

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 437**

51 Int. Cl.:

**C08F 293/00** (2006.01)

**A61K 31/79** (2006.01)

**A61K 47/62** (2007.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2011 PCT/US2011/001418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12039741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2011 E 11827074 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2619238**

54 Título: **Copolímero en bloque novedoso y composiciones micelares y procedimientos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**01.04.2011 US 201161471054 P**

**22.09.2010 US 385422 P**

**31.03.2011 US 201161470441 P**

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

**25.07.2017**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 West 7th Street  
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**GAO, JINMING;  
BOOTHMAN, DAVID;  
ZHOU, KEJIN;  
HUANG, XIAONAN y  
WANG, YIGUANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 626 437 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

Copolímero en bloque novedoso y composiciones micelares y procedimientos de uso de las mismas

**Antecedentes de la invención**

5 Las nanopartículas multifuncionales han recibido atención en una amplia gama de aplicaciones tales como biosensores, nanosondas de diagnóstico y sistemas de administración de fármacos dirigidos. Estos esfuerzos han sido impulsados en gran medida por la necesidad de mejorar la especificidad biológica con efectos secundarios reducidos en el diagnóstico y la terapia a través del control espaciotemporal preciso de la administración del agente en diversos sistemas fisiológicos. Para lograr este objetivo, se han dedicado esfuerzos a desarrollar nanoplataformas sensibles a los estímulos. Los estímulos ambientales que se han aprovechado para identificar la eficiencia de administración incluyen el pH, la temperatura, la expresión enzimática, la reacción redox e la inducción de la luz. Entre estas señales de activación, el activador del pH es uno de los estímulos más ampliamente estudiados, en base a dos tipos de diferencias de pH: (a) patológicas (por ejemplo, tumor) frente a tejidos normales y (b) compartimentos intracelulares ácidos.

15 Por ejemplo, debido a la acidez inusual del microentorno extracelular del tumor ( $\text{pH}_e \approx 6,5$ ), se ha informado que varios nanosistemas sensibles al  $\text{pH}_e$  aumentan la sensibilidad de la formación de imágenes de tumores o la eficacia de la terapia. Sin embargo, para las composiciones micelares poliméricas que liberan fármaco por hidrólisis en entornos ácidos, puede llevar días la liberación del fármaco. En ese periodo de tiempo, el cuerpo puede excretar o descomponer las micelas.

20 Para dirigir los compartimentos endo-/lisosómicos ácidos, se han estudiado nanovectores con enlazadores escindibles por pH para mejorar la biodisponibilidad de la carga útil. Además, se han diseñado varios nanovectores inteligentes con conversión de carga inducida por el pH para aumentar la eficacia del fármaco. A pesar de estos avances, no se comprende bien el transporte y activación específicos de las nanopartículas ni sus interacciones con diferentes organelos endocíticos durante la endocitosis en células vivas. El sistema endocítico está compuesto por una serie de compartimentos que tienen diferentes funciones en la clasificación, procesamiento y degradación de la carga internalizada. El direccionamiento selectivo de diferentes compartimentos endocíticos por nanopartículas sensibles al pH es particularmente difícil debido a los cortos tiempos de residencia de las nanopartículas (<minutos) y las pequeñas diferencias de pH en estos compartimentos (por ejemplo <1 unidad de pH entre los endosomas tempranos y los lisosomas).

30 La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, desempeña un papel esencial en procesos fisiológicos normales tales como el desarrollo y la reparación de heridas. La angiogénesis patológica se produce en tumores, así como en una gama de enfermedades no neoplásicas (por ejemplo, retinopatía diabética, endometriosis). En el cáncer, la formación de nuevos vasos sanguíneos de una red vascular existente es necesaria para el crecimiento sostenido del tumor y el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos. En el modelo de microentorno tumoral de la carcinogénesis, la angiogénesis representa la última etapa crítica para superar la barrera de la isquemia. La adquisición del fenotipo angiogénico da como resultado una rápida expansión del tumor, así como la agilitación de la invasión local y la metástasis del cáncer.

35 La angiogénesis tumoral es un proceso biológico complejo orquestado por una serie de factores angiogénicos. Inicialmente, las células tumorales estresadas (por ejemplo, bajo hipoxia) secretan factores de crecimiento y quimioquinas (por ejemplo, VEGF-A) que estimulan el endotelio vascular quiescente de vasos huésped adyacentes para brotar nuevos capilares. Estos factores de crecimiento activan o regulan positivamente la expresión de integrinas (por ejemplo,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ) en los vasos sanguíneos, que promueven la migración de células endoteliales y la supervivencia en la creación de nuevos brotes de vasos. La comprensión mecánica de la angiogénesis tumoral ha propulsado el rápido desarrollo de una diversidad de agentes antiangiogénicos. Bevacizumab (Avastin®, Genentech) es un anticuerpo anti-VEGF humanizado que inhibe la unión a VEGF y la señalización a través de los receptores de VEGFR1 y VEGFR2 que se sobreexpresan en las células endoteliales angiogénicas. Está clínicamente aprobado junto con quimioterapia citotóxica para el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de mama. Sunitinib (Sutent®, Pfizer) y sorafenib (Nexavar®, Bayer Pharm. Corp.) son inhibidores de moléculas pequeñas de múltiples receptores tirosina cinasas que incluyen los receptores de VEGF. Han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de carcinomas de células renales, tumores estromales del GI (sunitinib) y cáncer de hígado no resecable (sorafenib). Una diversidad de otros fármacos dirigidos se encuentra actualmente en la última fase de ensayo clínico (por ejemplo, Vitaxin y Cilengitide, que se dirigen a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , están en la fase II/III de ensayos clínicos para el tratamiento del melanoma metastásico y el cáncer de próstata).

55 La formación de imágenes de angiogénesis es muy prometedora para la detección precoz del cáncer, así como para la evaluación postterapia de muchas nuevas terapias antiangiogénicas dirigidas a moléculas. En la formación de imágenes de angiogénesis se emplean actualmente dos estrategias principales, la imagen funcional y la imagen selectiva. La estrategia de imagen funcional mide el flujo sanguíneo, el volumen sanguíneo tumoral y la permeabilidad vascular de los tumores sólidos. Estas técnicas de imagen incluyen ultrasonido Doppler, CT de contraste dinámico mejorada o MRI. Las principales ventajas son que pueden adaptarse fácilmente y se han implementado ya clínicamente para controlar la eficacia de los fármacos antiangiogénicos. El principal inconveniente

es que estos procedimientos no son muy específicos hacia la angiogénesis tumoral. Recientemente, la estrategia de imagen dirigida se encuentra bajo extensa investigación con la ventaja potencial de una caracterización más precisa del estado del endotelio en un tumor. Entre las dianas de angiogénesis clave se encuentran VEGF y sus receptores, integrinas (por ejemplo,  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ ), y metaloproteasas de matriz. Diversas modalidades de obtención de imagen, tales como PET, MRI, imagen óptica, ultrasonidos, se están investigando con diferentes grados de éxito.

Para las aplicaciones de imagen molecular del cáncer, lograr una alta sensibilidad y especificidad al contraste sigue siendo un gran reto. En la actualidad, la mayoría de las sondas de imágenes convencionales utilizan un diseño siempre activo de sondas de contraste y la sensibilidad al contraste surge de la diferencia en la acumulación tisular de las cargas útiles de imagen. Las bajas concentraciones tisulares de los biomarcadores previstos, la falta de una estrategia de amplificación para aumentar el rendimiento de la señal, y las altas señales de fondo son varios de los principales factores limitantes. Para las radiosondas moleculares pequeños (por ejemplo, cRGD marcado con  $^{64}\text{Cu}$ ), aunque la sensibilidad de detección sea muy alta (por ejemplo,  $<10^{-12}$  M), la sensibilidad al contraste está limitada por su relativamente baja afinidad de unión a los receptores diana y la acumulación insuficiente de cargas útiles de imagen en los tejidos diana. Los anticuerpos monoclonales (mAb) han demostrado una excelente afinidad y especificidad a una diversidad de marcadores superficiales de células cancerosas. Sin embargo, los mAb radiomarcados o marcados por fluorescencia son limitados en aplicaciones de imagen molecular debido a sus tiempos de liberación lentos y señales de fondo persistentes altas en la sangre. En muchos agentes de contraste convencionales, la sensibilidad al contraste está intrínsecamente limitada por las concentraciones tisulares relativamente bajas de los biomarcadores de cáncer por un lado, y por el otro, las altas señales de fondo no específicas de las nanosondas siempre activas.

El documento WO03/074023 describe una composición acuosa que comprende un copolímero en bloque anfílico, que tiene un bloque hidrófilo que comprende grupos zwitteriónicos colgantes y un bloque hidrófobo, y un compuesto biológicamente activo asociado con el polímero. El polímero está preferiblemente en forma de micelas, y preferiblemente el activo biológico es un fármaco hidrófobo, que tiene, por ejemplo, un logP calculado o determinado experimentalmente de al menos 1,0, donde P es el coeficiente de reparto de octanol:agua.

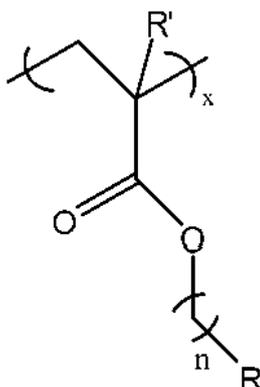
El documento WO2009/138473 describe una composición que comprende vesículas y, encapsulado dentro de las vesículas, un anticuerpo, en la que las vesículas comprenden un copolímero en bloque anfílico que tiene un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo. También se describen procedimientos para administrar las composiciones anteriores a las células.

El documento WO02/100439 describe autoensamblajes supramoleculares solubles en agua y un procedimiento para su preparación a través de la micelización de polielectrolitos mediante el uso de unidades monoméricas hidrófobas donde el segmento de polielectrolito forma el núcleo del conjunto supramolecular, mientras que la envoltura consiste en polímeros hidrófobos no cargados u oligómeros.

Lo que se necesita son composiciones de micelas sensibles al pH mejoradas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, en particular composiciones que tengan uno o más de: aumento de imágenes y/o cargas útiles de fármacos, tiempos prolongados de circulación en sangre, alta sensibilidad y especificidad al contraste, entrega rápida del fármaco en el sitio diana, y capacidad de respuesta dentro de estrechos intervalos de pH específicos (por ejemplo, para el direccionamiento de tumores u organelos específicos).

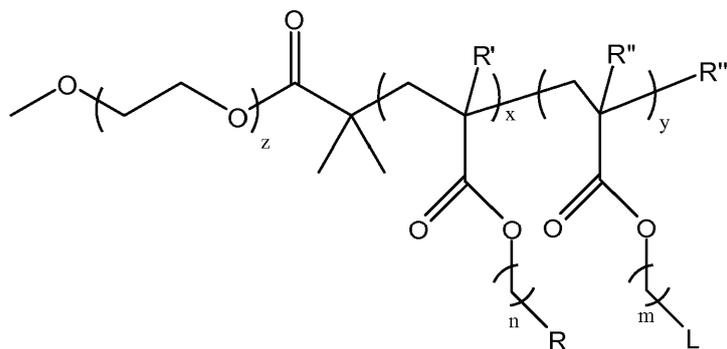
### Sumario de la invención

La invención, según se define en las reivindicaciones, es un copolímero en bloque que comprende un segmento polimérico hidrófilo y un segmento polimérico hidrófobo, en el que el segmento polimérico hidrófilo comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en: poli(óxido de etileno) (PEO), poli(metacrilato fosfatidil colina) (MPC) y polivinilpirrolidona (PVP), en el que el polímero en el segmento polimérico hidrófilo tiene de 100 a 130 unidades monoméricas, en el que el segmento polimérico hidrófobo comprende



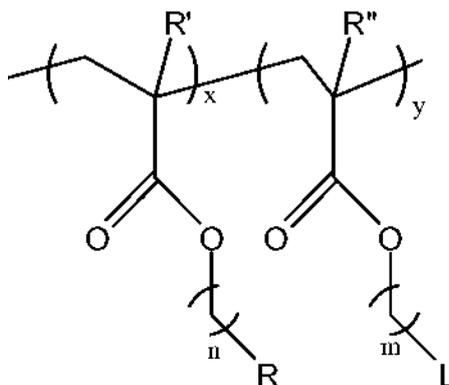
en la que  $R'$  es  $-\text{H}$  o  $-\text{CH}_3$ , en la que  $R$  es  $-\text{NR}^1\text{R}^2$ , en la que  $R^1$  y  $R^2$  son grupos alquilo, en la que  $R^1$  y  $R^2$  son iguales

o diferentes, en la que  $R^1$  y  $R^2$  juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos, o donde  $R^1$  y  $R^2$  pueden unirse opcionalmente para formar un anillo que tiene de 5 a 16 carbonos, en la que  $n$  es de 1 a 10, en la que  $x$  es de 20 a 200 en total, y en la que el copolímero en bloque comprende opcionalmente un resto marcador. En algunas realizaciones, el segmento polimérico hidrófilo comprende PEO. En algunas realizaciones,  $n$  es de 1 a 4. En algunas realizaciones,  $n$  es 2. En algunas realizaciones,  $R'$  es  $-CH_3$ . En algunas realizaciones,  $R'$  es  $-H$ . En algunas realizaciones,  $x$  es de 40 a 100 en total. En algunas realizaciones,  $x$  es de 50 a 100 en total. En algunas realizaciones,  $x$  es de 40 a 70 en total. En algunas realizaciones,  $x$  es de 60 a 80 en total. En algunas realizaciones,  $x$  es 70 en total. En algunas realizaciones, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es alquilo lineal o ramificado. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  se unen para formar un anillo. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  son iguales. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  son diferentes. En algunas realizaciones, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  tiene de 3 a 8 carbonos. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  juntos forman un anillo que tiene de 5 a 10 carbonos. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  son propilo. En algunas realizaciones, propilo es iso-propilo. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  son butilo. En algunas realizaciones, butilo es  $n$ -butilo. En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  juntos son  $-(CH_2)_5-$ . En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  juntos son  $-(CH_2)_6-$ . En algunas realizaciones, el copolímero en bloque comprende un compuesto de Fórmula I:

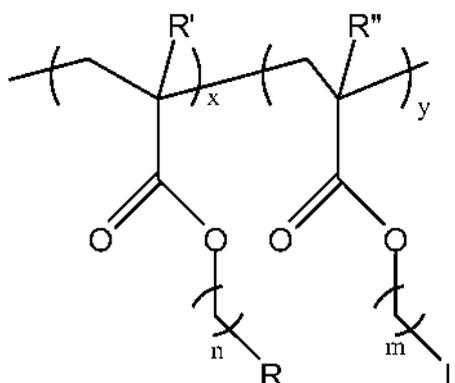


(Fórmula I)

en la que  $L$  es un resto marcador, en la que  $y$  es de 0 a 6, en la que  $R''$  es  $-H$  o  $-CH_3$ ; en la que  $m$  es de 1 a 10; en la que  $z$  es tal que el PEO tiene de 2 kD a 20 kD de tamaño, en la que  $R'''$  es cualquier resto adecuado, y en la que la siguiente porción de la estructura:



20 puede disponerse en cualquier orden. En algunas realizaciones,  $R''$  es  $-CH_3$ . En algunas realizaciones,  $R''$  es  $-H$ . En algunas realizaciones,  $m$  es de 1 a 4. En algunas realizaciones,  $m$  es 2. En algunas realizaciones, el PEO tiene de 2 kD a 10 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el PEO tiene de 4 kD a 6 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el PEO tiene 5 kD de tamaño. En algunas realizaciones,  $z$  es 114. En algunas realizaciones,  $y$  es 0. En algunas realizaciones,  $y$  es de 1 a 6. En algunas realizaciones,  $y$  es 3. En algunas realizaciones,  $L$  es un marcador fluorescente. En algunas realizaciones, el marcador fluorescente es tetrametil rodamina (TMR). En algunas realizaciones,  $L$  es un marcador de infrarrojo cercano (NIR). En algunas realizaciones, el marcador NIR es cipato. En algunas realizaciones, el marcador NIR es un análogo de cipato. En algunas realizaciones,  $R'''$  es un grupo terminal resultante de una reacción de polimerización. En algunas realizaciones,  $R'$  es Br. En algunas realizaciones,  $R'''$  es tiolato. En algunas realizaciones,  $R'''$  es un tioéster. En algunas realizaciones, la siguiente porción de la estructura:



está aleatorizada. En algunas realizaciones, el copolímero en bloque forma una micela sensible al pH.

En otro aspecto de la invención, es una composición que comprende una micela sensible al pH, en la que la micela sensible al pH comprende un copolímero en bloque como se describe en el presente documento. Debe apreciarse que cualquiera de los copolímeros en bloque descritos en el presente documento pueden utilizarse en la fabricación de una micela sensible al pH. En algunas realizaciones, la micela tiene un tamaño de 10 a 200 nm. En algunas realizaciones, la micela tiene un tamaño de 20 a 100 nm. En algunas realizaciones, la micela tiene un tamaño de 30 a 50 nm. En algunas realizaciones, la micela tiene un intervalo de transición de pH de menos de 1 unidades de pH. En algunas realizaciones, la micela tiene un intervalo de transición de pH de menos de 0,5 unidades de pH. En algunas realizaciones, la micela tiene un intervalo de transición de pH de menos de 0,25 unidades de pH. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 5 a 8. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 5 a 6. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 6 a 7. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 7 a 8. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 6,3 a 6,9. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 6,2. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,2. En algunas realizaciones, la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5. En algunas realizaciones, la micela comprende además un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a un VEGFR2. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es un fragmento Fab' de mAb RAFL-1. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a una integrina  $\alpha_v\beta_3$ . En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es cRGDfK. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a un biomarcador de la angiogénesis. En algunas realizaciones, el biomarcador de la angiogénesis es un complejo VEGF-VEGFR o endoglina. En algunas realizaciones, la composición comprende además un fármaco encapsulado en la micela. En algunas realizaciones, el fármaco es hidrófobo. En algunas realizaciones, el fármaco tiene un log p de 2 a 8. En algunas realizaciones, el fármaco es un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el fármaco es doxorubicina. En algunas realizaciones, el fármaco es beta-lapachona. En algunas realizaciones, el fármaco es paclitaxel.

