) durante 420 s, (iii) etanolamina durante 420 s para desactivar grupos residuales de NHS-éster en el chip detector. Cada etapa se interrumpió con lavados con PBS. El protocolo de inmovilización, que se realizó a un caudal de 10 µl/min, permitió la unión de ~6,8 ng/mm² de FBP por canal.

50

El primer canal de flujo (Fc1) se bloqueó solamente por etanolamina de modo que pudiera usarse como canal de

referencia para comprobar si el dextrano estaba desempeñando un papel o no en la adsorción de nanopartículas.

Verificación de la conformación de FBP inmovilizado y regeneración de la superficie:

5 Para comprobar si el FBP inmovilizado estaba en la conformación correcta, se usó un anticuerpo policlonal anti-FBP (IgG anti-FBP, Thermo Scientific). Se inyectó la inmunoglobulina G (IgG) a 50 µg/ml durante 120 s a 30 µl/min.

La señal específica es 4,5 veces mayor que la señal no específica (IgG sobre el canal de referencia Fc1) que representa aproximadamente el 22% de la señal total.

10 Se consideró que el uso de glicina y etilenglicol regeneraba la superficie. De hecho, fue posible posteriormente obtener una señal específica similar con la IgG anti-FBP. La suspensión de nanopartículas se ensayó adicionalmente sobre un canal de chip detector a cubierto con proteína recién preparada.

15 Evaluación de la interacción entre nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico y FBP inmovilizado

Se realizaron análisis de resonancia de plasmón superficial de la adsorción de nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico sobre FBP inmovilizado usando nanopartículas de PLA-PEG no conjugadas como control. Estos experimentos se realizaron a un caudal de 5 µl/min con un tiempo de contacto de 500 s.

20 Nanopartículas usadas:

25 Se prepararon diferentes suspensiones de nanopartículas, usando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), con el objetivo de variar la concentración de ácido fólico en la superficie de las nanopartículas. Para hacer esto, las nanopartículas se prepararon a partir de una mezcla de PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g.mol}^{-1}$) y PLA-PEG-Ácido fólico ($M_{n(RMN)}=32880 \text{ g.mol}^{-1}$).

Tabla 7: Sumario de los datos de caracterización de nanopartículas usadas para los experimentos de SPR:

Muestra	Ácido fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
1	24	118,0	0,23	-21,7
2	20	111,6	0,20	-19,6
3	16	106,1	0,18	-19,0
4	12	111,1	0,17	-16,6
5	8	109,1	0,14	-18,0
6	29	116,1	0,23	-21,2
7	0	110,6	0,16	-9,6

Pdl: índice de polidispersidad

30 El porcentaje de ácido fólico se ha calculado a partir de la cantidad de PLA-PEG-ácido fólico usada para cada preparación y el rendimiento del acoplamiento clic entre el alquino-ácido fólico y el PLA-PEG-N₃. Más allá del 30% de ácido fólico las nanopartículas de copolímero se aglomeran.

35 Experimentos de resonancia de plasmón superficial:

Cada suspensión de nanopartícula se ensayó sobre un canal de chip detector cubierto con proteína recién preparada.

40 Tabla 8: Sumario de experimentos realizados:

FC	Superficie	Muestra	RU _{FBP} Inmov	Dilución PBS	Conc. Copo (g/L)	PLA-PEG-ácido fólico (%)	Conc, fólico (µM)	RU _{Nanos}
1	Ref	2	228	0,5	5,03	20%	32,8	
1	Ref	3	228	0,5	5,00	16%	25,8	
1	Ref	4	228	0,5	5,08	12%	19,6	
1	Ref	5	228	0,5	5,04	8%	12,9	
1	Ref	7	228	0,5	5,05	0%	0,0	
1	Ref	6	228	0,5	5,06	29%	48,0	
1	Ref	1	228	0,5	5,02	24%	38,9	24
2	FBP	1	6627	0,5	5,02	24%	38,9	1803
3	FBP	5	7723	0,5	5,04	8%	12,9	2201
4	FBP	7	6865	0,5	5,05	0%	0,0	1062
1	FBP	6	6368	0,5	5,06	29%	48,0	2226
2	FBP	3	5626	0,5	5,00	16%	25,8	2887
3	FBP	2	8249	0,5	5,03	20%	32,8	1667
4	FBP	4	6008	0,5	5,08	12%	19,6	3292

FC = canal de flujo

RU_{FBP Inmov} = unidad de resonancia de FBP inmovilizado
 RU_{Nanos} = unidad de resonancia de nanopartícula inmovilizada
 Copo = copolímero
 PBS = solución salina tamponada con fosfato

5

Análisis de resultados:

Los valores finales de las señales obtenidas de sensogramas SPR de cada muestra se representaron en un gráfico frente a la concentración de ácido fólico sobre las nanopartículas (Figura 4).

10

Por lo tanto, este gráfico muestra la evolución de la señal específica respecto a la concentración de ácido fólico en la superficie de la nanopartícula. Al 12%, se alcanza un máximo donde la señal específica representa aproximadamente el 70% de la señal total. Más allá del 12%, la señal específica disminuye. Esto puede deberse a algún apilamiento entre los diferentes restos de ácido fólico que evita, por tanto, una mejor interacción. La señal no específica se da por el valor para las nanopartículas que no tienen ácido fólico sobre su superficie.

15

Como se muestra en las primeras 7 líneas de la tabla, no importa que las nanopartículas se inyectaran en el canal de referencia, no se obtiene señal. Por lo tanto, la superficie de recubrimiento original (dextrano) no induce ninguna adsorción de las nanopartículas.

20

La no especificidad se debe sin duda al recubrimiento de PEG de las nanopartículas con el FBP.

Ejemplo 4: Citotoxicidad

Ejemplo 4a: Citotoxicidad de nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico

25

Para ensayar estas nanopartículas, se usó la línea celular KB-3-1 (carcinoma humano de cuello del útero, DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures, código de catálogo: ACC 158) ya que expresa receptores de folato.

30

Cultivo celular:

Ésta es una línea celular adherente que crece en monocapas y las células se cultivaron para inducir una sobre-expresión de los receptores de folato. El medio usado para sobre-expresar los receptores de folato fue DMEM 2429 (medio sin ácido fólico) en que se añadieron L-glutamina (200 mM a 0,584 g/l, BioWhittaker, Lonza) y bicarbonato sódico (3,7 g/l, Sigma-Aldrich) y se suplementó con penicilina al 1%/estreptomina (Lonza) y suero bovino fetal (FBS, Lonza) al 10% en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ a 37°C.

35

Nanopartículas usadas:

40

Se prepararon dos suspensiones diferentes de nanopartículas, usando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), con el objetivo de tener nanopartículas de ácido fólico y nanopartículas de control (sin ácido fólico).

45

Para hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 70% o 100% en peso) y PLA-PEG-ácido fólico ($M_{n(RMN)}=32880 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 30% o 0% en peso, respectivamente).

Tabla 9: Sumario de los datos de caracterización de nanopartículas usadas para el ensayo citotóxico:

Muestra	Fólico (%)	Tamaño (nm)	PdI	Zeta (mV)
S1	30	118,0	0,23	-21,7
S2	0	110,6	0,16	-9,6

Metodología del ensayo de citotoxicidad:

50

En una placa de 96 pocillos, se depositaron 5×10^2 células diluidas en 50 µl de medio de cultivo (como se ha descrito anteriormente) por pocillo. Después de 24 h en una incubadora de células, se añadieron 50 µl de tampón PBS que contenía nanopartículas a diferentes concentraciones de copolímero (0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mg/ml). La placa después se dejó reposar en una incubadora de células (5% de CO₂, 37°C) durante 48 h. Después, se añadieron 20 µl de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximatofenil)-2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio) (MTS, un compuesto de tetrazolio incluido en el ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® AQueous, Promega) y la placa se analizó con un lector de microplaca (Labsystem Multiscan MS, Tipo 352) a 492 nm después de 3 horas de incubación en una incubadora de células.

60

Los datos se compararon con un pocillo que contenía solamente 5×10^2 células en 50 µl de medio de cultivo y 50 µl de tampón PBS y se reveló con 20 µl de MTS. Para todos los datos se eliminó un fondo que consistía en nanopartículas, a la concentración relevante, en 50 µl de medio de cultivo y 50 µl de tampón PBS y se reveló con 20

µl de MTS. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El diagrama se expresó como una función de un porcentaje de células vivas, siendo el 100% el pocillo que contiene solamente células y MTS.

Resultados:

El experimento realizado con ensayo de proliferación celular de una solución CellTiter 96® AQUEOUS (Promega) se ilustra en la Figura 5a.

Se observó que incluso a alta concentración, no importa la presencia o no de ácido fólico, las nanopartículas no inducen ninguna citotoxicidad sobre las células KB-3-1 que sobre-expresan receptores de folato.

Ejemplo 4b: Citotoxicidad de nanopartículas de PLA-PEG-anisamida

Para ensayar estas nanopartículas, se usó la línea celular PC-3 (adenocarcinoma humano de próstata, ATCC (Número: CRL-1435)) ya que expresa receptores sigma a los que podría unirse el resto anisamida.

Cultivo celular:

Esta línea celular adherente se cultivó en RPMI 1640 (Fisher Scientific) suplementado con penicilina al 1%/estreptomina (Lonza) y suero bovino fetal (FBS, Lonza) al 10% en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ a 37°C. Esta línea celular sobre-expresa receptores sigma. Se usaron cultivos del 85-90% de confluencia para todos los experimentos. Las células se trataron con tripsina (Tripsina-EDTA, Invitrogen, Gibco), se contaron, sub-cultivaron en placas de 96 pocillos para estudios de viabilidad. Se dejó que las células se adhirieran durante 24 h antes de usarlas para los experimentos.

Nanopartículas usadas:

Se prepararon dos suspensiones diferentes de nanopartículas, usando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), con el objetivo de tener nanopartículas de anisamida fluorescente y nanopartículas fluorescentes como control (sin anisamida).

Para hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-FP547 ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g.mol}^{-1}$; 10% en peso en ambas preparaciones), PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g.mol}^{-1}$; 45% o 90% en peso) y PLA-PEG-anisamida ($M_{n(RMN)}=37060 \text{ g.mol}^{-1}$; 45% o 0% en peso, respectivamente).