En otro aspecto de la invención, es una composición para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer en un individuo que necesita la misma, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de micela sensible al pH que comprende un agente quimioterapéutico como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido. En algunas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido.

En otro aspecto de la invención es una composición para su uso en un procedimiento para formar imágenes de un tumor en un individuo, que comprende a) administrar una composición de micela sensible al pH como se describe en el presente documento al individuo, en el que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada. En algunas realizaciones, el procedimiento se usa para diagnosticar un tumor en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento se usa para controlar un tumor en el individuo.

En otro aspecto de la invención es una composición para su uso en un procedimiento para la administración de un fármaco a endosomas tempranos, que comprende la administración de una composición de micela sensible al pH que comprende un fármaco como se describe en el presente documento, a un individuo que lo necesita, en el que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5.

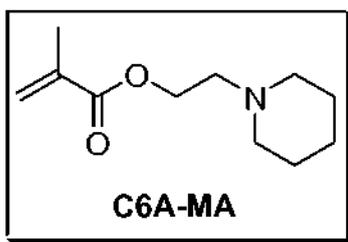
En otro aspecto de la invención es una composición para su uso en un procedimiento para la administración de un fármaco a endosomas tardíos o lisosomas, que comprende la administración de una composición de micela sensible al pH que comprende un fármaco como se describe en el presente documento, a un individuo que lo necesita, en el que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5. En algunas realizaciones, el fármaco es un fármaco de enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En otro aspecto de la invención es una composición para su uso en un procedimiento para formar imágenes de la

actividad endosómica temprana en un individuo, que comprende a) la administración de una composición de micela sensible al pH como se describe en el presente documento, al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada.

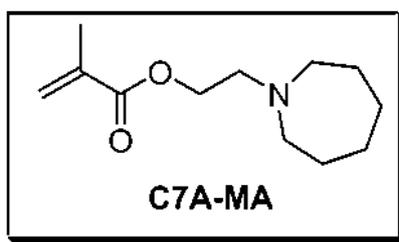
- 5 En otro aspecto de la invención es una composición para su uso en un procedimiento para formar imágenes de la actividad endosómica tardía o lisosómica en un individuo, que comprende a) la administración de una composición de micela sensible al pH como se describe en el presente documento, al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada. Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones.
- 10

Se describe en el presente documento un compuesto de la fórmula:



En otro aspecto de la invención es un polímero del compuesto C6A-MA.

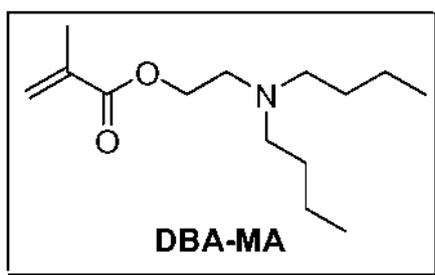
También se describe en el presente documento un compuesto de la fórmula:



15

En otro aspecto de la invención, es un polímero del compuesto C7A-MA.

También se describe en el presente documento un compuesto de la fórmula:



En otro aspecto de la invención, es un polímero del compuesto DBA-MA.

20 **Breve descripción de las figuras**

Las figuras 1A y 1B ilustran ejemplos de copolímeros en bloque de la invención.

La figura 1C ilustra el principio de diseño de un ejemplo de una micela que comprende un marcador fluorescente (usando TMR como ejemplo). A pH alto, el conjunto micelar da como resultado la inactivación de la fluorescencia debido a mecanismos homoFRET y de transferencia de electrones fotoinducida (PET). A pH bajo, el desmontaje micelar conduce a un aumento drástico de la emisión. A pH alto, la amina en el segmento polimérico hidrófobo no está protonada. A pH bajo, el grupo amina en el segmento polimérico hidrófobo no está protonado.

25

La figura 2A ilustra un ejemplo de síntesis de copolímeros de PEO-*b*-PR mediante el procedimiento de polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP).

La figura 2B ilustra un ejemplo de síntesis de nanosondas de PEO-*b*-(PR-*r*-TMR).

La figura 3A muestra la intensidad de fluorescencia normalizada de las nanosondas de pHAM **3**, **4**, **6**, **7** en función del pH. La respuesta al pH ( $\Delta\text{pH}_{10-90\%}$ ) fue  $<0,25$  unidades de pH y  $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$  fue de hasta 55 veces.

La figura 3B muestra la medición de la fluorescencia de flujo detenido de la nanosonda **4** ( $\text{pH}_t = 5,4$ ) después de la activación del pH a 4,9. El tiempo de recuperación de fluorescencia ( $\tau_{1/2}$ ) fue de 3,7 ms.

5 La figura 4A muestra las curvas de titulación de pH de dos copolímeros en bloque de PEO-*b*-PR representativos, **5** y **7**, y sus monómeros correspondientes.

La figura 4B muestra los espectros de RMN  $^1\text{H}$  deuterados de dos copolímeros en bloque de PEO-*b*-PR representativos, **5** y **7**, en diferentes estados de ionización de las aminas terciarias.

10 La figura 4C muestra la microscopía electrónica de transmisión (TEM) del copolímero en bloque de PEO-*b*-PR **7** en solución acuosa, lo que demuestra la formación de micelas por encima de su  $\text{pK}_a$  (6,7) a pH 7,4 y la disociación micelar completa a pH 5,5. El diámetro promedio de las micelas fue de 45 nm.

15 Las figuras 5A y 5B muestran la cuantificación de la activación de nanopartículas de pHAM en células H2009 y el medio de cultivo tras la acidificación. La figura 5A muestra las relaciones señal/ruido (SNR) de 3 dentro de las células H2009 y el medio a lo largo del tiempo. La figura 5B muestra una comparación de SNR entre células H2009 y el medio antes y después de la adición de HCl. Se observó un gran contraste ( $\text{SNR}_{\text{Célula}}/\text{SNR}_{\text{Med}} = 31$  a 60 min) antes de la adición de HCl y la tendencia se invirtió ( $\text{SNR}_{\text{Célula}}/\text{SNR}_{\text{Med}} = 0,74$ ) después de HCl. Los valores de  $p$  se calcularon usando la prueba  $t$  de Student.

20 La figura 6A muestra un examen de las localizaciones subcelulares (endosomas tempranos (Rab5a) y endosomas tardíos/lisosomas (Lamp1)) para la activación pHAM de la nanosonda **3** con el tiempo usando imágenes confocales.

La figura 6B muestra un examen de las localizaciones subcelulares (endosomas tempranos (Rab5a) y endosomas tardíos/lisosomas (Lamp1)) para la activación pHAM de la nanosonda **4** con el tiempo usando imágenes confocales.

25 La figura 6C y la figura 6D representan los diferentes procesos de captación intracelular y la activación de las dos nanosondas.

La figura 7 muestra la liberación de doxorubicina a partir de micelas de PEO-*b*-PC6A en diferentes puntos de tiempo en diversos entornos de pH.

La figura 8 ilustra las síntesis de éster de NIR-NHS y copolímeros de PEO-*b*-(PR-*r*-NIR) para el desarrollo de NIR-pHAM.

30 La figura 9 ilustra las síntesis de copolímeros de PEG-*b*-PR terminados en maleimida.

La figura 10A muestra la intensidad de fluorescencia de células HUVEC tratadas de forma diferente con nanosondas de pHAM codificado con cRGD, cRAD-pHAM, bloque libre de cRGD ( $N > 10$  para cada grupo) y el medio de cultivo celular, respectivamente.

35 La figura 10B muestra la relación de contraste-ruido (CNR) de células HUVEC tratadas con cRGD-pHAM sobre los controles en bloque de cRAD-pHAM y dRGD.

La figura 11 muestra los estudios de farmacocinética in vivo de pHAM codificado por cRGD (micelas dirigidas) y pHAM libres de cRGD (micelas no dirigidas) en ratones portadores de tumores A549.

40 La figura 12 ilustra un ejemplo de nanosondas (pHAM) activables por pH para la obtención de imágenes de biomarcadores de la angiogénesis (por ejemplo, VEGFR2,  $\alpha_v\beta_3$ ) en tumores vascularizados. Estas nanosondas permanecerán "silenciosas" (o estado inactivado) durante la circulación en sangre, pero pueden activarse mediante la activación del pH después de la endocitosis mediada por receptores en células endoteliales tumorales angiogénicas.

La figura 13 ilustra un ejemplo de mecanismo de activación intracelular para una pHAM dirigida vascularmente en el interior de organelos intracelulares ácidos (es decir, endosomas/lisosomas).

45 Las figuras 14A y 14B muestran los comportamientos de micelización dependientes del pH ((14A) intensidad de dispersión de luz normalizada y (14B) relación de emisión de pireno  $I_1/I_3$  en función del pH) de 4 copolímeros de PEG-*b*-PR diferentes que tienen una concentración de 0,1 mg/ml.

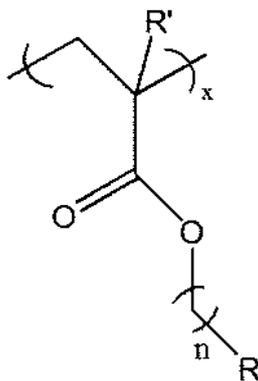
La figura 15 ilustra el direccionamiento selectivo de la administración farmacológica a un tumor mediante una macromolécula más grande, tal como una micela de la invención.

50

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención, según se define en las reivindicaciones, proporciona copolímeros en bloque y composiciones micelares que comprenden uno o más de dichos copolímeros en bloque que son útiles en una o más aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico, tales como tratamiento del cáncer, enfermedad cardiovascular, inflamación, una enfermedad relacionada con la autofagia, o enfermedad de almacenamiento lisosomal, formación de imágenes tumorales, y/o formación de imágenes de organelos intracelulares, tales como endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas. La invención también proporciona procedimientos para usar las composiciones micelares en tales aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

Los copolímeros en bloque de la invención comprenden un segmento polimérico hidrófilo y un segmento polimérico hidrófobo, en los que el segmento polimérico hidrófobo comprende un grupo amina ionizable



en la que R es -H o -CH<sub>3</sub>; en la que R es -NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son grupos alquilo, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales o diferentes, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos, o donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar un anillo que tiene de 5 a 16 carbonos, en la que n es de 1 a 10, en la que x es de 20 a 200 en total, para dar sensibilidad al pH. Los copolímeros en bloque forman nanopartículas micelares activables por pH (pHAM) en base al autoensamblaje supramolecular de estos copolímeros en bloque ionizables (véase, por ejemplo, la figura 1C). Por ejemplo, la figura 1C ilustra el principio de diseño de un ejemplo no limitante de una micela de la invención. A mayor pH, los copolímeros en bloque se ensamblan en micelas, mientras que a menor pH, la ionización del grupo amina en el segmento polimérico hidrófobo, da como resultado la disociación de la micela. Sin desear quedar ligado a la teoría, la formación de micelas y su estabilidad termodinámica son impulsadas por el delicado equilibrio entre los segmentos hidrófobos e hidrófilo. Los grupos ionizables pueden actuar como bloques hidrófilos/hidrófobos ajustables a diferentes valores de pH, que pueden afectar directamente al autoensamblaje dinámico de las micelas. Sin desear quedar ligado a la teoría, la micelización puede agudizar la transición de ionización de las aminas en el segmento polimérico hidrófobo, dando una respuesta rápida y ultra sensible al pH. Se pueden seleccionar diferentes copolímeros en bloque para proporcionar micelas que tengan diferentes valores de transición de pH dentro del intervalo fisiológico, con el fin de lograr una activación selectiva en diversos entornos, tales como tumores (por ejemplo, el entorno extracelular de tumores), o dentro de compartimentos endocíticos específicos, tales como endosomas tempranos o tardíos o lisosomas.

Para aplicaciones terapéuticas, se puede incorporar un fármaco en el interior de las micelas. Las condiciones de pH específicas (por ejemplo, pH ácido presente en tumores y compartimentos endocíticos) pueden conducir a una rápida protonación y disociación de micelas en un número, liberando así el fármaco. En algunas realizaciones, la micela proporciona una encapsulación de fármaco estable a pH fisiológico (pH 7,4), pero puede liberar rápidamente el fármaco en entornos ácidos. Las micelas de la invención pueden proporcionar una o más ventajas en aplicaciones terapéuticas, tales como: (1) disociación de la micela (y liberación rápida del fármaco) en un corto periodo de tiempo (por ejemplo, en minutos) en ciertos entornos de pH (por ejemplo, entornos ácidos), en contraposición a horas o días para composiciones de micelas anteriores; (2) encapsulación de un alto porcentaje de fármaco; (3) direccionamiento selectivo de la administración de fármaco al sitio deseado (por ejemplo, tumor o lisosoma), que puede mejorar la eficacia del fármaco y reducir la toxicidad a células sanas (véase, por ejemplo, la figura 15); (4) tiempos prolongados de circulación en sangre; (5) capacidad de respuesta dentro de intervalos de pH estrechos específicos (por ejemplo, para el direccionamiento de organelos específicos), y (6) terapia guiada por imágenes, donde las señales de imágenes pueden ser un factor predictivo para la eficacia terapéutica para el tratamiento.

Para aplicaciones de diagnóstico, un resto marcador puede conjugarse con el copolímero en bloque. En algunas realizaciones, el marcador (por ejemplo, un marcador fluorescente) se secuestra dentro de la micela cuando el pH favorece la formación de micelas, y el secuestro da como resultado una disminución de la señal de marcador (por ejemplo, a través de inactivación de fluorescencia, véase, por ejemplo, la figura 1C). Las condiciones de pH específicas (por ejemplo, pH ácido presente en tumores y compartimentos endocíticos) pueden conducir a una rápida protonación y disociación de micelas en un número, exponiendo así el marcador, y aumentando la señal de marcador (por ejemplo, aumento la emisión de fluorescencia). Las micelas de la invención pueden proporcionar una

o más ventajas en aplicaciones de diagnóstico, tales como: (1) disociación de la micela (y rápido aumento en la señal de marcador) dentro de un corto periodo de tiempo (por ejemplo, en minutos) en ciertos entornos de pH (por ejemplo, entornos ácidos), en comparación con horas o días para las composiciones de micelas anteriores; (2) aumento de las cargas útiles de imagen; (3) direccionamiento selectivo del marcador al sitio deseado (por ejemplo, tumor o compartimento endocítico particular); (4) tiempos prolongados de circulación en sangre; (5) capacidad de respuesta dentro de intervalos de pH estrechos específicos (por ejemplo, para el direccionamiento de organelos específicos); y (6) alta sensibilidad y especificidad al contraste. Por ejemplo, las micelas pueden permanecer en silencio (o en el estado desactivado) con un mínimo de señales de fondo en condiciones fisiológicas normales (por ejemplo, la circulación en sangre), pero las señales de imagen pueden amplificarse en gran medida cuando las micelas alcanzan sus dianas moleculares deseadas *in vivo* (por ejemplo, entorno tumoral extracelular u organelos celulares). A modo de ejemplo no limitante, tras el direccionamiento específico a biomarcadores angiogénicos (por ejemplo,  $\alpha_v\beta_3$ ), las nanosondas de micelas pueden activarse mediante la activación del pH dentro de los endosomas/lisosomas después de la endocitosis mediada por receptor. La figura 12 ilustra un ejemplo de nanosondas activables por pH (pHAM) para la obtención de imágenes de biomarcadores de angiogénesis (por ejemplo, VEGFR2,  $\alpha_v\beta_3$ ) en tumores vascularizados. Estas nanosondas permanecerán "silenciosas" (o estado inactivado) durante la circulación en sangre, pero pueden activarse mediante la activación del pH después de la endocitosis mediada por receptores en células endoteliales tumorales angiogénicas. La figura 13 ilustra el mecanismo de activación intracelular para una pHAM dirigida vascularmente en el interior de organelos intracelulares ácidos (es decir, endosomas/lisosomas).

## 20 Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "alquilo" indica cualquier resto de hidrocarburo saturado, incluyendo, por ejemplo, restos de hidrocarburos saturados de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclica (incluyendo fundidos y espiro bicíclicos y policíclicos) que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos de hidrocarburos saturados adicionales.

25 Tal como se usa en el presente documento, "micela sensible al pH", "micela activable por pH" y "nanopartícula micelar activable por pH (pHAM)" se usan indistintamente en el presente documento para indicar una micela que comprende uno o más copolímeros en bloque, que se disocian dependiendo del pH (por ejemplo, por encima o por debajo de un cierto pH). A modo de ejemplo no limitante, a un cierto pH, el copolímero en bloque está substancialmente en forma micelar. A medida que el pH cambia (por ejemplo disminuye), las micelas comienzan a disociarse y, a medida que el pH cambia adicionalmente (por ejemplo, disminuye adicionalmente), el copolímero en bloque está presente sustancialmente en forma disociada (no micelar).

En el presente documento se utiliza una "nanosonda" para indicar una micela sensible al pH que comprende un resto marcador de imágenes.