Tabla 10: Sumario de los datos de caracterización de nanopartículas usadas para el ensayo de citotoxicidad:

Muestra	Anisamida (%)	Tamaño (nm)	PdI	Zeta (mV)
S3	45	119,7	0,20	-8,9
S4	0	111,7	0,11	-9,1

Metodología del ensayo de citotoxicidad:

En una placa de 96 pocillos, se depositaron 5×10^3 células diluidas en 50 µl de medio de cultivo (como se ha descrito anteriormente) por pocillo. Después de 24 h en una incubadora de células, se añadieron 50 µl de tampón PBS que contenía nanopartículas a diferentes concentraciones de copolímero (5, 2,5, 0,5, 0,05 mg/ml).

La placa después se dejó reposar en una incubadora de células (5% de CO₂, 37°C) durante 48 h. Después, se añadieron 20 µl de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximatofenil)-2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio) (MTS, un compuesto de tetrazolio incluido en el ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® AQUEOUS, Promega) y la placa se analizó con un lector de microplaca (Labsystem Multiscan MS, Tipo 352) a 492 nm después de 3 horas de incubación en una incubadora de células.

Los datos se compararon con un pocillo que contenía solamente 5×10^3 células en 50 µl de medio de cultivo y 50 µl de tampón PBS y se reveló con 20 µl de MTS. De todos los datos se eliminó un fondo que consistía en nanopartículas, a la concentración relevante, en 50 µl de medio de cultivo y 50 µl de tampón PBS y se reveló con 20 µl de MTS. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El diagrama se expresó como una función de un porcentaje de células vivas, siendo el 100% el pocillo que contenía solamente células y MTS.

Resultados:

El experimento realizado con el ensayo de proliferación celular de una solución CellTiter 96® AQUEOUS (Promega) se ilustra en la Figura 5b.

Se observó que incluso a altas concentraciones de hasta al menos 5 mg/ml, no importa la presencia o no de anisamida, las nanopartículas fluorescentes no inducían ninguna citotoxicidad sobre las células PC-3 que expresan receptores sigma.

Ejemplo 5: Ensayo de proliferación celular de nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico

Para ensayar estas nanopartículas, se usó la línea celular KB-3-1 (carcinoma humano de cuello del útero, DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures, código de catálogo: ACC 158) ya que expresa receptores de folato.

Cultivo celular:

Son una línea celular adherente que crece en monocapas y se cultivaron para inducir una sobre-expresión de los receptores de folato. El medio usado para sobre-expresar los receptores de folato fue DMEM 2429 (medio sin ácido fólico) en que se añadieron L-glutamina (200 mM a 0,584 g/l, BioWhittaker, Lonza) y bicarbonato sódico (3,7 g/l, Sigma-Aldrich) y se suplementó con penicilina al 1%/estreptomina (Lonza) y suero bovino fetal (FBS, Lonza) al 10% en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ a 37°C.

Nanopartículas usadas:

Se prepararon tres lotes de 2 suspensiones diferentes de nanopartículas, usando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), con el objetivo de tener nanopartículas de ácido fólico fluorescente y nanopartículas fluorescentes como control (sin ácido fólico). Para hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-FP547 ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34820 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y PLA-PEG-ácido fólico ($M_{n(RMN)}=32880 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

El primer lote (S1', S2') se ha preparado 23 días antes del segundo lote (S3', S4') y 34 días antes del tercer lote (S5', S6').

Tabla 11: Sumario de los datos de caracterización de nanopartículas usadas para el ensayo de citotoxicidad:

Muestra	OMe (%)	FP547 (%)	Ácido fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
S1'	52,2	32,9	14,9	103,2	0,18	-15,9
S2'	77,0	33,0	0	103,9	0,15	-12,4
S3'	68,3	16,3	15,4	110,1	0,19	-17,3
S4'	84,1	15,9	0	108,6	0,19	-11,6
S5'	65,4	19,1	15,5	125,8	0,20	
S6'	81,0	19,0	0	117,8	0,21	

Metodología de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS):

Se permitió que la línea celular KB-3-1 cultivada en un medio para sobre-expresar sus receptores de folato (como se ha mencionado anteriormente) creciera en una placa de 24 pocillos hasta casi confluencia (~300000 células/pocillo). El medio de cultivo después se retira y se incuba 1 ml de nanopartículas diluidas en el mismo medio de cultivo, a una concentración final de copolímero de ~60 µg/ml, con las células durante una cantidad diversa de tiempo (de 10 min a 24 horas). Después de ello, el medio de cultivo se retira, cada pocillo se lava dos veces con tampón PBS (1 ml) y las células se desprenden con tripsina (200 µl durante 3 min). La tripsina después se neutraliza con medio de cultivo (800 µl) y las células se centrifugan (5 min a 1000 g). El sobrenadante se retira, las células se resuspenden en PBS (1 ml), se centrifugan (5 min a 1000 g) y finalmente se recuperan con paraformaldehído (200 µl, 1% en PBS).

El estudio de citometría de flujo se consiguió usando un analizador celular BD LSRFortessa con una longitud de onda de excitación de 561 nm y una señal de emisión recuperada entre 575 y 589 nm.

Resultados:

Los resultados obtenidos de los experimentos FACS se ilustran en la Figura 6a y 6b.