35 Tal como se usa en el presente documento, "intervalo de transición de pH" indica el intervalo de pH sobre el cual las micelas se disocian. En algunas realizaciones, el intervalo de transición del pH es la nitidez de la respuesta al pH. Un ejemplo de determinación de la nitidez de la respuesta al pH se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Brevemente, la intensidad de fluorescencia frente al pH se mide para un copolímero en bloque que comprende un marcador fluorescente que se secuestra dentro de la micela (fluorescencia de inactivación) cuando el copolímero en bloque está en forma micelar (véase, por ejemplo, la figura 1C). A medida que el pH cambia (por ejemplo, disminuye), la micela se disocia, exponiendo el marcador fluorescente y dando como resultado la emisión de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia normalizada (NFI) frente a las curvas de pH permite una evaluación cuantitativa de las propiedades de respuesta al pH de la micela. NFI se calcula como la relación de  $[F - F_{\min}] / [F_{\max} - F_{\min}]$ , donde F es la intensidad de fluorescencia de la micela a cualquier pH dado, y  $F_{\max}$  y  $F_{\min}$  son las intensidades de fluorescencia máxima y mínima en los estados activado/desactivado, respectivamente. La nitidez de la respuesta al pH es  $\Delta\text{pH}_{10-90}\%$ , el intervalo de pH en el que el valor NFI varía del 10 % al 90 %. Para copolímeros sin marcador, puede utilizarse dispersión dinámica de la luz (DLS) o un fluoróforo externo (por ejemplo, pireno) para caracterizar los comportamientos de micelización dependientes del pH. Por ejemplo, la **figura 14A** muestra la intensidad de dispersión de luz normalizada de varios copolímeros de PEO-*b*-PR a una concentración de 0,1 mg/ml en función del pH. A diferentes valores de pH, se observó un aumento drástico de la intensidad de dispersión de la luz debido a la formación de nanopartículas micelares a partir de unímeros en solución. Los diámetros hidrodinámicos de las micelas resultantes se midieron a 40-50 nm. Los datos de dispersión de luz se apoyaron adicionalmente examinando las relaciones  $I_1/I_3$  (a 372-374 y 382-384 nm, respectivamente) de las emisiones de pireno ( $\lambda_{\text{exc}} = 339 \text{ nm}$ ) (**figura 14B**). La relación  $I_1/I_3$  refleja la polaridad del entorno de pireno donde un reparto de pireno en el núcleo micelar conduce a valores de  $I_1/I_3$  disminuidos.

55 Tal como se usa en el presente documento, el "valor de transición del pH" (pH<sub>t</sub>) indica el pH al cual la mitad de las micelas están disociadas. Un ejemplo de determinación del valor de transición del pH se describe en el Ejemplo 2 a continuación. En resumen, para un copolímero en bloque que comprende un marcador fluorescente que está secuestrado dentro de la micela (fluorescencia de inactivación) cuando el copolímero en bloque está en forma micelar, el valor de transición de pH es el pH al que la emisión de fluorescencia medida es  $0,5 \times (F_{\max} + F_{\min})$ , donde  $F_{\max}$  y  $F_{\min}$  son las intensidades de fluorescencia máximas y mínimas en los estados activado/desactivado, respectivamente. Para copolímeros sin marcador, puede utilizarse dispersión dinámica de la luz (DLS) o un

fluoróforo externo (por ejemplo, pireno) para caracterizar los comportamientos de micelización dependientes del pH. Por ejemplo, la **figura 14A** muestra la intensidad de dispersión de luz normalizada de varios copolímeros de PEO-*b*-PR a una concentración de 0,1 mg/ml en función del pH. A diferentes valores de pH, se observó un aumento drástico de la intensidad de dispersión de la luz debido a la formación de nanopartículas micelares a partir de unímeros en solución. Los diámetros hidrodinámicos de las micelas resultantes se midieron a 40-50 nm. Los datos de dispersión de luz se apoyaron adicionalmente examinando las relaciones  $I_1/I_3$  (a 372-374 y 382-384 nm, respectivamente) de las emisiones de pireno ( $\lambda_{ex} = 339$  nm) (**figura 14B**). La relación  $I_1/I_3$  refleja la polaridad del entorno de pireno donde un reparto de pireno en el núcleo micelar conduce a valores de  $I_1/I_3$  disminuidos. Ambos experimentos de dispersión de luz y pireno produjeron valores de transición de pH similares. Los valores de pHT fueron 5,0, 6,2, 7,0 y 7,2 para PEO-*b*-PDBA, PEO-*b*-PDPA, PEO-*b*-PC7A, PEO-*b*-PC6A, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural de la patología clínica de la enfermedad o trastorno que se está tratando (por ejemplo, cáncer). Los efectos deseables del tratamiento incluyen, por ejemplo, mejorar o paliar la patología, retardar o revertir el avance del trastorno, la remisión, o la mejora del pronóstico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico, profiláctico o de diagnóstico deseado. Se puede proporcionar una cantidad eficaz en una o más administraciones.

Tal como se usa en el presente documento, "individuo" indica un animal, preferiblemente un mamífero, incluyendo seres humanos, primates, animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, etc.), animales de granja (por ejemplo vacas, una oveja, cabras, cerdos, etc.), mascotas (por ejemplo, perros, gatos, etc.), y animales deportivos (por ejemplo, caballos, etc.). En algunas realizaciones, un individuo es un ser humano.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento también incluye (y describe) realizaciones dirigidas a ese valor o parámetro per se.

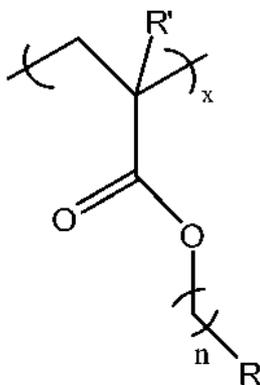
Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencia al plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Se entiende que todos los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen aspectos "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones. Debe entenderse que los procedimientos o composiciones "que consiste esencialmente en" los elementos citados incluyen solamente las etapas o materiales especificados y aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de dichos procedimientos y composiciones.

Debe apreciarse que cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar en cualquiera de los procedimientos como se describe en el presente documento, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

#### **Compuestos de copolímeros en bloque**

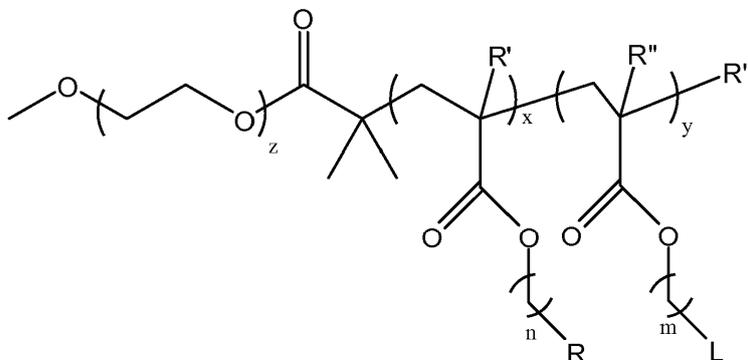
Se proporcionan en el presente documento copolímeros en bloque novedosos, que comprenden un segmento polimérico hidrófilo y un segmento polimérico hidrófobo, en los que el segmento polimérico hidrófilo comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en: poli(óxido de etileno) (PEO), poli(metacrilato fosfatidil colina) (MPC) y polivinilpirrolidona (PVP), en los que el polímero en el segmento polimérico hidrófilo tiene de 100 a 130 unidades monoméricas, en los que el segmento polimérico hidrófobo comprende



en la que  $R'$  es  $-H$  o  $-CH_3$ , en la que  $R$  es  $-NR^1R^2$ , en la que  $R^1$  y  $R^2$  son grupos alquilo, en la que  $R^1$  y  $R^2$  son iguales o diferentes, en la que  $R^1$  y  $R^2$  juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos, en la que  $R^1$  y  $R^2$  pueden unirse opcionalmente para formar un anillo, en la que  $n$  es de 1 a 10, en la que  $x$  es de 20 a 200 en total, y en la que el copolímero en bloque puede comprender además opcionalmente un resto marcador. Por ejemplo,  $x$  puede ser de

20 a 200 como un segmento continuo (es decir, un segmento continuo de 20 a 200 unidades monoméricas), o pueden intercalarse otros restos (por ejemplo, restos que comprenden un marcador) entre las unidades monoméricas, por ejemplo, como se describe en más detalle a continuación.

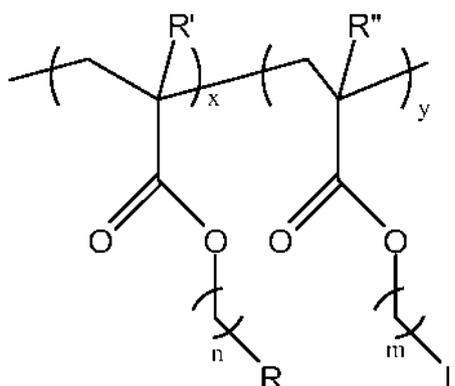
Los copolímeros en bloque de la invención incluyen, por ejemplo, compuestos de Fórmula I:



(Fórmula I)

5

en la que L es un resto marcador, en la que y es de 0 a 6, en la que R'' es -H o -CH<sub>3</sub>; en la que m es de 1 a 10, en la que z es tal que el PEO tiene de 2 kD a 20 kD de tamaño, en la que x, n, R, y R' son como se han definido anteriormente, en la que R''' es cualquier resto adecuado, y en la que la siguiente porción de la estructura:

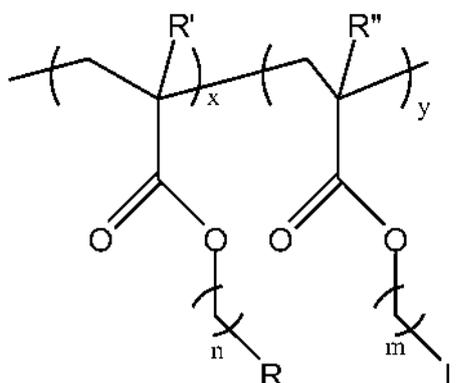


10 puede disponerse en cualquier orden.

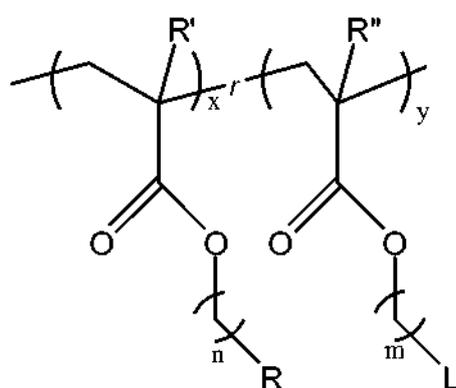
En algunas realizaciones, R''' es un grupo terminal resultante de una reacción de polimerización. Por ejemplo, R''' puede ser -Br cuando se usa polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP). Debe apreciarse que las estructuras químicas en las figuras 1A, 2A, 2B, 8 y 9 pueden comprender -Br como el grupo terminal resultante de la reacción de polimerización. Por ejemplo, R''' puede ser un grupo que contiene azufre, tal como tioato o un tioéster cuando se usa transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT). En algunas realizaciones, R''' es -Br. R''' es tioato. En algunas realizaciones, R''' es un tioéster. El grupo terminal puede modificarse opcionalmente además tras la polimerización con un resto apropiado.

15

En algunas realizaciones, la siguiente porción de la estructura:

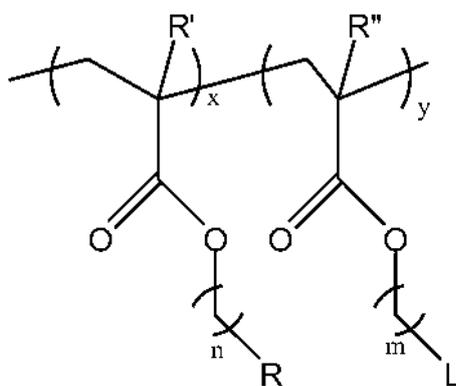


está aleatorizada. es decir:



5 en la que  $r$  indica un orden aleatorio de los restos que contienen R y los restos que contienen L (es decir, los restos que contienen R y los restos que contienen L están intercalados de forma aleatoria).

En algunas realizaciones, la siguiente porción de la estructura:



10 se dispone secuencialmente. Por ejemplo, los restos que contienen R pueden estar presentes como un único bloque, con los restos que contienen L presentes como un único bloque, ya sea precediendo o siguiendo los restos que contienen R. Pueden utilizarse también otras disposiciones.

Segmento polimérico hidrófilo

15 En algunas realizaciones, el segmento polimérico hidrófilo comprende poli(óxido de etileno) (PEO). En algunas realizaciones, el segmento polimérico hidrófilo comprende poli(metacrilato fosfatidil colina) (MPC). En algunas realizaciones, el segmento polimérico hidrófilo comprende polivinilpirrolidona (PVP). En general, el polímero PEO, MPC, o PVP en el segmento polimérico hidrófilo tiene de 2 kD a 20 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 2 kD a 10 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 2 kD a 5 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 3 kD a 8 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 4 kD a 6 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene 5 kD de tamaño. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 100 a 130 unidades monoméricas. En algunas realizaciones, el polímero tiene de 110 a 120 unidades monoméricas. En algunas realizaciones, el polímero tiene 114 unidades monoméricas. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) del polímero es menor de 1,2. En algunas realizaciones, el índice de

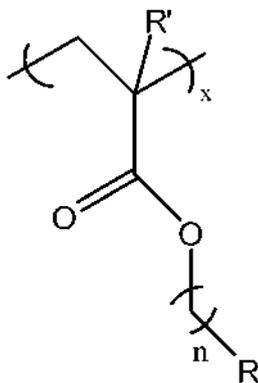
polidispersidad (PDI) del polímero es menor se 1,1.

5 Pueden adquirirse polímeros de PEO, MPC y PVP adecuados (por ejemplo, los polímeros de PEO pueden adquirirse en Aldrich Sigma) o pueden sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo puede utilizarse como un iniciador para la polimerización de los monómeros hidrófobos para formar un copolímero en bloque.

10 Por ejemplo, se pueden preparar polímeros de MPC (por ejemplo, polímeros MPC estrechamente distribuidos) mediante polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP) con iniciadores de moléculas pequeñas disponibles en el mercado tales como 2-bromo-2-metilpropanoato de etilo (Sigma Aldrich). Estos polímeros de MPC resultantes pueden usarse como iniciadores de ATRP macromoleculares para copolimerizarse adicionalmente con otros monómeros para formar polímeros en bloque tales como MPC-*b*-PDPA. Los copolímeros en bloque de PEO-*b*-PR se pueden sintetizar usando procedimientos de usando polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP) o transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT) (véase, por ejemplo, Australian Journal of Chemistry Volumen: 58 Edición: 6 Páginas: 379-410 (2005); Progress in Polymer Science Volumen: 32 Edición: 1 Páginas: 93-146 (2007). ATRP o RAFT permiten la polimerización viva que puede producir copolímeros de PEO-*b*-PR con una estrecha polidispersidad (<1,1). Pueden usarse diferentes monómeros de metacrilato o acrilato para producir segmentos de PR con diferente sensibilidad al pH.

Segmento polimérico hidrófobo

El segmento polimérico hidrófobo comprende:



20 en la que R' es -H o -CH<sub>3</sub>, en la que R es -NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son grupos alquilo, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales o diferentes, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse opcionalmente para formar un anillo, en la que n es de 1 a 10, y en la que x es de 20 a 200 en total.

En algunas realizaciones, n es de 1 a 4. En algunas realizaciones, n es 2. En diversas realizaciones, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

25 En algunas realizaciones, R' es -CH<sub>3</sub>. En algunas realizaciones, R' es -H;

En algunas realizaciones, x es de 40 a 100 en total. En algunas realizaciones, x es de 50 a 100 en total. En algunas realizaciones, x es de 40 a 70 en total. En algunas realizaciones, x es de 60 a 80 en total. En algunas realizaciones, en la que x es 70 en total.

30 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> comprenden 3 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> comprenden 4 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> comprenden 5 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> comprenden 6 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> comprenden 7 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> comprenden 8 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son diferentes. En algunas realizaciones, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es independientemente alquilo lineal o ramificado. En algunas realizaciones, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es alquilo lineal. En algunas realizaciones, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es alquilo ramificado. Los grupos alquilo adecuados R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo y pentadecilo, incluyendo diversos isómeros estructurales posibles para cada grupos alquilo tales como n-, iso-, sec-, terc-, neo-, etc., siempre que el número total de carbonos en R sea 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son butilo. En algunas realizaciones, butilo es n-butilo. En algunas realizaciones, butilo es iso-butilo. En algunas realizaciones, butilo es sec-butilo. En algunas realizaciones, butilo es t-butilo. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen para formar un anillo. El anillo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo, siempre que el número total de carbonos en R sea de 5 a 16. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos forman un anillo que tiene de 5 a 10 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos forman un anillo que tiene de 5 a 8 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos

forman un anillo que tiene de 5 a 7 carbonos. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos son -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos son -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-.

5 El segmento polimérico hidrófobo se puede sintetizar según, por ejemplo, la polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP) o transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT). Un ejemplo de síntesis de ATRP de un segmento polimérico hidrófobo puede encontrarse en el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) para el segmento polimérico hidrófobo es menor de 1,2. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) para el segmento polimérico hidrófobo es menor de 1,1.

Resto marcador

10 El copolímero en bloque puede comprender opcionalmente uno o más restos marcadores (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más). En algunas realizaciones, el marcador es un marcador fluorescente. En algunas realizaciones, el marcador fluorescente es tetrametil rodamina (TMR). En algunas realizaciones, el marcador es un marcador de infrarrojo cercano (NIR). En algunas realizaciones, el marcador NIR es cipato o un análogo de cipato.

15 Cuando el copolímero en bloque es un compuesto de Fórmula I, en algunas realizaciones, R" es -CH<sub>3</sub>. En algunas realizaciones, R" es -H. En algunas realizaciones, m es de 1 a 4. En algunas realizaciones, m es 2. En diversas realizaciones, m es 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, y es 0. En algunas realizaciones, y es de 1 a 6. En diversas realizaciones, y es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, y es 3.

20 El resto marcador puede conjugarse con el copolímero directamente o a través de un resto enlazador. Pueden usarse procedimientos conocidos en la técnica para conjugar el resto marcador con, por ejemplo, el polímero hidrófobo. Pueden encontrarse ejemplos de conjugación, por ejemplo, por ejemplo, en los Ejemplos 1 y 5 a continuación.

25 Las micelas de la invención pueden tener ventajosamente altas cargas útiles de imagen. En diversas realizaciones, las micelas tienen al menos 500 colorantes, al menos 1000, al menos 1500, al menos 2000, al menos 2400, al menos 3000 colorantes por micela. En comparación, los conjugados inmunofluorescentes típicos tienen 4 fluoróforos por molécula, ya que un número mayor conducirá a la inactivación del colorante y también puede modificar los epítomos de unión.

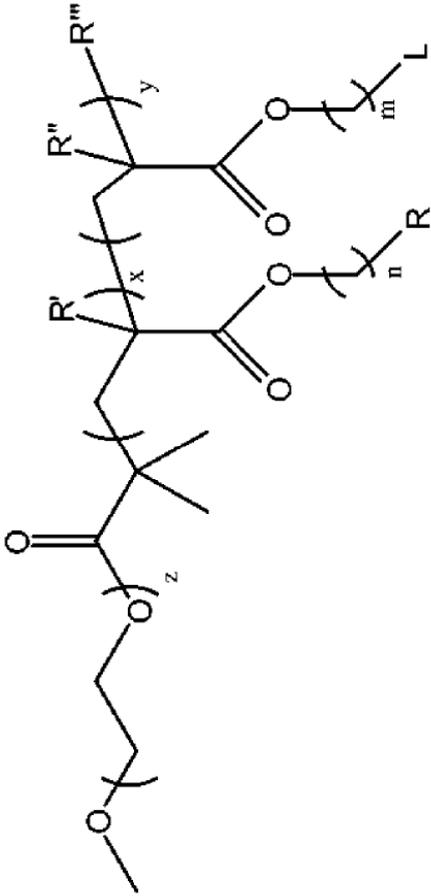
Se pueden preferir diferentes marcadores para el procedimiento de uso particular. Por ejemplo, se puede usar tetrametil-rodamina, por ejemplo, para el estudio celular *in vitro* sobre imágenes confocales, mientras que para estudios de imagen de animales *in vivo*, los colorantes NIR pueden aumentar las penetraciones tisulares.

Copolímeros en bloque ejemplares

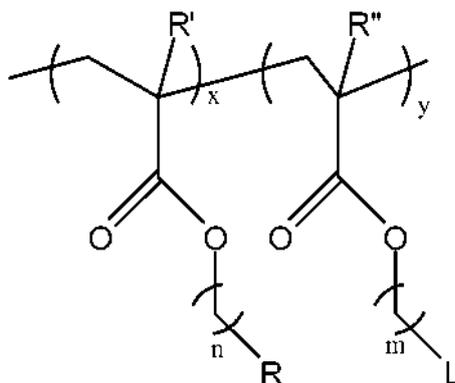
30 Los ejemplos no limitantes de copolímeros en bloque de la invención incluyen los descritos en los Ejemplos a continuación. Los ejemplos no limitantes de copolímeros en bloque de Fórmula I se proporcionan en la Tabla A.

Tabla A. Copolímeros en bloque ejemplares (siendo el compuesto 3 un compuesto de referencia)

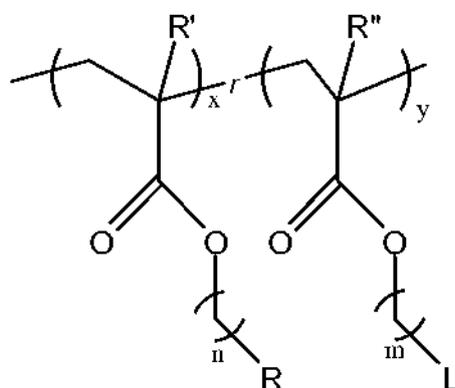
Compuesto	R'	R <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	n	z	R''	m	x y	L	R'''
3 (sin etiqueta)	-CH <sub>3</sub>	iPr/iPr	2	114	-	-	45	Ninguno	Br
4 (sin etiqueta)	-CH <sub>3</sub>	nBu/nBu	2	114	-	-	51	Ninguno	Br
6 (sin etiqueta)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	2	114	-	-	45	Ninguno	Br
7 (sin etiqueta)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -	2	114	-	-	49	Ninguno	Br
3 (etiqueta de TMR)	-CH <sub>3</sub>	iPr/iPr	2	114		2	70	TMR	Br
4 (etiqueta de TMR)	-CH <sub>3</sub>	nBu/nBu	2	114		2	70	TMR	Br
6 (etiqueta de TMR)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	2	114		2	70	TMR	Br
7 (etiqueta de TMR)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -	2	114		2	70	TMR	Br
3 (etiqueta de cipato)	-CH <sub>3</sub>	iPr/iPr	2	114		2	70	cipato	Br
4 (etiqueta de cipato)	-CH <sub>3</sub>	nBu/nBu	2	114		2	70	cipato	Br
6 (etiqueta de cipato)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	2	114		2	70	cipato	Br
7 (etiqueta de cipato)	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -	2	114		2	70	cipato	Br



En la Tabla A, la siguiente porción de la estructura:



está aleatorizada. es decir,



- 5 Con respecto a los compuestos descritos en el presente documento, debe entenderse que las reacciones de polimerización pueden dar como resultado una cierta variabilidad de la longitud del polímero, y que los números descritos en el presente documento que indican el número de unidades monoméricas dentro de un polímero particular (por ejemplo x, y, z) pueden indicar un número medio de unidades monoméricas. En algunas realizaciones, un segmento polimérico descrito en el presente documento (por ejemplo, el segmento polimérico hidrófobo, el segmento polimérico hidrófilo) tiene un índice de polidispersidad (PDI) menor de 1,2. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) para el segmento polimérico es menor de 1,1. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) para el copolímero en bloque es menor de 1,2. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad (PDI) para el copolímero en bloque es menor de 1,1.

### **Composiciones micelares**

- 15 Puede usarse uno o más copolímeros en bloque (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) descritos en el presente documento para formar una micela sensible al pH. En algunas realizaciones, una composición comprende un único tipo de micela. En algunas realizaciones, pueden combinarse dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) tipos diferentes de micelas para formar una composición micelar mixta.

- 20 Las composiciones de micelas sensibles al pH de la invención pueden tener ventajosamente un estrecho intervalo de transición de pH, a diferencia de otras composiciones sensibles al pH en las que la respuesta al pH es muy amplia (es decir, 2 unidades de pH). En algunas realizaciones, las micelas tienen un intervalo de transición de pH de menos de 1 unidad de pH. En diversas realizaciones, las micelas tienen un intervalo de transición de pH de menos de 0,9, menos de 0,8, menos de 0,7, menos de 0,6, menos de 0,5, menos de 0,4, menos de 0,3, menos de 0,2, menos de 0,1 unidades de pH. En algunas realizaciones, las micelas tienen un intervalo de transición de pH de menos de 0,5 unidades de pH. En algunas realizaciones, las micelas tienen un intervalo de transición de pH de menos de 0,25 unidades de pH.

- 30 Cuando las micelas comprenden un marcador fluorescente, las estrechas propiedades sensibles al pH de pHAM pueden mejorar la eficiencia de la generación de fluorescencia. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, la respuesta al pH de pHAM puede originarse a partir tanto de mecanismos de homoFRET como de PET como resultado de la neutralización cooperativa y la micelización de los copolímeros en bloque (véase, por ejemplo, la figura 1C). En comparación con los colorantes sensibles al pH de moléculas pequeñas o las micelas basadas en PET (las activaciones necesitan 2 unidades de pH), la aguda respuesta al pH de pHAM puede dar lugar a la activación completa de los fluoróforos con sutiles cambios del pH en el microentorno tumoral ( $pH_e = 6,5-6,9$ ) u organelos intracelulares (5,0-6,2).

Las micelas pueden tener diferentes valores de transición de pH dentro del intervalo fisiológico, con el fin de dirigirse a células o microentornos específicos. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5 a 8. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5 a 6. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6 a 7. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 7 a 8. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,3 a 6,9 (por ejemplo, microentorno tumoral). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 6,2 (por ejemplo, organelos intracelulares). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,9 a 6,2 (por ejemplo, endosomas tempranos). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5 (por ejemplo, endosomas tardíos o lisosomas). Como se describe en los Ejemplos, las nanosondas **4**, **3**, **7** y **6** tenían valores de pH de transición de fluorescencia de 5,4, 6,3, 6,8 y 7,2, respectivamente.

Las micelas marcadas de la invención pueden tener ventajosamente una respuesta de señal grande (por ejemplo, una mayor diferencia en la señal entre los estados activado y desactivado). Por ejemplo, cuando se usan marcadores fluorescentes, la relación de  $F_{\text{máx}}$  y  $F_{\text{mín}}$  ( $R_F = F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$ ) puede usarse para cuantificar la respuesta a la fluorescencia entre los estados activado/desactivado. Como se muestra en los Ejemplos, se fabricaron nanosondas que tenían valores  $R_F$  en el intervalo de 10 a 55 veces (**Tabla 3**), demostrando la gran respuesta a la fluorescencia de las nanosondas. En diversas realizaciones, las micelas marcadas tienen una respuesta de señal de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el uso de micelas en la terapia contra el cáncer puede aumentar la eficacia antitumoral y reducir la toxicidad en tejidos sanos, en parte debido al tamaño de las micelas. Mientras que moléculas pequeñas, tales como ciertos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, doxorubicina), pueden entrar en los tejidos normales y tumorales, las nanopartículas micelares no dirigidas pueden cruzar preferentemente la vasculatura tumoral permeable (véase, por ejemplo, la figura 15). En algunas realizaciones, las micelas tienen un tamaño de 10 a 200 nm. En algunas realizaciones, las micelas tienen un tamaño de 20 a 100 nm. En algunas realizaciones, las micelas tienen un tamaño de 30 a 50 nm.

Los ejemplos de procedimientos de generación de micelas a partir de copolímeros en bloque se pueden encontrar en los siguientes Ejemplos. Por ejemplo, el copolímero en bloque se disuelve primero en disolvente orgánico (por ejemplo, THF) y se puede añadir a una solución acuosa, opcionalmente bajo sonicación, en la que el copolímero se autoensambla para formar micelas en la solución.

En algunas realizaciones, la micela comprende además un fármaco. En algunas realizaciones, la micela comprende además un resto marcador. En algunas realizaciones, la micela comprende además un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, la micela comprende además un fármaco y un resto marcador. En algunas realizaciones, la micela comprende además un fármaco y un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, la micela comprende además un resto de direccionamiento y un resto marcador. En algunas realizaciones, la micela comprende además un fármaco, un resto de direccionamiento, y un resto marcador.

### 35 Restos de direccionamiento

Las micelas pueden comprender además opcionalmente un resto de direccionamiento en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede dirigirse a un marcador de superficie celular de cáncer, tal como un biomarcador de la angiogénesis. Por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, las nanosondas dirigidas pueden ser útiles para diagnosticar tumores y/o la evaluación de eficacia de terapias antiangiogénicas dirigidas a las moléculas, donde los niveles de expresión de las dianas terapéuticas (por ejemplo, VEGFR2,  $\alpha_v\beta_3$ ) se pueden medir específicamente.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a un biomarcador de la angiogénesis. En algunas realizaciones, el biomarcador de la angiogénesis es un complejo VEGF-VEGFR o endoglina. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a VEGFR2. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es un fragmento Fab' de mAb RAFL-1. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a una integrina  $\alpha_v\beta_3$ . En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es cRGDfK.

El resto de direccionamiento puede conjugarse con el copolímero en bloque (por ejemplo, el segmento polimérico hidrófilo) por procedimientos conocidos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de conjugación en los Ejemplos a continuación.

### 50 Encapsulación de fármacos

Las micelas pueden comprender además opcionalmente un fármaco encapsulado en la micela. Debido al interior hidrófobo de la micela, los fármacos hidrófobos pueden encapsularse más fácilmente dentro de las micelas. En algunas realizaciones, el fármaco es hidrófobo y tiene baja solubilidad en agua. En algunas realizaciones, el fármaco tiene un log p de 2 a 8. En algunas realizaciones, el fármaco es un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el fármaco es doxorubicina. En algunas realizaciones, el fármaco es  $\beta$ -lapachona. En algunas realizaciones, el fármaco es paclitaxel.

El fármaco puede incorporarse en las micelas usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como la

evaporación del disolvente. Se pueden encontrar ejemplos de incorporación de fármacos en, por ejemplo, el Ejemplo 4 a continuación. Brevemente, por ejemplo, el fármaco puede encapsularse en micelas disolviendo primero el fármaco y el copolímero en bloque en una solución orgánica. La adición de esta solución a una solución acuosa, opcionalmente bajo sonicación, puede dar como resultado un fármaco encapsulado en micelas.

## 5 Métodos terapéuticos y de diagnóstico

Las micelas que comprenden un fármaco pueden usarse para tratar, por ejemplo, cánceres, enfermedad cardiovascular, inflamación, una enfermedad relacionada con la autofagia, o enfermedad de almacenamiento lisosomal, u otras enfermedades en las que el fármaco puede ser administrado a la ubicación apropiada debido a diferencias de pH localizadas (por ejemplo, un pH diferente del pH fisiológico (7,4)). Las micelas para procedimientos terapéuticos pueden comprender opcionalmente además un resto marcador (por ejemplo, para facilitar la formación de imágenes del tratamiento) y/o un resto de direccionamiento (por ejemplo, para dirigirse a un marcador de superficie celular específico o dirigirse a las micelas para administración endocítica). En algunas realizaciones, el trastorno tratado es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido. En realizaciones en las que la micela comprende un resto de direccionamiento, pueden tratarse los cánceres no sólidos. En algunas realizaciones, el trastorno tratado es enfermedad de almacenamiento lisosomal. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,3 a 7,2 (por ejemplo, para su administración al microentorno tumoral). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 6,5 (por ejemplo, para su administración a organelos intracelulares). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,2 o por encima de 6,2 (por ejemplo, para su administración a endosomas tempranos). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,5 (por ejemplo, para su administración a endosomas tardíos o lisosomas). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,3 a 6,9. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 6,2. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,9 a 6,2. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5. Como se describe en los Ejemplos, las nanosondas **4**, **3**, **7** y **6** tienen valores de pH de transición de fluorescencia de 5,4, 6,3, 6,8 y 7,2, respectivamente. En algunas realizaciones, puede usarse pHAM no dirigido con mayor pH<sub>t</sub> (por ejemplo, 7,2, 6,8) para administrar el fármaco a los tumores. En algunas realizaciones, puede usarse pHAM diana con menor pH<sub>t</sub> (por ejemplo, 5,4, 6,3) para administrar el fármaco a compartimentos endocíticos.

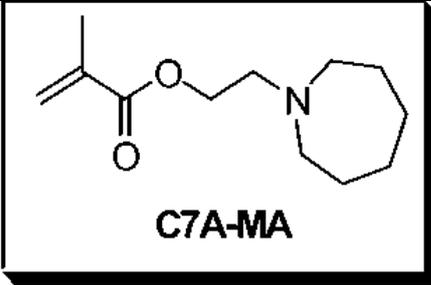
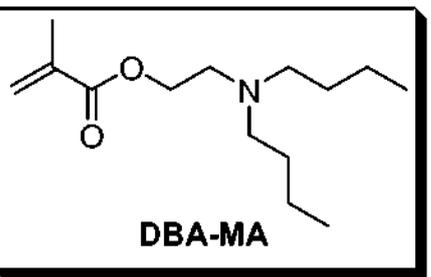
Las micelas que comprenden un resto marcador pueden usarse en aplicaciones de formación de imágenes, por ejemplo, tumores de imagen o compartimentos endocíticos. Las micelas para procedimientos de diagnóstico pueden comprender opcionalmente además un resto de direccionamiento (por ejemplo, para dirigirse a un marcador de superficie celular específico o dirigirse a las micelas para administración endocítica). En algunas realizaciones, el procedimiento se usa para diagnosticar un tumor en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento se usa para controlar un tumor en el individuo, por ejemplo, para controlar los efectos de un tratamiento. En algunas realizaciones, la micela se usa para formar imágenes de la actividad endosómica temprana. En algunas realizaciones, la micela se usa para formar imágenes de la actividad endosómica tardía. En algunas realizaciones, la micela se usa para formar imágenes de la actividad lisosómica. En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,3 a 7,2 (por ejemplo, para su administración al microentorno tumoral). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 6,5 (por ejemplo, para su administración a organelos intracelulares). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,2 o por encima de 6,2 (por ejemplo, para su administración a endosomas tempranos). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,5 (por ejemplo, para su administración a endosomas tardíos o lisosomas). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 6,3 a 6,9 (por ejemplo, para formar imágenes del microentorno tumoral). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 6,2 (por ejemplo, para formar imágenes de organelos intracelulares). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,9 a 6,2 (por ejemplo, para formar imágenes de endosomas tempranos). En algunas realizaciones, las micelas tienen un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5 (por ejemplo, para formar imágenes de los endosomas tardíos o lisosomas). Como se describe en los Ejemplos, las nanosondas **4**, **3**, **7** y **6** tienen valores de pH de transición de fluorescencia de 5,4, 6,3, 6,8 y 7,2, respectivamente. En algunas realizaciones, puede usarse pHAM no dirigido con mayor pH<sub>t</sub> (por ejemplo, 7,2, 6,8) para formar imágenes de tumores. En algunas realizaciones, puede usarse pHAM dirigido con menor pH<sub>t</sub> (por ejemplo, 5,4, 6,3) para formar imágenes de compartimentos endocíticos, o para formar imágenes de tumores a través de la captación endocítica.

Puede usarse más de un tipo de marcador en las composiciones de la invención. Por ejemplo, pueden usarse diferentes fluoróforos NIR (por ejemplo, con longitudes de onda de excitación/emisión distintivas) para generar una serie de nanosondas multicromáticas para diferentes biomarcadores. Esto crea un conjunto multicromático de nanosondas que permiten la formación simultánea de imágenes de varias dianas moleculares (por ejemplo, VEGFR2 y  $\alpha_v\beta_3$ ) que pueden mejorar adicionalmente la eficacia de la formación de imágenes de la vasculatura de tumor angiogénico.