Se observó que cuando hay ácido fólico presente en la superficie de las nanopartículas (S3'), las últimas se internalizan 115 veces más que las nanopartículas sin ácido fólico (S4'). También se observó que se alcanza una meseta entre 6 y 10 horas de incubación.

También se observó que podían obtenerse los mismos resultados con lotes de 1 mes de antigüedad, 10 días de antigüedad o 1 día de antigüedad. Por lo tanto, puede concluirse que las nanopartículas de ácido fólico son estables en el tiempo y que los restos de ácido fólico permanecen en la superficie de las nanopartículas.

Ejemplo 6: Encapsulación de docetaxel (DTX) en nanopartículas de PLA-PEG-anisamida

5 Para encapsular docetaxel, se usó el mismo protocolo mencionado previamente para la preparación de nanopartículas. Se usó docetaxel tritiado durante el proceso para evaluar la carga de fármaco y la eficacia de atrapamiento.

10 A 30 mg de copolímeros (una mezcla de PLA-PEG-OMe ($Mn_{(RMN)}=34820 \text{ g.mol}^{-1}$; 60% en peso) y PLA-PEG-anisamida ($Mn_{(RMN)}=37060 \text{ g.mol}^{-1}$; 40% en peso)) diluida en 1,2 ml de acetato de etilo se añadieron 2,8 mg de DTX ($3,24 \mu\text{mol}$; $861,9 \text{ g.mol}^{-1}$) y 4 nmol de $^3\text{H-DTX}$ ($5,38 \times 10^5 \text{ Bq}$). Esta fase orgánica se mezcló con 3,3 ml de una solución acuosa de pluronic F68 (1% p/v). Las dos fases se agitaron vigorosamente con un vórtice durante 1 min y después se sonicaron con una sonda durante 3 min. Después de ello, se retiró la fase orgánica a presión reducida y la fase acuosa producida se filtró a través de un filtro de vidrio de $1 \mu\text{m}$ antes de la ultra-centrifugación (30 min a 30000 g). El sobrenadante se retiró y las nanopartículas se resuspendieron en tampón PBS (10 ml) y se filtraron a través de un filtro de vidrio de $1 \mu\text{m}$.

Resultados:

20 El sobrenadante y la solución de NP se contaron con un contador beta Beckman que posibilita calcular una carga del fármaco del 4,3% y una eficacia de atrapamiento del 46%.

Ejemplo 7: Procedimiento típico para la reacción de Huisgen en condiciones acuosas para realizar química clic sobre las nanopartículas de PLA-PEG-N₃ preformadas

25 Tabla 12

Ingredientes	$Mn_{(RMN)}$ (Da)	Masa (mg)	Cantidad (μmol)	Equiv.	Volumen (ml)
PLA-PEG-OMe	42800	57,8	1,35	4,0	
PLA-PEG-N ₃	35400	12,0	0,34	1,0	
PEG-alquino	2100	1,5	0,70	2,1	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	250	2,2	8,89	26,3	
Ascorbato de Na	198	3,6	18,02	53,3	
PVA	9500	10,0	1,05	3,1	
H ₂ O	18			0,0	7,8

Procedimiento experimental:

30 A una suspensión de nanopartículas (hecha de PLA-PEG-N₃ (20% p/p) y PLA-PEG-OMe (80% p/p)) preparada siguiendo el protocolo descrito previamente y estabilizada con poli(alcohol vinílico) (PVA) (1% p/v) se añadió PEG-alquino (2 equiv. comparado con el grupo azido), CuSO₄·5H₂O y ascorbato sódico (en exceso).

La mezcla de reacción se agitó durante 24 h.

35 Finalmente, la suspensión se dializó frente a agua usando una membrana de celulosa con un punto de corte de 20000 Da (Spectrumlabs).

Observación:

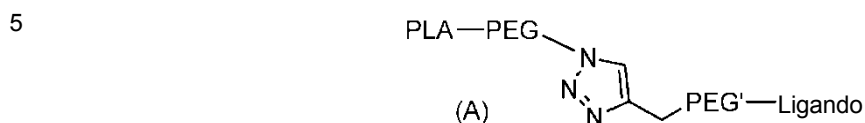
40 El tamaño de la suspensión de NP permanece estable durante el proceso clic:
Z-promedio= 198,5 nm y el Pdl=0,09

De un modo similar, pueden unirse otros ligandos (por ejemplo, ligandos fluorescentes...) a la nanopartícula de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

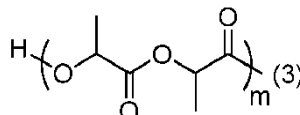
45

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (A)

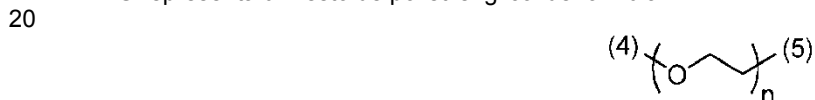


10 en la que:
PLA representa un resto de poliácido láctico de fórmula:

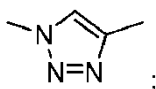


15 en la que:
(3) es la unión del enlace al resto de PEG; y
m es el número de unidades y está comprendido entre 1 y 500;

PEG representa un resto de polietilenglicol de fórmula:



25 en la que:
(4) es la unión del enlace a -PLA;
(5) es la unión del enlace al átomo de nitrógeno de



30 y
n es el número de unidades y está comprendido entre 1 y 300;

El enlazador PEG' es un resto de polietilenglicol de fórmula:



en la que:
n' es el número de unidades y está comprendido entre 1 a 10
(1) es la unión del enlace al grupo -(CH₂)-triazol;
(2) es la unión del enlace al ligando;

40 Ligando es un resto de ligando funciona elegido entre dispositivos localizadores, agentes de diagnóstico, agentes de imágenes, agentes sensibles a estímulos, agentes de conexión, agentes de penetración celular, agentes detoxificantes y fármacos.