La invención también proporciona una composición que comprende una micela y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición se puede administrar al individuo mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como, por ejemplo, inyección (por ejemplo, inyección intravenosa) o infusión. La administración puede ser local o sistémica.



(continuación)

Monómero de metacrilato	Caracterización
 <p style="text-align: center;"><b>C7A-MA</b></p>	<sup>1</sup> H RMN (TMS, CDCl <sub>3</sub> , ppm): 6,09 (a, 1H, CHH=C(CH <sub>3</sub> -), 5,55 (a, 1H, CHH=C(CH <sub>3</sub> -), 4,24 (t, J = 6,5 Hz, 2H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 2,84 (t, J = 6,5 Hz, 2H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 2,72 (m, 4H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ), 1,94 (s, 3H, CH <sub>2</sub> =C(CH <sub>3</sub> -), 1,63 (m, 4H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ), 1,58 (m, 4H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ).
Metacrilato de 2-(hexametilenoinino)etilo (C7A-MA)	<b>Rendimiento:</b> 54 %
 <p style="text-align: center;"><b>DBA-MA</b></p>	<sup>1</sup> H RMN (TMS, CDCl <sub>3</sub> , ppm): 6,09 (a, 1H, CHH=C(CH <sub>3</sub> -), 5,55 (a, 1H, CHH=C(CH <sub>3</sub> -), 4,19 (t, J = 6,3 Hz, 2H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 2,73 (t, J = 6,3 Hz, 2H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 2,46 (t, J = 7,6 Hz, 2H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1,93 (s, 3H, CH <sub>2</sub> =C(CH <sub>3</sub> -), 1,41 (m, 4H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1,29 (m, 4H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 0,89 (t, J = 7,3 Hz, 6H, -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).
Metacrilato de 2-(dibutilamino)etilo (DBA-MA)	<b>Rendimiento:</b> 53 %

## II. Síntesis de copolímeros en bloque de PEO-*b*-PR y PEO-*b*-(PR-*r*-TMR)

5 Dos series de copolímeros en bloque (PEO-*b*-PR ( $y = 0$ ) y PEO-*b*-PR-*r*-TMR, **figura 1A**) con diferentes segmentos que contienen amina terciaria (PR) y segmentos de poli(óxido de etileno) (PEO) se fabricaron por polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP; Tsarevsky & Matyjaszewski, Chem. Rev. 2007, 107:2270-2299; Ma et al., Macromolecules 2003, 36:3475-3484). En la serie di-alkilo lineal (véase la **figura 1B**, grupos R **1**, **2**, **3**, y **4**), la longitud de cadena varió de grupos metilo a butilo; en la serie cíclica (véase la **figura 1B**, grupos R **5**, **6** y **7**), el tamaño del anillo varió de 5 a 7 miembros en los anillos.

10 Se usó un colorante insensible al pH, tetrametil rodamina (TMR; Albertazzi et al. Am. Chem. Soc. 2010, 132:18158-18167) como un fluoróforo modelo y se conjugó en el bloque de PR como una baliza de imagen para investigar las propiedades sensibles al pH de las nanopartículas de pHAM. Como se describe en más detalle a continuación, a mayor pH, los segmentos de PR neutros se autoensamblan cooperativamente en los núcleos hidrófobos de las micelas, lo que da como resultado la agregación de fluoróforos y la inactivación de señales fluorescentes a través de

15 mecanismos de transferencia de resonancia de Förster entre moléculas de TMR (homo-FRET) y la transferencia de electrones fotoinducida (PeT) de aminas terciarias a TMR (Kobayashi et al., Chem. Rev. 2010, 110:2620-2640; Uchiyama et al., Chem. Int. Ed. 2008, 47:4667-4669; Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3<sup>a</sup> ed., Springer, New York City, 2006, págs. 443-475; Diaz-Fernandez et al., Chem. Eur. J. 2006, 12:921-930). A menor pH, los segmentos de PR se protonan y se cargan positivamente, lo que conduce al desensamblaje micelar y al aumento drástico de la emisión de fluorescencia debido al aumento de la distancia TMR y la disminución en PeT (**figura 1C**).

Los copolímeros de PEO-*b*-PR (**figura 2A**) se sintetizaron en primer lugar por el procedimiento de polimerización radical por transferencia de átomos (ATRP). Los copolímeros sin colorante se usaron en las caracterizaciones poliméricas y la medición de pKa y las concentraciones micelares críticas (Tablas 2 y 3). Se usa PEO-*b*-PDPA como un ejemplo para ilustrar el procedimiento. En primer lugar, se cargaron DPA-MA (1,06 g, 5 mmol), PMDETA (21  $\mu$ l, 0,1 mmol) y MeO-PEG<sub>114</sub>-Br (0,5 g, 0,1 mmol) en un tubo de polimerización. Después, se añadió una mezcla de 2-propanol (2 ml) y DMF (2 ml) para disolver el monómero y el iniciador. Después de tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación para retirar el oxígeno, se añadió CuBr (14 mg, 0,1 mmol) en el tubo de reacción en una atmósfera de nitrógeno, y el tubo se cerró herméticamente al vacío. La polimerización se realizó a 40 °C durante 8 h. Después de la polimerización, la mezcla de reacción se diluyó con 10 ml de THF, y se pasó a través de una columna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para retirar el catalizador. El disolvente de THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se dializó en agua destilada y se liofilizó para obtener un polvo de color blanco. Los copolímeros de PEO-*b*-PR resultantes se caracterizaron por RMN <sup>1</sup>H 500 MHz, cromatografía de permeación en gel (Viscotech GPCmax, columnas MIXED-D

5 PLgel de 5  $\mu\text{m}$  de Polymer Labs, THF como eluyente a 1 ml/min). La Tabla 2 enumera el rendimiento, los pesos moleculares ( $M_n$  y  $M_w$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) de cada copolímero. PEO-*b*-PDPA (sin resto marcador) indica el copolímero en bloque (3), PEO-*b*-PDBA (sin resto marcador) indica el copolímero en bloque (4), PEO-*b*-PC6A (sin resto marcador) indica el copolímero en bloque (6), y PEO-*b*-PC7A (sin resto marcador) indica el copolímero en bloque (7).

**Tabla 2:** Caracterización de copolímeros en dibloque de PEO-*b*-PR.

Copolímero	Rendimiento (%)	$M_{w,GPC}$ ( $\times 10^{-4}$ D)	$M_{n,GPC}$ ( $\times 10^{-4}$ D) <sup>a</sup>	PDI <sup>a</sup>	Unidades de repetición en el bloque de PR <sup>b</sup>	$M_n$ , $^1\text{H RMN}$ ( $\times 10^4$ ) <sup>b</sup>
1	71	1,47	1,36	1,08	61	1,46
2	62	1,91	1,75	1,09	58	1,57
3	71	1,14	1,04	1,10	45	1,46
4	81	1,24	1,04	1,19	51	1,73
5	73	1,41	1,26	1,12	49	1,40
6	65	1,61	1,38	1,17	45	1,38
7	78	1,83	1,40	1,31	49	1,54

<sup>a</sup>Se determinaron el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), promedio en peso ( $M_w$ ) e índice de polidispersidad ( $\text{PDI} = M_w/M_n$ ) por GPC usando THF como eluyente; <sup>b</sup>Determinado por  $^1\text{H RMN}$ .

10 Para introducir el colorante de TMR, se usó AMA en la síntesis de copolímero (**figura 2B**). Síntesis de copolímeros de PEO-*b*-(PR-*r*-AMA) siguió el procedimiento descrito anteriormente. Estos grupos amino primarios se introdujeron en cada cadena polimérica controlando la relación de alimentación del monómero de AMA con respecto al iniciador (relación = 3). Se obtuvieron rendimientos similares y pesos moleculares para estos copolímeros de PEO-*b*-(PR-*r*-AMA). Para la conjugación de TMR, se disolvió en primer lugar PEO-*b*-(PR-*r*-AMA) (50 mg) en 2 ml de DMF. Después, se añadió el éster de NHS-TMR (1,5 equivalentes con respecto a la cantidad molar del grupo amino primario). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos días. Los copolímeros se purificaron por cromatografía de permeación en gel preparativa (columnas PLgel Prep de 10  $\mu\text{m}$  10E3A 300 x 25 mm de Varian, THF como eluyente a 5 ml/min) para retirar las moléculas sin colorante. Los copolímeros de PEO-*b*-(PR-*r*-TMR) producidos se liofilizaron y se mantuvieron a -20 °C para su almacenamiento. En los copolímeros que contienen TMR, el número de unidades de repetición en el bloque de PR era de 70.

### III. Preparación de nanopartículas micelares

20 Las micelas se prepararon siguiendo un procedimiento de evaporación de disolvente como se publicó previamente (Nasongkla et al., Nano. Lett. 2006, 6:2427-2430). En el ejemplo de PEO-*b*-(PDPA-*r*-TMR), se disolvieron en primer lugar 24 mg del copolímero en 1 ml de THF y se añadió gota a gota en 4 ml de agua destilada bajo sonicación. El THF se dejó evaporar durante 4 h por corriente de aire. A continuación se añadió agua destilada para ajustar la concentración de polímero a 4 mg/ml como una solución madre. Después de la formación de micelas, las nanopartículas se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (modelo TEM, JEOL 1200 EX) para determinar el tamaño y morfología de las micelas, dispersión de luz dinámica (DLS, modelo Malvern MicroV, láser de He-Ne,  $\lambda = 632$  nm) para determinar el diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ).

#### Ejemplo 2: Caracterización de nanopartículas micelares activables por pH ajustables.

30 Se caracterizaron nanopartículas micelares sintetizadas para demostrar sus propiedades sensibles al pH tanto para la respuesta al pH en el intervalo fisiológico (5,0-7,4), así como para su respuesta temporal.

#### I. Caracterizaciones de fluorescencia

35 En este estudio, se usó un fluoróforo de TMR conjugado se usó como una baliza de imagen para investigar las propiedades sensibles al pH de las nanopartículas de pHAM. Se usó (poli(óxido de etileno)-*b*-poli(metacrilato de (dimetil-amino)etilo) (PEO-*b*-PDMA, se usó (**1**) como control "siempre activo" donde no se observó ninguna micela ni inactivación de fluorescencia en el intervalo de pH ensayado (4,5-8,0) debido a la fuerte hidrofiliidad del bloque de PDMA. En primer lugar, En primer lugar, se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de nanosondas de pHAM (**3**, **4**, **6**, **7**) y PEO-*b*-(PDMA-*r*-TMR) en un fluorómetro Hitachi (modelo F-7500). Para cada copolímero, la muestra se preparó inicialmente en agua MilliQ a la concentración de 6 mg/ml. Después, la solución madre se diluyó en tampones de fosfato cítrico 0,2 M con diferentes valores de pH. La concentración polimérica terminal se controló

a 0,1 mg/ml. La nanosonda se excitó a 545 nm, y los espectros de emisión se recogieron de 560 a 700 nm. Las ranuras de emisión y excitación fueron ambas de 5 nm.

Para mediciones de la vida útil de la fluorescencia, se midieron los decaimientos de fluorescencia de PEO-*b*-(PDPA-*r*-TMR) (**3**) y PEO-*b*-(PDBA-*r*-TMR) (**4**) (ambos a 0,1 mg/ml). Para la nanosonda **3** ( $pH_t = 6,3$ ), se midió la vida útil a pH = 7,4 y 5,5 (por encima y por debajo del  $pH_t$ , respectivamente) en tampones fosfato sódico/ácido cítrico. De forma similar, para la nanosonda **4** ( $pH_t = 5,4$ ), la vida útil se midió a pH = 7,4 y 4,9. En ambos experimentos, también se midió el colorante de TMR libre (0,005 mg/ml) como un control. Estos estudios se realizaron en un instrumento de vida útil de fluorescencia LaserStrobe (Photon Technology International, Inc., Birmingham, NJ), que consiste en un láser de nitrógeno (GL-3300) ligado a un láser de colorante (GL 302) y un detector estroboscópico. Se usó una solución de colorante C-540A (Exciton, Inc., Dayton, OH) para generar una longitud de onda de excitación de 540 nm. Las curvas de decaimiento se analizaron a la longitud de onda de 570 nm. La ranura de monocromador de emisión fue a 4 nm. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La IRF (función de respuesta del instrumento) se determinó midiendo la luz dispersada de una solución de glucógeno. Los datos de decaimiento de intensidad de fluorescencia se analizaron mediante la función de decaimiento exponencial simple, utilizando el software suministrado con el instrumento PTI.

Las imágenes fluorescentes de una serie de soluciones de nanosonda a diferentes valores de pH ilustran una transición de fluorescencia aguda para cada nanosonda, que ilustra las propiedades sensibles al pH ajustables de las nanosondas de pHAM.

La intensidad de fluorescencia normalizada (NFI) frente a las curvas de pH (**figura 3A**) permitió una evaluación cuantitativa de las propiedades de respuesta al pH de las nanosondas de pHAM. La NFI se calculó como la relación de  $[F - F_{min}] / [F_{max} - F_{min}]$ , donde  $F$  era la intensidad de fluorescencia de la nanosonda a cualquiera pH dado, y  $F_{max}$  y  $F_{min}$  era la intensidad de fluorescencia máxima y mínima en los estados activado/desactivado, respectivamente. La intensidad de emisión a 580 nm se usó para cuantificar la respuesta a ultra-pH para diferentes nanosondas de pHAM como se muestra en la **figura 3A**. Para cuantificar la nitidez en la respuesta al pH,  $\Delta pH_{10-90\%}$ , se evaluó el intervalo de pH en el que el valor de NFI varía del 10 % al 90 %, para todas las nanosondas de pHAM. Los valores de nitidez fueron 0,21, 0,23, 0,24 y 0,20 unidades de pH para las nanosondas **4**, **6**, **3** y **7**, respectivamente.

Los valores pequeños de  $\Delta pH_{10-90\%}$  indican una notable sensibilidad al pH ya que representa un cambio <2 veces en la concentración de protones (es decir,  $[H^+]_{10\%} / [H^+]_{90\%} = 10^{\Delta pH_{10-90\%}}$ ). En comparación, para los colorantes moleculares pequeños (Urano, y col., Nat. Med. 2009, 15:104-109), el valor de nitidez es 2 unidades de pH (100 veces en  $[H^+]$ ) para el mismo grado de cambio de emisión, coherente con la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Atkins & De Paula, Physical Chemistry, Oxford University Press, 2009). Además de la nitidez del pH, la relación de  $F_{max}$  y  $F_{min}$  ( $R_F = F_{max} / F_{min}$ ) también se midió para cuantificar la respuesta de la fluorescencia entre los estados activado/desactivado. Los valores de  $R_F$  varían de 10 a 55 veces (**Tabla 3**), lo que demuestra la gran respuesta a la fluorescencia de las nanosondas. De acuerdo con la disminución de la intensidad de emisión en las micelas, los datos demostraron que el estado excitado de TMR tenía una vida útil mucho más corto (por ejemplo, 0,44 ns para la nanosonda **3**, en las micelas (pH = 7,4) que el colorante libre (1,97 ns) a pH 7,4 o los unímeros desensamblados a pH 5,5 (1,84 ns).

**Tabla 3:** Caracterización de las nanosondas de PEO-*b*-(PR-*r*-TMR).

Copolímero	pK a <sup>a</sup>		CMC <sup>b</sup> (mg/ ml)	Dh (nm) <sup>c</sup>	R <sub>F</sub> (F <sub>max</sub> /F <sub>min</sub> ) <sup>d</sup>	ΔpH <sub>10-90 %</sub>	τ <sub>1/2</sub> (ms) <sup>e</sup>
	Monómero	Polímero					
<b>1</b>	8,4	7,4	--	--	1,0	--	--
<b>2</b>	9,2	7,4	--	--	1,8	--	--
<b>3</b>	8,5	6,3	0,001	41	55	0,20	3,2 ± 0,1
<b>4</b>	6,9	5,1	0,003	43	20	0,17	3,9 ± 0,1 <sup>f</sup>
<b>5</b>	9,1	7,6	--	--	--	--	--
<b>6</b>	8,9	6,9	0,004	39	10	0,17	2,7 ± 0,1
<b>7</b>	8,6	6,7	0,003	38	23	0,23	3,0 ± 0,2

<sup>a</sup>Determinado por experimentos de titulación de pH. <sup>b</sup>Determinado por la relación  $I_1/I_3$  de la sonda de pireno a pH 7,4; <sup>c</sup>Determinado por DLS a una concentración de copolímero de 1 mg/ml y pH = 7,4; <sup>d</sup>Determinado por intensidad de emisión de fluorescencia de rodamina; <sup>e</sup>Determinado por medición de flujo detenido mezclando 20 μl de una solución polimérica de 5 mg/ml con 80 μl de tampón fosfato a pH 5,5; <sup>f</sup>se usó tampón de pH = 4,9 para representar el bajo valor de  $pH_t$  de **4** (5,4).

En resumen, las nanopartículas micelares activables por pH demuestran afinidad y respuesta al pH ultra sensibles en el intervalo fisiológico (pH 5,0-7,4), grandes aumentos en la intensidad de emisión entre los estados activado/desactivado (hasta 55 veces), y solamente requieren  $<0,25$  de pH para la activación.

## II. Respuesta temporal al pH

5 Este estudio usó medidas de flujo detenido para calibrar la activación de fluorescencia en nanopartículas micelares activadas por el pH sintetizadas. Las mediciones de flujo detenido de nanosondas de pHAM se realizaron usando un instrumento Bio-Logic SFM-3. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente a diferentes valores de pH en el tampón fosfato sódico/ácido cítrico. Se utilizó un monocromador para la excitación a 540 nm y se registró la intensidad de fluorescencia a 570 nm de paso largo. Los experimentos se controlaron mediante el software BioKine 16 V 3.03 y tuvieron un tiempo muerto estimado de 1,5 ms.

10 Los experimentos de flujo detenido mostraron que la activación de la fluorescencia era muy rápida, con la mayoría de las nanosondas completamente activadas en 5 ms a pH más bajo (por ejemplo,  $\tau_{1/2} = 3,7$  ms para **4**, **figura 3B**). La respuesta al pH ultra-sensible se observó solamente con las nanosondas **4**, **3**, **7** y **6**. Los valores de pH de transición de fluorescencia (pH<sub>t</sub>, el pH al que  $F = 0,5 \times (F_{\text{máx}} + F_{\text{mín}})$ ) fueron 5,4, 6,3, 6,8 y 7,2 para las nanosondas **4**, **3**, **7** y **6**, respectivamente (**figura 3A**). Los otros copolímeros no mostraron ninguna respuesta de pH (por ejemplo, **1**) o solo respuestas al pH amplias (por ejemplo, **2**, **5**, datos no mostrados).

En resumen, los experimentos de flujo detenido demostraron que las nanopartículas micelares activables por pH tienen una respuesta temporal rápida en el intervalo de menos de 5 ms.

## 20 III. Curvas de titulación de pH de copolímeros y monómeros constituyentes y análisis posterior de espectros de RMN <sup>1</sup>H

Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la micelización hidrófoba es la fuerza motriz de las propiedades de respuesta a ultra-pH de pHAM, y es necesario un umbral crítico de hidrofobicidad en el segmento de PR para lograr la respuesta cooperativa. Para probar esta hipótesis, se compararon las curvas de titulación de pH de dos copolímeros en bloque representativos, **5** y **7**, y sus correspondientes monómeros (**figura 4A**).

25 En un procedimiento típico, se disolvió primero un copolímero de PEO-*b*-PR o su correspondiente monómero en HCl 0,1 N para alcanzar la concentración final de 5-10 mg/ml. La titulación del pH se realizó añadiendo pequeños volúmenes (aumentos de 50-100  $\mu$ l) de una solución 0,1 N de NaOH bajo agitación. El aumento de pH en el intervalo de 2 a 11 se controló en función del volumen total añadido de NaOH (NaOH). Los valores de pH se midieron usando un medidor de pH Mettler Toledo con un microelectrodo. La **figura 4A** muestra las curvas de titulación representativas para los copolímeros de PEO-*b*-PR cíclicos (**5** y **7**) y los monómeros correspondientes. Para cada muestra, el valor de pKa se calculó como el pH en el centro de los dos puntos de equivalencia en la curva de titulación. Los valores de pKa para todos los copolímeros de PEO-*b*-PR y los monómeros correspondientes se enumeraron en la **Tabla 3**.

35 Ambos monómeros se comportaron como pequeñas moléculas ionizables con amplias respuestas al pH sobre volúmenes añadidos de NaOH. El copolímero **5** mostró una amplia respuesta al pH similar. Por el contrario, el copolímero **7** tenía una transición de pH específicamente aguda, demostrando una capacidad de tampón enormemente aumentada. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN deuterados de **5** y **7** en diferentes estados de ionización de aminas terciarias ( $[R_3NH^+]/[R_3N]_0$ ) apoyan adicionalmente la hipótesis (**figura 4B**). El segmento de PEO no cambió su intensidad máxima y se usó como un patrón interno. A lo largo de los estados de ionización, los picos de resonancia de protones para el segmento de PR de **5** se visualizaron fácilmente, aunque la intensidad de pico disminuyó con una anchura de pico ampliada a pH más alto, reflejando el comportamiento de la agregación en masa del copolímero. Para **7**, el estado neutro del copolímero (es decir, 0 %) condujo a picos de resonancia completamente suprimidos en el segmento de PR debido a la formación de núcleos micelares altamente compactos. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) de **7** en una solución acuosa demostró la formación de micelas por encima de su pKa (6,7) a pH 7,4 y una disociación completa de micelas a pH 5,5 (**figura 4C**). En comparación, no se formó ninguna micela a partir de **5** a ningún pH (datos no mostrados).

45 En resumen, estos datos sugirieron que la micelización hidrófoba fue la principal fuerza motriz para el comportamiento de desprotonación cooperativa observada de los grupos amonio en **7**.

## IV. Medición de concentración micelar crítica (CMC) de copolímeros en dibloque de PEO-*b*-PR

50 La CMC de cada copolímero de PEO-*b*-PR se midió en el tampón fosfato sódico 0,2 M a pH 7,4. En primer lugar, se diluyó una solución madre copolimérica (3 mg/ml) a diferentes concentraciones en el mismo tampón. En cada solución, se añadieron 5  $\mu$ l de pireno en una solución de THF ( $2 \times 10^{-4}$  mol/l) a 2 ml de solución polimérica para producir la concentración de pireno final a  $5 \times 10^{-7}$  mol/l. Los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorómetro Hitachi (modelo F-7500) con la longitud de onda de excitación de 339 nm y las ranuras de excitación y emisión a 10,0 nm y 1,0 nm, respectivamente. Los valores de  $I_1$  e  $I_3$  se midieron como la intensidad máxima de emisión a aprox. 372 y 382 nm, respectivamente. La relación  $I_1/I_3$  se representó en función de la concentración de polímero a diferentes valores de pH. La relación  $I_1/I_3$  refleja la polaridad del entorno de pireno, donde el reparto de

pireno en el núcleo de micelas hidrófobas conduce a un descenso de los valores de  $I_1/I_3$  (Kalyanasundaram et al., J. Am. Chem. Soc. 1977, 99:2039-2044; Winnik, Chem. Rev. 1993, 93:587-614). Los valores de CMC se midieron como la concentración umbral de polímero a la que se formaron micelas en una solución. Para evitar la interferencia de TMR, se usaron copolímeros de PEO-*b*-PR sin conjugación de TMR en estos estudios. Los valores de CMC a pH 7,4 se enumeraron en la **Tabla 3**.

**Ejemplo 3:** Ubicación y mecanismo de activación de pHAM intracelular (nanosondas de TMR).

#### I. Microscopía de barrido láser confocal en células de carcinoma de pulmón humanas

Para investigar las activaciones intracelulares de pHAM, la nanosonda **3** en células humanas de cáncer de pulmón H2009 se examinó mediante microscopía de barrido por láser confocal y la activación de nanosondas de pHAM en células H2009 se cuantificó por intensidad de fluorescencia relativa (**figura 5**).

Las células H2009 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, CA) complementado con suero fetal bovino al 5 % (FBS), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Para los estudios de tráfico y localización subcelular, las células H2009 se transfectaron con baculovirus usando los kits de endosomas-GFP de Organelle Lights™ y lisosomas-GFP BacMam 1.0 (Molecular Probes, OR) para etiquetado con Rab5a (marcador de endosoma temprano) y Lamp1 (marcador de endosoma tardío/lisosoma), respectivamente. Las células se cultivaron luego en medio de crecimiento para un análisis posterior. Para estudios de imagen confocal de la captación de micelas y la activación intracelular, las células H2009 se pusieron en placas de fondo de vidrio (MatTek, MA) en 2 ml de medio RPMI completo y se incubaron con la nanosonda **3** a una concentración de polímero de 0,2 mg/ml a pH 7,4. Las imágenes confocales se capturaron a 0, 15, 30, 45 y 60 min después de la adición de micelas. Después de 60 min de incubación, se añadió una solución 0,1 N de HCl (250 µl) en medio para acidificar el pH medio a 5,0 y las células se sometieron a estudios de imagen inmediatamente.

Las imágenes se analizaron usando el software Image-J. Se presentaron cinco medidas independientes como la media ± desviación estándar. Para los experimentos de colocalización, las células transfectadas que expresaban Rab5a-GFP o Lamp1-GFP se sembraron en placas de fondo de vidrio en 2 ml de medio RPMI completo sin rojo de fenol. Después de 24 h de crecimiento celular, se añadieron 0,4 mg de la nanosonda **3** o **4** (5 mg/ml de solución de copolímero) en PBS (pH 7,4) en medio para dar una concentración final de polímero de 0,2 mg/ml. Las imágenes se capturaron en los puntos de tiempo designados por un microscopio confocal Nikon ECLIPSE TE2000-E con una lente objetivo de 100 x. Se excitaron GFP y TMR a 488 y 543 nm, respectivamente. Las longitudes de onda de emisión de GFP y TMR fueron 515 y 595 nm, respectivamente.

Debido a que las nanosondas de pHAM son "silenciosas" a pH neutro, se aplicaron directamente en el medio de cultivo y se monitorizó la cinética de su internalización sin necesidad de retirar el medio. Justo después de la adición de la nanosonda, ni las células H2009 ni el medio mostraron señal de fluorescencia observable. A los 15 minutos, aparecieron puntos fluorescentes puntuados dentro de las células. El número de puntos fluorescentes aumentó con el tiempo. La relación señal/ruido de las células H2009 (( $SNR_{Célula}$ , usando intensidad de fluorescencia en el tiempo 0 como el ruido de fondo) permitió una cuantificación adicional del aumento de la captación y la activación de la nanosonda en el tiempo. A los 60 min, se observó un aumento de 31 veces en  $SNR_{Célula}$  ( $2,14 \pm 0,17 \times 10^3$ ) sobre el medio ( $SNR_{Med} = 69,3 \pm 9,1$   $P < 0,001$ ) donde la mayor parte de las nanosondas estaban aún presentes (**figura 5A**). A continuación se añadió una solución 0,1 N de HCl para acidificar el pH medio a 5,0 y se encontró un aumento considerable de la intensidad de fluorescencia en el medio de fondo. Se observó una tendencia inversa de contraste de fluorescencia, donde  $SNR_{Célula}$  era un 74 % de  $SNR_{Med}$  ( $P < 0,05$ ) (**figura 5B**).

Estos datos ilustran que las nanosondas de pHAM pueden aumentar drásticamente la sensibilidad al contraste de las células cancerosas en comparación con las nanosondas potencialmente siempre activadas (como en el caso después de añadir HCl).

#### II. Activación de pHAM en organelos endocíticos en células de cáncer de pulmón humanas

Para investigar adicionalmente si los diferentes organelos endocíticos pueden activar selectivamente pHAM, las células H2009 se transfectaron con los biomarcadores Rab5a y Lamp I condensados con proteína verde fluorescente (GFP) en endosomas tempranos y endosomas tardíos/lisosomas, respectivamente. respectivamente.

Las células H2009 se pusieron en placas de fondo de vidrio (MatTek, MA) en 2 ml de medio RPMI completo y se incubaron con la nanosonda **3** a una concentración de polímero de 0,2 mg/ml a pH 7,4. Las imágenes confocales se capturaron a 0, 15, 30, 45 y 60 min después de la adición de micelas. Después de 60 min de incubación, se añadió una solución 0,1 N de HCl (250 µl) en medio para acidificar el pH medio a 5,0 y las células se sometieron a estudios de imagen inmediatamente. Las imágenes se analizaron usando el software Image-J. Se presentaron cinco medidas independientes como la media ± desviación estándar. Para los experimentos de colocalización, las células transfectadas que expresaban Rab5a-GFP o Lamp1-GFP se sembraron en placas de fondo de vidrio en 2 ml de medio RPMI completo sin rojo de fenol. Después de 24 h de crecimiento celular, se añadieron 0,4 mg de la nanosonda **3** o **4** (5 mg/ml de solución de copolímero) en PBS (pH 7,4) en medio para dar una concentración final de polímero de 0,2 mg/ml. Las imágenes se capturaron en los puntos de tiempo designados por un microscopio confocal Nikon ECLIPSE TE2000-E con una lente objetivo de 100 x. Se excitaron GFP y TMR a 488 y 543 nm,

respectivamente. Las longitudes de onda de emisión de GFP y TMR fueron 515 y 595 nm, respectivamente. Para experimentos sobre la inhibición de la acidificación de lisosomas con bafilomicina A1 y su efecto sobre la activación intracelular de las nanopartículas **3** y **4**, las células H2009 transfectadas que expresaban Lamp 1-GFP se añadieron por pipeteo en placas de fondo de vidrio en 2 ml de medio RPMI 1640 completo sin rojo de fenol. Después de 24 h de crecimiento celular, el medio se reemplazó con medio recién preparado que contenía bafilomicina A1 (concentración final = 1  $\mu$ M) y las células se incubaron a 37 °C durante 1 h. A continuación, se añadieron 0,4 mg de la nanopartícula **3** o **4** en PBS (pH 7,4) en medio para dar una concentración final de polímero de 0,2 mg/ml. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h, las células se obtuvieron en imágenes por un microscopio confocal Nikon ECLIPSE TE2000-E con una lente objetivo de 100 x. Se excitaron GFP y TMR a 488 y 543 nm, respectivamente. Las longitudes de onda de emisión de GFP y TMR fueron 515 y 595 nm, respectivamente. Después de las imágenes capturadas, el medio se reemplazó por medio recién preparado. Las células se incubaron a 37 °C durante 5 h, seguido de análisis de microscopía confocal.

Dos nanopartículas de pHAM (**3** y **4** con pHi de 6,3 y 5,4, respectivamente) con células H2009 y se usó formación de imágenes confocal para examinar las ubicaciones subcelulares para la activación de pHAM. Las células H2009 (N = 30-50) con 20 o más puntos colocalizados (es decir, pHAM activado dentro de endosomas tempranos o lisosomas) se identificaron como positivas y se cuantificó el porcentaje (**figura 6A y 6B**). Para la nanopartícula **3**, el 80 % de las células fueron positivas en la colocalización con endosomas tempranos a los 30 minutos, mientras que solo el 12 % se colocalizó con endosomas tardíos/lisosomas. Con el tiempo, la colocalización de **3** activada disminuyó con los endosomas tempranos, pero aumentó con los endosomas tardíos/lisosomas (**figura 6A**). Por el contrario, la nanopartícula **4** (pHi = 5,4) mostró un patrón diferente de localización subcelular para la activación. En todo momento, se encontró menos del 10 % de células positivas con la colocalización de endosomas tempranos. En su lugar, casi todas las nanopartículas activadas **4** se colocalizaron con endosomas tardíos/lisosomas (**figura 6B**). La **figura 6C** y la **figura 6D** representan los diferentes procesos de captación intracelular y la activación de las dos nanopartículas. La nanopartícula **3** puede activarse rápidamente en el interior de los endosomas tempranos con mayor pH vesicular (5,9-6,2) (Casey et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11:50-61; Modi et al., Nat. Nanotech. 2009, 4:325-330) y la activación se mantiene a medida que las nanopartículas circulan en los endosomas tardíos/lisosomas. Por el contrario, la nanopartícula **4** se activa casi exclusivamente en el interior de los endosomas tardíos/lisosomas con menor pH vesicular (5,0-5,5) (Casey et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11:50-61; Modi et al., Nat. Nanotech. 2009, 4:325-330). También se encontraron resultados similares con células endoteliales tumorales de SLK humanas (datos no mostrados).

Estos datos demuestran la viabilidad de dirigir pequeñas diferencias en el pH vesicular dentro de diferentes organelos endocíticos por las nanopartículas de pHAM.

Para verificar el mecanismo de activación intracelular de pHAM, se incubaron células H2009 con bafilomicina A1 durante 1 h y después se añadió la nanopartícula **3**. La bafilomicina es un inhibidor específico de H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo vacuolar (V-ATPasa; Gagliardi et al., Curr. Med. Chem. 1999, 6:1197-1212.), que es responsable del bombeo de protones a través de las membranas plasmáticas y la acidificación de organelos intracelulares (por ejemplo, lisosomas). Los datos muestran que en presencia de bafilomicina A1, la nanopartícula **3** no se activó como se indica por la ausencia de fluorescencia de TMR. Después de la eliminación de bafilomicina A1 y **3** en el medio de cultivo, la activación de **3** surgió con colocalización de la fluorescencia de TMR con lisosomas marcados con lamp 1-GFP. También se encontraron resultados similares con la nanopartícula **4** en células H2009.

Estos experimentos demostraron que las nanopartículas sintetizadas están "silenciadas" en el medio a pH 7,4, pero pueden activarse tras la captación en las células. Además, las nanopartículas con transiciones de pH a 6,3 y 5,4 pueden activarse selectivamente en diferentes compartimentos endocíticos tales como endosomas tempranos (pH 5,9-6,2) y lisosomas (5,0-5,5). Estos datos demuestran la viabilidad de dirigir pequeñas diferencias en el pH vesicular dentro de diferentes organelos endocíticos por las nanopartículas de pHAM.

#### **Ejemplo 4:** Encapsulación quimioterapéutica de partículas de pHAM.

Este estudio buscó demostrar que las nanopartículas de pHAM podrían encapsular un alto porcentaje de productos quimioterapéuticos y posteriormente liberarlo rápidamente al exponerse a un entorno ácido similar al observado en las células tumorales.

##### I. Encapsulación de doxorubicina en micelas

Se sintetizó PEO-*b*-PC6A como anteriormente (véase, el Ejemplo 1 (I e II)). Se consiguió la encapsulación de doxorubicina en micelas disolviendo en primer lugar doxorubicina y PEO-*b*-PC6A en agua y ácido clorhídrico. Después, esta solución se añadió gota a gota en una solución de tampón 0,1 M a pH 9 en sonicación.

Usando este procedimiento, se obtuvieron porcentajes de carga de doxorubicina entre el 5 y el 6 por ciento de una carga teórica del 10 por ciento. La carga de fármaco se calculó disolviendo micelas encapsuladas en doxorubicina en cloroformo y después se midió la absorbancia UV-vis.