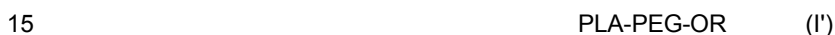
45 2. El compuesto de fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo localizador es un ligando de reconocimiento de membrana.

3. El compuesto de fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el ligando se elige de:
50 ligandos de reconocimiento de membrana seleccionados de un antagonista del receptor de estrógenos, un antagonista del receptor andrógenos, ácido fólico, anisamida, un anticuerpo capaz de reconocer el correspondiente antígeno de superficie, una secuencia RGD que se une a integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas en endotelio angiogénico tumoral, ácido hialurónico, transferrina, vectores génicos dirigidos a péptidos, aptámeros, o factor de necrosis tumoral,
agentes de diagnóstico/imágenes seleccionados de óxido de hierro, complejos de gadolinio, verde de indocianina,
55 sondas fluorescentes del infrarrojo cercano, o emisores de positrones,
sustancias sensibles a estímulos seleccionadas de nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de oro, o cualquier sustancia activable por radiación,

agentes de conexión seleccionados de oligopéptidos,
 un agente de penetración celular seleccionado de secuencias transactivadoras de la transcripción (TAT),
 penetratina, secuencias de poliarginina, o secuencias proteicas VP22,
 un agente destoxicante seleccionado de cobalamina, cobinamida, enzima rodanasa, una enzima hidrolizante de
 organofósforo, naloxona, atropina, o anticuerpos/fragmentos de anticuerpo que reconoce una toxina específica; o
 un fármaco seleccionado de un antibiótico, agente antineoplásico, agente antivírico, agente anti-inflamatorio, un
 antígeno de vacuna o un nutracéutico.

4. Una nanopartícula que tiene un diámetro medio entre 10 nm y 900 nm, que comprende uno o más compuestos de
 fórmula (A) idénticos o diferentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente uno o más compuestos de
 fórmula (I):



en la que PLA y PEG se definen como en la fórmula (A) y R es H o un alquilo C₁-C₆.

6. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende un fármaco.

7. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el fármaco es un agente citotóxico.

8. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que el fármaco es un taxoide.

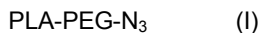
9. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6, 7 u 8, en la que el fármaco es docetaxel.

10. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que el fármaco está
 encapsulado de forma no covalente con la nanopartícula.

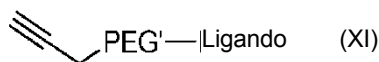
11. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que el fármaco está
 conjugado covalentemente con la nanopartícula.

12. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (A) de acuerdo con una cualquiera de las
 reivindicaciones 1 a 3 que comprende acoplar:

35 - un compuesto de fórmula (I):



con
 40 - un compuesto de fórmula (XI):



45 en la que PLA, PEG, PEG' y Ligando se definen como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho acoplamiento se hace por química clic.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que dicha reacción de acoplamiento se realiza de
 acuerdo con la reacción de Huisgen, en condiciones orgánicas o acuosas.

15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12, 13 o 14, en el que dicha reacción de
 acoplamiento de química clic se realiza en presencia de CuBr y PMDETA (N,N,N',N',N''-pentametildietilentiamina).

16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12, 13 o 14, en el que dicha reacción de
 acoplamiento de química clic se realiza en presencia de agua, CuSO₄·5H₂O y ascorbato sódico.

17. Un compuesto de fórmula (I):



en la que PLA y PEG se definen de acuerdo con la reivindicación 1.

18. Una nanopartícula que tiene un diámetro medio entre 10 nm y 900 nm, que comprende uno o más compuestos
 de fórmula (I) idénticos o diferentes de acuerdo con la reivindicación 17.

19. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende adicionalmente uno o más compuestos de fórmula (I):

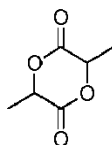


en la que PLA y PEG se definen como en la reivindicación 1 y R es H o un alquilo C₁-C₆.

20. Un proceso para preparación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende la etapa de reacción de un compuesto de fórmula (II):



en la que PEG se define como en la reivindicación 1 y X es un átomo de halógeno o una azida (N₃), con el compuesto de fórmula:



por polimerización con apertura de anillo (ROP), seguida, cuando X es un átomo de halógeno, de reacción del compuesto de fórmula (III) obtenido:



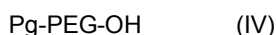
en la que PLA y PEG se definen como en la fórmula (A), y Hal representa un átomo de halógeno, con NaN₃.

21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha reacción se realiza en presencia de Sn(Oct)₂.