##### II. Liberación de doxorubicina tras la exposición a entornos ácidos

Los experimentos de liberación de doxorubicina se realizaron midiendo la intensidad de fluorescencia en diferentes puntos temporales de las micelas cargadas con doxorubicina en diversos entornos de pH. En primer lugar, se mezclaron 125  $\mu$ l de micelas cargadas con doxorubicina con 175  $\mu$ l de agua en una cubeta, y se tomó un espectro de fluorescencia inicial. Después, se añadieron 10-20  $\mu$ l de tampón de pH 5 M a la cubeta para medir la liberación de doxorubicina con el tiempo. La concentración de fármaco se calculó en base a las curvas de calibración de fluorescencia de doxorubicina libre en agua y tampón de pH. A concentraciones bajas (<0,025 mg/ml), la intensidad y la concentración de fluorescencia son directamente proporcionales. La inactivación por fluorescencia se produce a concentraciones más altas.

El estudio de liberación muestra que la doxorubicina se libera rápidamente de las micelas a pH 5,0 y que las micelas a pH 7,4 son relativamente estables. A pH 5,0, las micelas liberan rápidamente doxorubicina en las primeras dos horas y después, la liberación es muy lenta. A pH 7,4, la doxorubicina se libera lentamente de las micelas después de varias horas, pero la mayoría del fármaco permanece encapsulado (**figura 7**). A concentraciones bajas (<0,025 mg/ml), la intensidad y la concentración de fluorescencia son directamente proporcionales. La inactivación por fluorescencia se produce a concentraciones más altas.

Este estudio demostró que las micelas poliméricas pueden encapsular un alto porcentaje de doxorubicina (~6 %) y que los polímeros que están protonados en condiciones ácidas pueden disociarse mucho más rápido que los polímeros que se someten a hidrólisis a bajos valores de pH. Los estudios de liberación mostraron que las micelas pueden liberar rápidamente doxorubicina a pH 5,0, con la mayoría del fármaco liberado en las primeras dos horas.

### III. Encapsulación de paclitaxel en micelas

Las micelas cargadas con paclitaxel se prepararon de acuerdo con un procedimiento previamente publicado. En resumen, se disolvieron 20 mg de MeO-PEO5k-PDPA25k y 2 mg de paclitaxel en 1 ml de THF. Después, la mezcla se añadió rápidamente en 10 ml de agua Milli-Q bajo sonicación. La mezcla se ultrafiltró durante más de 6 veces para eliminar el THF usando el sistema de micro-ultrafiltración. La solución micelar resultante se puso a temperatura ambiente durante 4 horas y se filtró a través de una membrana de celulosa de 0,45  $\mu$ m para eliminar cualquier precipitado en solución de micelas. El contenido de carga de paclitaxel en micelas poliméricas se determinó por desintegración de las micelas en acetonitrilo. La concentración de paclitaxel se determinó por HPLC usando una columna de fase inversa C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm) con una fase móvil que consistía en acetonitrilo al 34 % y agua al 66 % a 227 nm al caudal de 1 ml/min. El contenido de paclitaxel en micelas de MeO-PEO5k-PDPA25k era del 8,3  $\pm$  0,6 %.

**Ejemplo 5:** Generación de fluoróforos de pHAM-NIR que comprenden cipato para la formación de imágenes de angiogénesis tumoral.

#### I. Síntesis de NIR-pHAM

Se sintetizaron ésteres de cipato-NHS (un colorante NIR) siguiendo procedimientos publicados (**figura 8**; Lopalco, et al., Org. Biomol. Chem., 2009, 7:856-859; Ye et al., Bioconjug. Chem, 2007, 19:225-234). La **figura 8** muestra un esquema sintético representativo de copolímeros de NIR-NHS y PEO-*b*-(PR-*r*-NIR). La reacción de 1,2,2-trimetil-1H-benz[e]indol (**A**) con ácido 3-bromopropoico en 1,2-diclorobenceno a 110 °C produjo **B**. La reacción adicional de **B** con monoclóhidrato de malonaldehído bis(fenilimina) (n = 1) o monoclóhidrato de glutaconaldehído dianilo (n = 2) produjo los fluoróforos NIR correspondientes (C). El tratamiento de C con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF seca produjo el éster NIR-NHS. Finalmente, el PEO-*b*-(PR-*r*-NIR) se sintetizó a través de la conjugación de NIR-NHS sobre los copolímeros en bloque que portan los grupos amino primarios. En los copolímeros que contienen cipato, el número de unidades de repetición en el bloque de PR era de 70. Después de las síntesis, los polímeros se sintetizaron completamente por cromatografía de permeación en gel, <sup>1</sup>H RMN, y espectroscopía de fluorescencia. Los análogos útiles con diferentes longitudes de onda de excitación/emisión (por ejemplo,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  = 678/704 nm cuando n = 1;  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  = 781/808 nm cuando n = 2) se produjeron posteriormente.

#### II. Optimización de fluoróforos de NIR-pHAM

Estudios preliminares sobre TMR-pHAM muestran que la longitud de PR y el número de TMR pueden afectar a la respuesta al ultra-pH. Una longitud adecuada de PR puede proporcionar una micelización cooperativa y afecta directamente a la respuesta al pH, es decir,  $\Delta pH_{10-90}$  %. La densidad de TMR puede controlar la respuesta a la fluorescencia. Por ejemplo, se consiguió una  $F_{m\acute{a}x}/F_{m\acute{i}n}$  óptima de 55 para la nanosonda de TMR **3** a y = 3 sin la inactivación de fluorescencia intramolecular observable en el estado activado. En comparación, en y = 1, únicamente se obtuvo una  $F_{m\acute{a}x}/F_{m\acute{i}n}$  de 10 (datos no mostrados).

Para el desarrollo de NIR-pHAM, se mantiene la longitud de PR (70) para investigar la densidad NIR óptima por cadena polimérica. Se anticipa que diferentes fluoróforos (es decir, cipato frente a TMR) tienen diferentes efectos de inactivación por homoFRET y PET, que pueden afectar a la composición de pHAM óptima. Para cuantificar las contribuciones de homoFRET y PET, se mezcla un polímero conjugado con NIR con el polímero libre de NIR y se varían sistemáticamente las relaciones molares del polímero conjugado con NIR. La extrapolación del coeficiente de inactivación con respecto a un colorante NIR por micela permite la cuantificación de la contribución del PET. La

densidad del cipato (por ejemplo,  $y = 1, 3, 6$ ) en el segmento de RP se aumenta entonces sistemáticamente. La eficiencia de inactivación se mide y se correlaciona con el modelo homoFRET (Lakowicz (ed.), Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3ª edición, 443-475 (Springer, New York City; 2006), que es inversamente proporcional a  $r^6$  ( $r$  es la distancia entre los pares de colorante en el núcleo micelar).

- 5 Se sintetiza entonces un conjunto ajustable de nanosondas de NIR-pHAM (es decir, las nanosondas **3, 4, 6, 7**, donde TMR se reemplaza con el colorante de NIR) con transiciones de pH a 5,4, 6,3, 6,8 y 7,2, respectivamente. Pueden producirse ligeras variaciones del pH<sub>T</sub> cuando se usa un colorante diferente (por ejemplo, cipato). Después de la síntesis de NIR-pHAM, se miden las respuestas al pH y la fluorescencia (por ejemplo, pH<sub>T</sub>,  $\Delta\text{pH}_{10-90}\%$ ,  $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$ , como se ha descrito previamente), el tamaño del artículo (TEM y DLS), la concentración micelar crítica y la vida útil de fluorescencia.

#### Ejemplo 6: Desarrollo de cRGDfK-pHAM dirigido a la vasculatura.

Este estudio demuestra el desarrollo de cRGDfK-pHAM para dirigir las nanopartículas de micelas poliméricas sensibles al pH a la vasculatura de tumores. El ligando peptídico pequeño cRGDfK (cRGD) se dirige específicamente a las integrinas  $\alpha\beta3$  (CD61) que se sobreexpresan en células endoteliales tumorales angiogénicas.

- 15 Se usó la química de tiol-maleimida para la conjugación de ligandos en la superficie de pHAM (figura 9). Se mezcló MAL-PEO-*b*-PR con PEO-*b*-(PR-*r*-NIR) a una relación molar del 10 % en moles de MAL-PEO-*b*-PR. Después de la formación de las micelas, los péptidos cRGD-SH se conjugaron a través de un enlace tiol-maleimida. La conjugación peptídica se controló por la desaparición del grupo maleimida (6,7 ppm) y la formación del grupo aromático (7,0-7,5 ppm) de D-Phe en el cRGDfK por  $^1\text{H}$  RMN. El análisis de aminoácidos se utilizó además para cuantificar la densidad peptídica en la superficie de las nanosondas de pHAM (Khemtong, et al., Cancer Res., 2009, 69:1651-1658). Se usó TEM y DLS para examinar la funcionalización del ligando sobre el tamaño y morfología de las partículas, y se usó la espectrofotometría de fluorescencia para verificar las propiedades de fluorescencia sensibles al pH de pHAM. La microscopía confocal de barrido láser fue la principal herramienta para examinar la cinética de la captación celular y la activación intracelular del pHAM dirigido.

- 25 En estos estudios se utilizaron células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC). Esta línea celular es bien aceptada como un modelo de cultivo celular *in vitro* para células endoteliales angiogénicas y la integrina  $\alpha\beta3$  se sobreexpresa en células HUVEC (Ellis et al., J. Vasc. Res., 2003, 40:234-243; Vag et al., Contrast Media Mol. Imaging, 2009, 4:192-198). La **figura 10** muestra la especificidad de contraste de pHAM PEG-*b*-(PDPA-*r*-NIR) codificado por cRGD (transición de pH = 6,3) en células HUVEC. La densidad superficial de cRGD/cRAD se controló en un 20 % en moles. Para examinar la especificidad de  $\alpha\beta3$ , se usaron como controles pHAM codificado por cRAD y el bloque de cRGD libre + pHAM codificado por cRGD. Las células HUVEC se cultivaron en medio EGM antes de la incubación de diferentes muestras de pHAM (concentración de polímero: 0,2 mg/ml) durante 3 horas. En el control en bloque de cRGD, se incubaron conjuntamente 20 moles de exceso de péptidos de cRGD libres con cRGD-pHAM para competir por la unión de  $\alpha\beta3$ . Debido a que el pHAM es silencioso a pH medio, la activación de pHAM dentro de las células HUVEC se puede visualizar directamente sin necesidad de eliminar el medio.

- Los datos demostraron que después de la incubación celular, cRGD-pHAM mostró una intensidad de fluorescencia espectacularmente aumentada dentro de células HUVEC. En comparación, los controles en bloque de cRAD-pHAM y cRGD mostraron pequeñas señales de fluorescencia. Los análisis de ROI de diferentes células HUVEC mostraron que la intensidad de fluorescencia media era de  $15,2 \pm 3,5$ ,  $1,4 \pm 0,2$ ,  $1,5 \pm 0,2$  para control en bloque de cRGD-pHAM, cRAD-pHAM y cRGD, respectivamente (**figura 10A**). La fluorescencia para el medio de fondo de similar tamaño ROI fue  $0,56 \pm 0,09$ . El medio de cultivo se utilizó como el ruido de fondo para calcular la relación de contraste-ruido ( $\text{CNR} = (F_{\text{pHAM}} - F_{\text{med}})/F_{\text{med}}$ , donde  $F_{\text{pHAM}}$  y  $F_{\text{med}}$  son la intensidad de fluorescencia de la muestra de pHAM y el medio, respectivamente) para diferentes condiciones de pHAM. Los valores de CNR fueron  $26,1 \pm 6,2$ ,  $1,5 \pm 0,4$  y  $1,6 \pm 0,4$  para el control en bloque de cRGD-pHAM, cRAD-pHAM, y cRGD, respectivamente (**figura 10B**). Cabe mencionar que se observó un aumento de >10 veces en CNR para cRGD-pHAM en los dos controles, indicando el direccionamiento específico de  $\alpha\beta3$  ( $P < 0,01$ ). En particular, este contraste se observó en presencia de una alta concentración (0,2 mg/ml) de nanosondas de pHAM "silenciosas" en el medio de cultivo celular.

- Ejemplo 7:** Evaluación de la especificidad y eficacia de pHAM dirigido en la formación de imágenes de biomarcadores de la angiogénesis distintos en ratones portadores de tumores *in vivo*.

#### I. Activación de pHAM en la vasculatura tumoral

Dado que TMR tiene cortas longitudes de onda de excitación/emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 540$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 580$  nm), estos estudios usaron nanopartículas de pHAM conjugadas con TMR y codificadas por cRGD para demostrar la activación de pHAM en la vasculatura tumoral.

- 55 Se usaron ratones sin pelo atómicos portadores de xenoinjertos de tumor A549 ( $100\text{-}200$  mm<sup>3</sup>,  $n = 3$  para cada grupo) en estos estudios. Se usaron las nanosondas de pHAM PEG-*b*-(PDPA-*r*-TMR) codificadas con cRGD y cRAD con una densidad superficial del 20 % en moles. Se inyectaron nanosondas a  $14$   $\mu\text{mol}$ /kg de dosis a través de la vena de la cola y los animales se sacrificaron 3 h después de la inyección de pHAM. Se retiraron diversos

órganos, se pusieron en una placa de Petri y se formaron imágenes mediante IVIS Spectrum.

Las señales de TMR de los órganos explantados y los tejidos tumorales de TMR-pHAM codificados con cRAD y codificados con cRGD pueden observarse directamente mediante un instrumento de formación de imágenes de fluorescencia Maestro con idénticas condiciones de formación de imágenes. A pesar de la limitada penetración en el tejido de TMR, el tumor de pHAM codificado con cRGD mostró claramente una intensidad de fluorescencia más alta que la de pHAM codificado con cRAD, así como los tejidos musculares adyacentes. En ambos grupos, las gotas de sangre no mostraron ninguna señal de fluorescencia, demostrando el efecto pretendido de supresión de fondo de pHAM en sangre. Mientras tanto, el hígado parecía ser el órgano principal que tomaba ambas formulaciones de pHAM, en consonancia con la depuración de RES de partículas nanodimensionadas (Moghimi, et al., Pharmacol. Rev., 2001,53:283-318).

Después de la formación de imágenes *ex vivo*, los tejidos tumorales se congelaron y seccionaron en 8  $\mu\text{m}$ . Las imágenes confocales de los tejidos tumorales mostraron un notable aumento de la intensidad de fluorescencia en un tumor tratado con cRGD-pHAM diferente del control de cRAD-pHAM. Para verificar la localización de la activación de pHAM, las secciones tumorales se tiñeron primero con mAb anti-ratón primario de rata contra PECAM (CD31), seguido de lavado y tinción con anticuerpo secundario anti-rata conjugado con Delight 488. Las imágenes de superposición muestran que la mayoría de la activación de pHAM se co-localizó con la tinción de la vasculatura, indicando el direccionamiento activo y la activación de pHAM codificado por cRGD en la vasculatura del tumor. Este estudio demuestra la viabilidad del direccionamiento a los biomarcadores de la angiogénesis específicos (es decir,  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ) por pHAM codificado por cRGD en ratones portadores de tumor. Para superar la corta penetración del tejido del colorante de TMR, se pueden usar nanosondas de NIR-pHAM (por ejemplo, cipato,  $\lambda\text{ex}/\lambda\text{em} = 781/808 \text{ nm}$  cuando  $n = 2$ ) para estudios animales adicionales *in vivo*.

## II. Evaluación de las nanosondas de NIR-pHAM dirigidas con valores de pHT óptimos

Se investiga la influencia de pHT sobre la especificidad de imagen de biomarcadores de la angiogénesis. En esta serie de experimentos, se usa NIR-pHAM codificado por cRGD como sistema modelo y NIR-pHAM codificado por cRAD como control. Se evalúan las nanosondas de PEG-*b*-PDPA conjugadas con NIR (pHT = 5,4), PEG-*b*-PDPA (6.3), o PEO-*b*-PC7A (6,8). Las nanosondas de cRGD-pHAM con mayores valores de pHT (por ejemplo, 6,8) pueden conducir a un tiempo de respuesta de fluorescencia más rápido dentro de endosomas de fase temprana. Sin embargo, también puede ser más susceptible de ser "activadas" por otros mecanismos no relacionados con  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , tales como el pH ácido en el microentorno tumoral. Por el contrario, cRGD-pHAM con valores de pHT más bajos (por ejemplo, 5,4) se puede activar más específicamente a través de la endocitosis mediada por  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ; sin embargo, puede tardar más tiempo en activarse en células endoteliales angiogénicas.

En esta serie de experimentos, se inyectan los NIR-pHAM codificados con cRGD y cRAD con diferentes pHT a través de las venas de la cola de ratones portadores de tumor A549. La intensidad de fluorescencia de tumores y otros órganos se registran con el tiempo para examinar la cinética de la activación de pHAM. Se usa el software Living Image 4.0 para mostrar las imágenes de volumen 3D superpuestas con la anatomía del ratón. Para los tejidos tumorales, la intensidad de fluorescencia se representa en el tiempo para examinar si la cinética de saturación está presente para el NIR-pHAM codificado por cRGD (como se espera de la saturación del receptor). Si se observa la cinética de saturación, se determina la dosis óptima de pHAM como la dosis mínima que permite la saturación del receptor. Esta dosis se utiliza entonces en estudios posteriores para minimizar la captación inespecífica en otros órganos (por ejemplo, el hígado). Los CNR de los tumores sobre los tejidos musculares circundantes para NIR-pHAM codificado por cRGD frente a NIR-pHAM codificado por cRAD se calculan entonces y se comparan para investigar el contraste específico de diana debido a la endocitosis mediada por  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . Para NIR-pHAM con diferentes valores de pH, se comparan los CNR entre los grupos dirigidos (es decir, codificados por cRGD) y no dirigidos (es decir, codificados por cRAD) a través de diferentes diseños de NIR-pHAM. Estos resultados están correlacionados con datos sobre la activación de pHAM oculto (superficie de PEO) en el microentorno tumoral. Los resultados de este estudio seleccionan el diseño de pHT más óptimo para NIR-pHAM para obtener imágenes de los biomarcadores de angiogénesis específicos *in vivo*.