22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, que comprende adicionalmente la preparación del compuesto de fórmula (II):



a partir de un compuesto de fórmula (IV):



en la que Pg representa un grupo protector de hidroxilo, X es un átomo de halógeno o una azida (N₃) y PEG se define como en la reivindicación 1

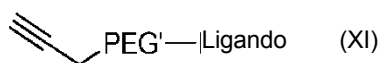
por

- una reacción de sustitución de OH con X, seguida de
- una reacción de desprotección.

23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que, cuando X es un grupo azida, la reacción de sustitución comprende:

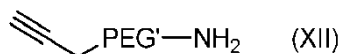
- 1) sustitución del grupo OH del compuesto de fórmula (IV) con un grupo saliente,
- 2) sustitución del grupo saliente del compuesto obtenido en la etapa 1) con un grupo azida (N₃).

24. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende adicionalmente el proceso para la preparación del compuesto de fórmula (XI):



que comprende hacer reaccionar

- un compuesto de fórmula (XII);

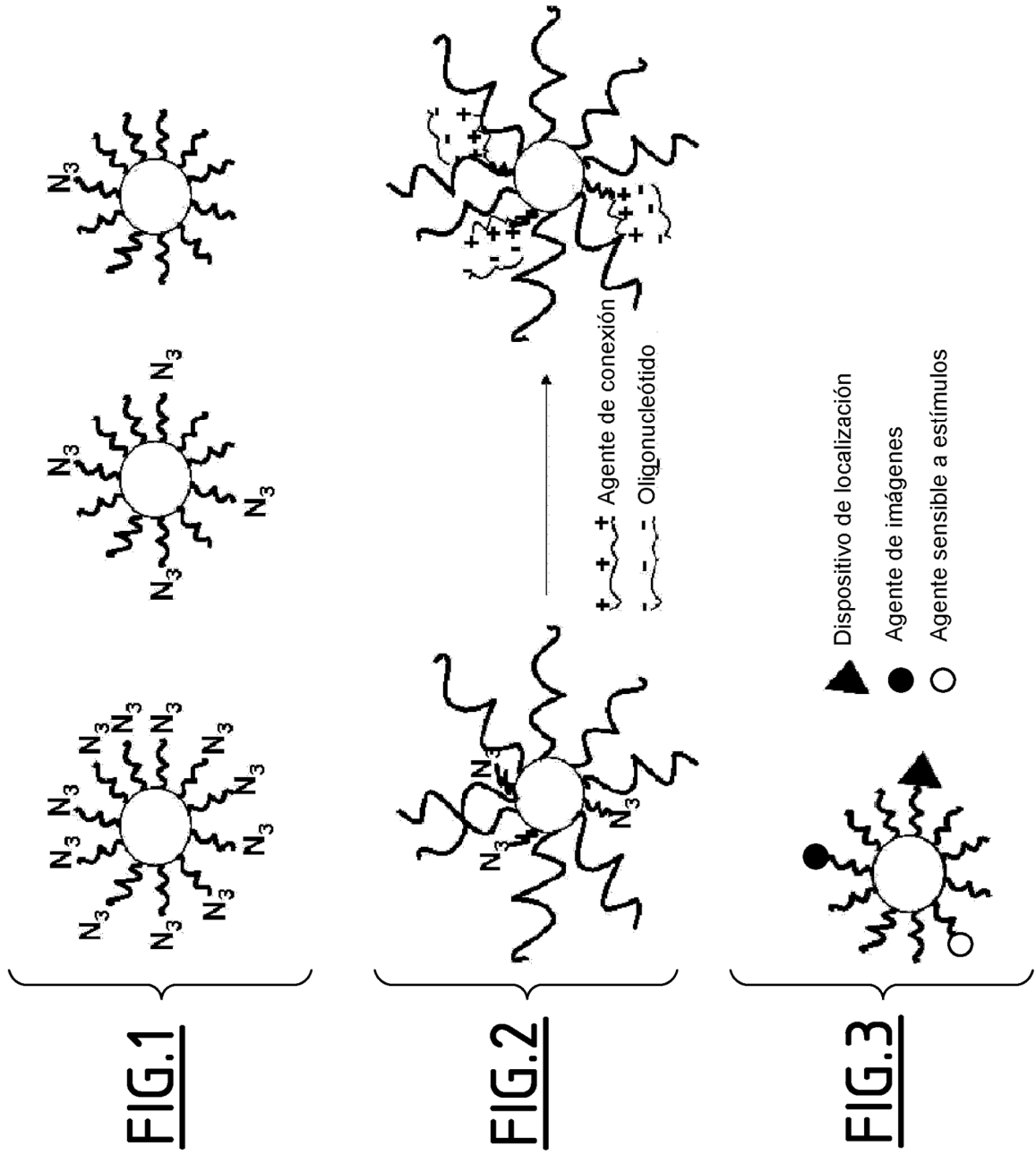


con

- un precursor de ligando

en la que PEG' se define como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

25. El proceso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicho acoplamiento se realiza en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico, en presencia de una base.
- 5 26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho reactivo de acoplamiento peptídico se elige entre PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) y la base es N,N-diisopropiletildiamina (DIPEA).
- 10 27. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho reactivo de acoplamiento peptídico es EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida) y la base es trietilamina.
- 15 28. Un proceso para la preparación de la nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, que comprende hacer reaccionar una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 18 o 19 con uno o más compuestos de fórmula (XI) de acuerdo con la reivindicación 24, opcionalmente seguida de encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.
- 20 29. Un proceso para la preparación de la nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, que comprende nanoprecipitar uno o más compuestos de fórmula (A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, opcionalmente en presencia de un compuesto de fórmula (I') como se define en la reivindicación 9, opcionalmente seguida de encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.
- 25 30. Un proceso para la preparación de la nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, que comprende nanoprecipitar uno o más compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 17, opcionalmente en presencia de un compuesto de fórmula (I') como se define en la reivindicación 6.
- 30 31. Un medicamento, que comprende al menos un compuesto de fórmula (A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, opcionalmente en forma de una nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.
- 30 32. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, opcionalmente en forma de una nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.



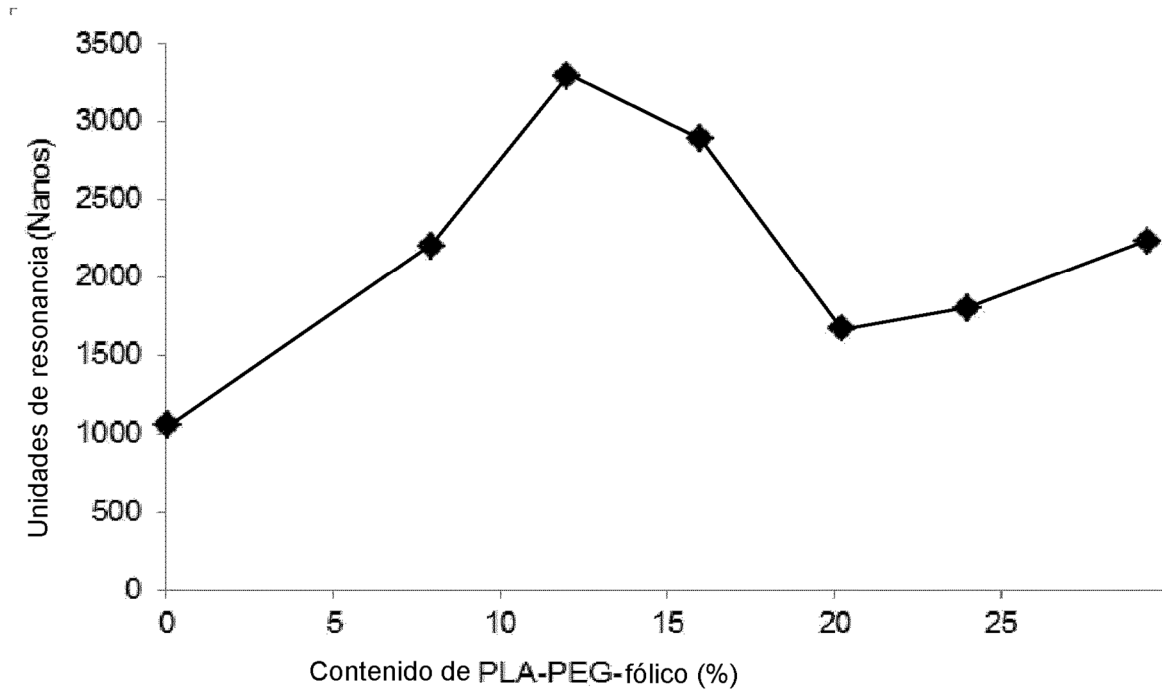
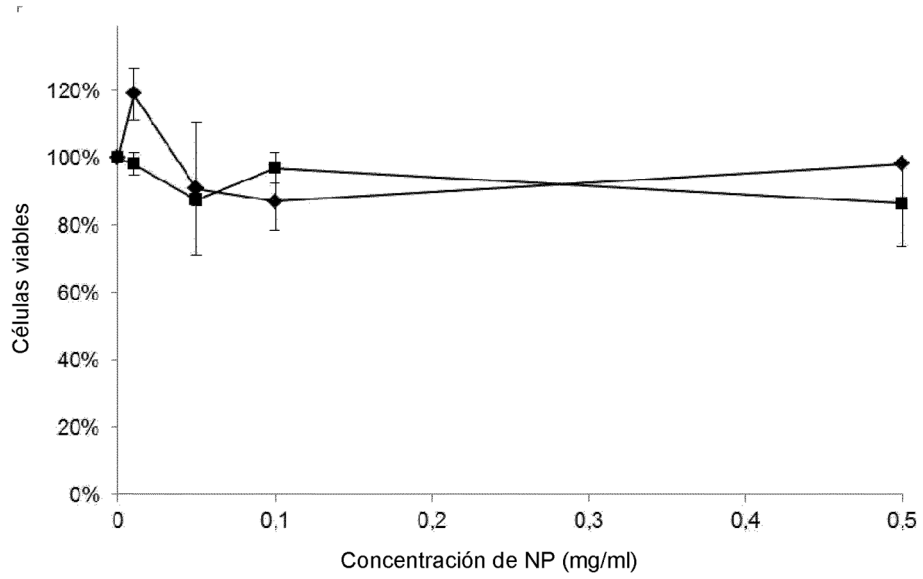


FIG.4

a.



b.

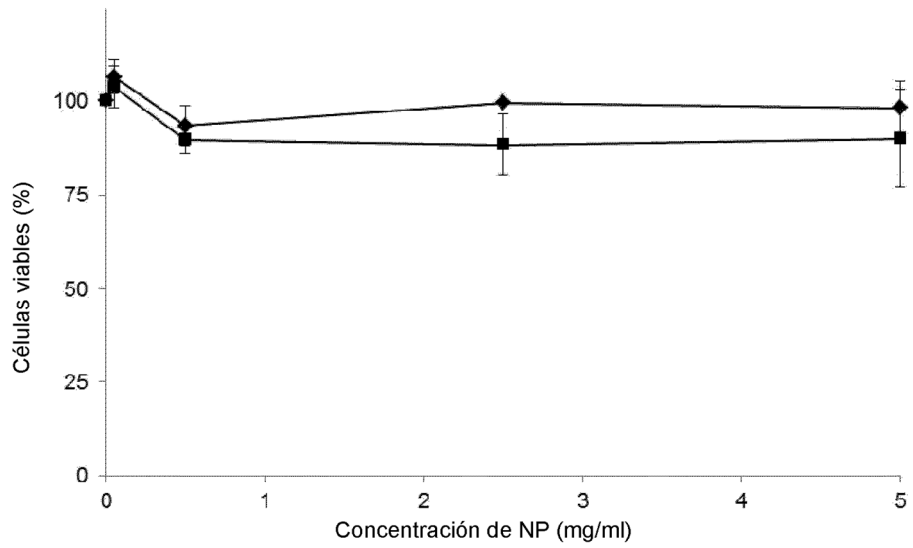
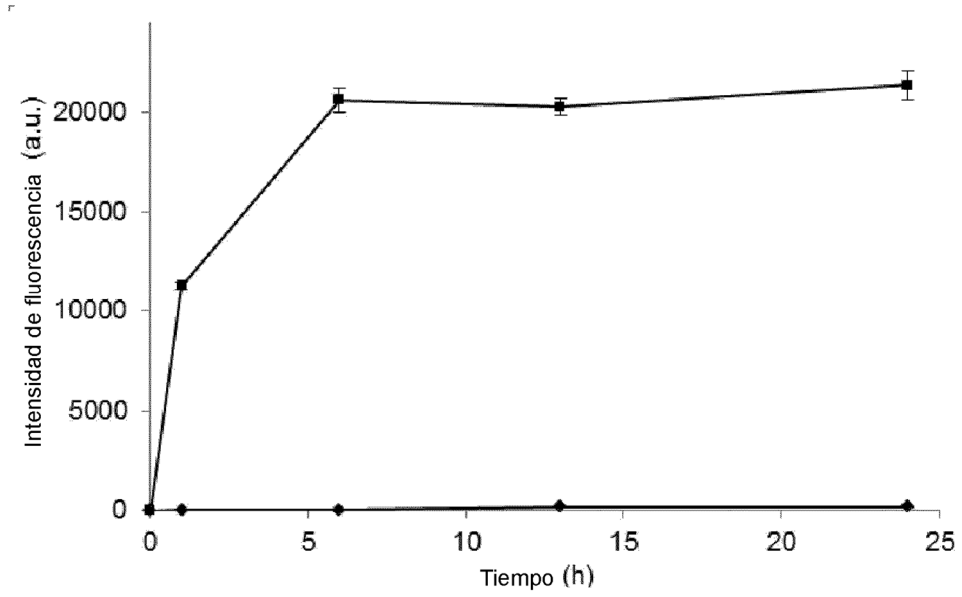


FIG.5

a.



b.

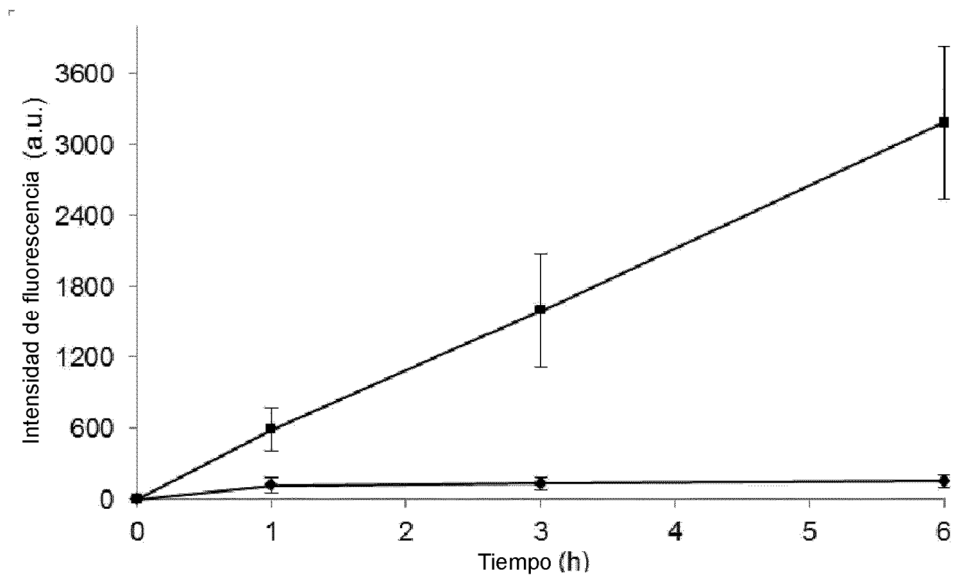


FIG.6