Se usó NIR-pHAM codificado por cRGD (PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR (pHT = 6,3)) como un sistema modelo y NIR-pHAM no dirigido como un control. El PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR tenía la estructura de Fórmula I con lo siguiente:

R'	R1/R2	n	Z	R''	m	X	Y	L	R'''
-CH <sub>3</sub>	iPr/iPr	2	114	-CH <sub>3</sub>	2	70	3	Cipato Cy5.5	Br

El PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR dirigido tenía una densidad superficial al 10 % en moles de cRGD.

Se inyectaron por vía intravenosa PEG-*b*-PDPA codificado por cRGD y conjugado con NIR no dirigido a través de las venas de la cola de ratones sin pelo atímicos portadores de tumores de pulmón A549. La intensidad de fluorescencia de NIR *in vivo* se registró 3 horas después de la inyección. En un grupo de comparación, se inyectó una dosis de

bloqueo del péptido cRGDfK 30 min antes de la administración de PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR codificado por cRGD.

El tumor de PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR codificado por cRGD mostró claramente una intensidad de fluorescencia más alta que la del PEG-*b*-PDPA conjugado con NIR no dirigido o el grupo de bloqueo de cRGD.

### 5 III. Estudios farmacocinéticos de pHAM codificado con cRGD

Este estudio mostró el tiempo de circulación de la sangre de pHAM codificado con cRGD (micelas dirigidas) y pHAM libre de cRGD (micelas no dirigidas) en ratones portadores de tumor A549.

10 Se inocularon s.c. ratones sin pelo atímicos hembra (20-25 g) en el costado derecho con células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549 ( $5 \times 10^6$  células/ratón). Se dejó que los tumores alcanzaran 200-300 mm<sup>3</sup> antes de la inyección de micelas. Para los estudios de PK, pHAM libre de cRGD o pHAM PEG-*b*-(PDPA-*r*-TMR) codificado por cRGD al 10 % se inyectaron a una dosis de 20 mg/kg de micelas a través de la vena de la cola. La sangre se recogió en 2 min, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de la inyección i.v. El plasma se aisló de los glóbulos rojos por centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min. El plasma se almacenó a 4 °C para su análisis posterior. El polímero se extrajo del plasma con metanol ácido (HCl 0,1 M: MeOH, 3:7, v/v) y se detectó con un fluorómetro usando longitudes de onda de excitación y emisión de 545 y 580 nm, respectivamente.

Tanto el pHAM codificado por cRGD como el pHAM libre de cRGD mostraron un tiempo prolongado de circulación en sangre. Las semividas en sangre de pHAM codificado por cRGD y pHAM libre de cRGD fueron de 10,0 y 9,5 horas, respectivamente (**figura 11**).

### 20 IV. Ensayo de la generalidad de la nanoplateforma de NIR-pHAM en la obtención de imágenes de integrina $\alpha v \beta 3$ y VEGFR2 en varios modelos de xenoinjerto tumoral.

En estos estudios se utiliza la formulación de NIR-pHAM con el pHt óptimo. Para las nanosondas dirigidas a VEGFR2, se purificó el fragmento Fab<sub>R2</sub>'-SH de mAb RAFL-1 para la conjugación con NIR-pHAM. También se prepara un Fab'-SH no específico a partir de IgG de rata de control. Se conjuga Fab'-SH con la superficie NIR-pHAM a través de la química de tiol-maleimida. El inmunoconjugado RAFL-1-NIR se utiliza como control siempre activado.

25 Para el NIR-pHAM dirigido a  $\alpha v \beta 3$ , también se sintetiza cRGD-NIR como un conjugado de colorante molecular pequeño. Se espera que estas sondas siempre activadas tengan señales sanguíneas elevadas con un aumento de carga útil de imágenes limitado en el sitio diana, que tienen significativamente menos sensibilidad al contraste en comparación con las nanosondas de NIR-pHAM correspondientes.

Las nanosondas diana se investigan en otros modelos tumorales más clínicamente relevantes en un modelo de tumor de mama MDA-MB-231 ortotópico en la almohadilla mamaria de ratones sin pelo hembra (Ran et al., Neoplasia, 2003, 5:297-307) y un modelo de tumor pancreático MiaPaca-2 ortotópico de en ratones nu/nu (Korpanty et al., Cancer Res., 2007, 13:323-330). Ambos modelos tumorales expresan altos niveles de biomarcadores de angiogénesis (por ejemplo, VEGFR2,  $\alpha v \beta 3$ , endoglina). La especificidad de imágenes y la eficacia de nanosondas de NIR-pHAM en estos modelos tumorales se evalúa y los resultados se validan por inmunohistoquímica de estos biomarcadores de angiogénesis en secciones tisulares.

### 35 Ejemplo 8. Evaluación de la activación de NIR-pHAM no dirigido en tumores ácidos.

El pH extracelular se está convirtiendo en un importante parámetro fisiológico para estudiar el microentorno y el metabolismo de los tumores. (Cardone et al., Nature Rev. Cancer, 2005, 5:786-795; Gerweck & Seetharaman, Cancer Res. 1996, 56:1194-1198; Helminger et al., Nature Medicine, 1997, 3:177-182). La glucólisis aeróbica (aka, efecto Warburg), la conversión de la glucosa en ácido láctico en presencia de oxígeno, se observa de forma única en los cánceres. Para mantener un pH intracelular saludable (-7,2), las células cancerosas utilizan varios sistemas de transporte (por ejemplo, intercambio de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> ATPasas vacuolares (V-ATPasa), intercambio de Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para exportar los protones desde el interior de las células. Esto da como resultado una acidosis microambiental que facilita aún más la invasión del cáncer a través de la degradación de ECM y la promoción de la angiogénesis.

45 Antes de estudiar la activación de pHAM, el mapa en tumores se mide primero usando un procedimiento de relajometría de MRI para la formación de imágenes del pH tisular *in vivo* (Garcia-Martin et al., Magn. Reason. Med., 2006, 55:309-315; Raghunand et al., Magn. Reason. Med., 2003, 49:249-257). Después de la medición por MRI se evalúa la activación de NIR-pHAM no dirigida en el microentorno tumoral. Debido al pequeño tamaño de pHAM (diámetro 40-50 nm), se acumulan en el intersticio del tumor a través de la microvasculatura de los tumores con fugas. En un experimento típico, las nanosondas de NIR-pHAM se inyectan a través de la vena de la cola. El mapa de activación tridimensional y el contraste dinámico en el tiempo se miden en el espectro IVIS. El software Living Image (4.0) proporcionado por el fabricante se utiliza para analizar la activación espacial y temporal de las nanosondas de NIR-pHAM. Además, se usa el conjunto de herramientas de fluorescencia tridimensional cuantitativa (FLIT4) para co-registrar las imágenes ópticas con el mapa de MRI. A continuación se compara el patrón de activación de pHAM con el mapa en tumores. Los perfiles de activación de NIR-pHAM se examinan y se comparan para las nanosondas con diferentes transiciones de pH (es decir, 5,4, 6,3, 6,8, 7,2).

Los experimentos muestran lo siguiente: (1) relaciones  $pH_e$  y  $pH_t$  estrechamente correlacionadas entre el pH microambiental tumoral y la activación NIR-pHAM, respectivamente; (2) para NIR-pHAM con altas transiciones de pH (es decir, 6,8 o 7,2), debido a la respuesta a ultra-pH de las nanosondas de pHAM ensayadas (es decir, <0,25 de unidades de pH para transiciones desactivada/activada), son sondas de imagen altamente sensibles para tumores ácidos y son útiles para la administración de fármacos tumorales; y (3) para NIR-pHAM con transiciones de pH bajas (es decir, 5,4 o 6,3), su falta de activación por el microentorno de tumor ácido da como resultado la obtención de la especificidad de imágenes para los biomarcadores de angiogénesis.

Se ensayaron las nanosondas de PEG-PC7A-Cy5,5. La estructura de PEG-PC7A-Cy5,5 utilizada tenía la estructura de Fórmula I con lo siguiente:

R'	R1/R2	n	Z	R''	m	X	Y	L	R'''
-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	2	114	-CH <sub>3</sub>	2	70	3	Cipato Cy5.5	Br

Se inyectaron por vía intravenosa nanosondas de EG-PC7A-Cy5,5 ( $pH_t = 6,7$ ) (25 mg/kg) a través de la vena de la cola de ratones sin pelo atímicos que tenían tumores de pulmón A549. En el grupo de comparación, se inyectó  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato, un inhibidor de monocarboxilato transferasa 1 (MCT1), 24 horas antes de la administración de la nanosonda. El tumor de los nanosondas de PEG-PC7A-Cy5,5 no dirigidas mostró claramente una mayor intensidad de fluorescencia que el del grupo del inhibidor de MCT1.

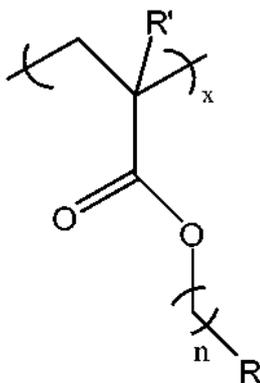
**Ejemplo 9:** Desarrollo de pHAM dirigido a VEGFR2.

Este estudio demuestra el desarrollo de micelas funcionalizadas por  $Fab_{R2}'$  para el direccionamiento específico de receptores de VEGFR2 en la superficie de células endoteliales. El fragmento  $Fab'$  del mAb RAFL-1 se utiliza para el direccionamiento específico a receptores de VEGFR2 ya que el VEGFR2 se sobreexpresa en células endoteliales tumorales angiogénicas. El mAb RAFL-1 se une a VEGFR2 con alta afinidad (15 pM) y especificidad (Ran et al., Neoplasia, 2003, 5:297-307) y, tras la purificación del fragmento  $Fab_{R2}'-SH$  de RAFL-1 para la funcionalización superficial, los liposomas funcionalizados con  $Fab_{R2}'$  mostraron un aumento >30 veces en la captación celular en células endoteliales de ratón sobre los liposomas de control (Marconescu, PhD. Thesis, UT Southwestern Medical Center, Dallas, 2008). En comparación con el mAb entero,  $Fab_{R2}'-SH$  tiene la ventaja de introducir un resto de direccionamiento más pequeño (50 frente a 150 kD), y una presentación superior del epítipo de unión en la superficie de pHAM (es decir, orientado a la solución en lugar de una orientación aleatoria para el mAb entero).

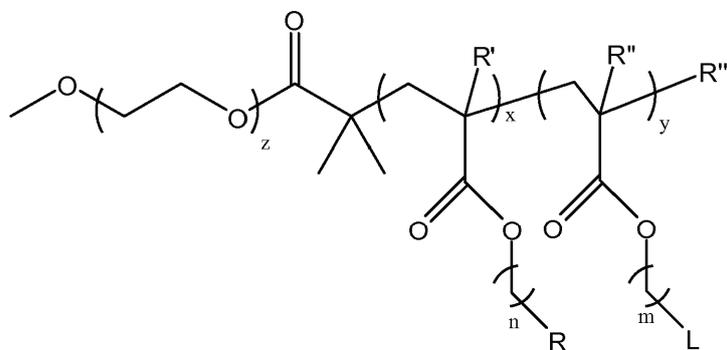
Se usa la química de tiol-maleimida para la conjugación de ligandos en la superficie de pHAM. Se mezcla MAL-PEO-*b*-PR con PEO-*b*-(PR-*r*-NIR) a diferentes relaciones molares (por ejemplo, un 20 % en moles de MAL-PEO-*b*-PR). Para cada copolímero de pHAM, su copolímero terminado en maleimida correspondiente se sintetiza entonces (**figura 8**). Después de la formación micelar, los péptidos de  $Fab_{R2}'-SH$  se conjugan a través de la unión de tiol-maleimida. El análisis de aminoácidos se usa además para cuantificar la densidad peptídica en la superficie de las nanosondas de pHAM (Khemtong, et al., Cancer Res., 2009, 69:1651-1658). Se usa TEM y DLS para examinar la funcionalización del ligando sobre el tamaño y morfología de las partículas, y se usa la espectrofotometría de fluorescencia para verificar las propiedades de fluorescencia sensibles al pH de pHAM. La microscopía confocal de barrido láser es la principal herramienta para examinar la cinética de la captación celular y la activación intracelular del pHAM dirigido.

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero en bloque que comprende un segmento polimérico hidrófilo y un segmento polimérico hidrófobo, en el que el segmento polimérico hidrófilo comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno) (PEO), poli(metacrilato fosfatidilcolina) (MPC) y polivinilpirrolidona (PVP), en el que el polímero en el segmento polimérico hidrófilo tiene de 100 a 130 unidades monoméricas, en el que el segmento polimérico hidrófobo comprende

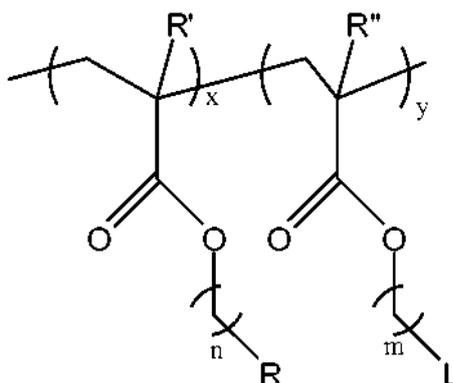


- 10 en la que R' es -H o -CH<sub>3</sub>,  
 en la que R es -NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son grupos alquilo, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales o diferentes, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos tienen 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 carbonos, o donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar un anillo que tiene de 5 a 16 carbonos,  
 en la que n es de 1 a 10,  
 en la que x es de 20 a 200 en total, y  
 en la que el copolímero en bloque comprende opcionalmente un resto marcador.
- 15 2. El copolímero en bloque de la reivindicación 1, en el que n es de 1 a 4, o es 2.
3. El copolímero en bloque de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que x es de 40 a 100 en total.
4. El copolímero en bloque de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno alquilo lineal o ramificado, y/o opcionalmente R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen para formar un anillo, tal como uno que tiene de 5 a 10 carbonos, y/o opcionalmente son iguales o diferentes.
- 20 5. El copolímero en bloque de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son butilo, tal como n-butilo.
6. El copolímero en bloque de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos son -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-.
- 25 7. El copolímero en bloque de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende un compuesto de Fórmula I:



(Fórmula I)

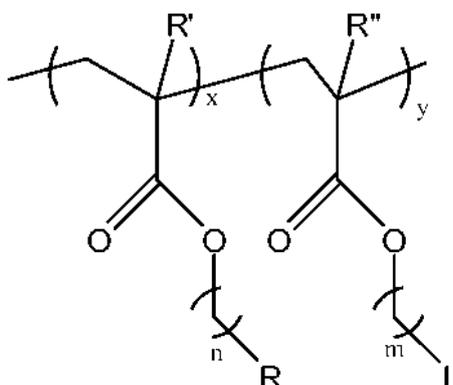
en la que L es un resto marcador, en la que y es de 0 a 6, en la que R'' es -H o -CH<sub>3</sub>; en la que m es de 1 a 10; en la que z es de tal forma que PEO tiene de 2 kD a 20 kD de tamaño, en la que R''' es cualquier resto adecuado, y en la que la siguiente porción de la estructura:



puede disponerse en cualquier orden.

8. El copolímero en bloque de la reivindicación 7, en el que R''' es un grupo terminal resultante de una reacción de polimerización, por ejemplo Br, tiolato o tioéster.

5 9. El copolímero en bloque de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la siguiente porción de la estructura:



está aleatorizada.

10 10. Una composición que comprende una micela sensible al pH, en la que la micela sensible al pH comprende un copolímero en bloque de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, opcionalmente, en la que la micela tiene un tamaño de 10 a 200 nm, o de 20 a 100 nm, o de 30 a 50 nm, y/o tiene un intervalo de transición de pH de menos de 1 unidad de pH, 0,5 unidades de pH o 0,25 unidades de pH, y/o tiene un valor de transición de pH de 5 a 8, de 5 a 6, o de 6 a 7.

15 11. La composición de la reivindicación 10, en la que la micela comprende además un resto de direccionamiento, tal como un resto de direccionamiento que se une a VEGFR2, un resto de direccionamiento que se une a integrina  $\alpha\beta_3$ , o un resto de direccionamiento que se une a un marcador de la angiogénesis.

12. La composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende además un fármaco encapsulado en la micela, por ejemplo, el fármaco es hidrófobo, en la que el fármaco tiene un log p de 2 to 8, y/o un agente quimioterapéutico, tal como doxorubicina, paclitaxel, o  $\beta$ -lapachona.

13. La composición de la reivindicación 12 para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer.

20 14. La composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso en un procedimiento para formar imágenes de un tumor en un individuo, en la que el procedimiento comprende a) administrar una composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada.

25 15. La composición de la reivindicación 12 para su uso en un procedimiento de administración de un fármaco a (i) endosomas tempranos, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición de la reivindicación 12 a un individuo que necesita la misma, en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5, o (ii) endosomas tardíos o lisosomas, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición de la reivindicación 12 a un individuo que necesita la misma, en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5.

30 16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso en un procedimiento:

- (i) para formar imágenes de la actividad endosómica temprana en un individuo, comprendiendo el procedimiento a) la administración de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada; o
- 5 (ii) para formar imágenes de la actividad endosómica tardía o lisosómica en un individuo, comprendiendo el procedimiento a) la administración de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada.
17. El uso de una composición de la reivindicación 12 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.
- 10 18. La composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para la fabricación de una gente para su uso en un procedimiento para formar imágenes de un tumor en un individuo, en la que el procedimiento comprende a) administrar una composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada.
- 15 19. El uso de una composición de la reivindicación 12 para la fabricación de un agente para su uso en un procedimiento para la administración de un fármaco a (i) endosomas tempranos, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición de la reivindicación 12 a un individuo que necesita la misma, en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5, o (ii) endosomas tardíos o lisosomas, comprendiendo el
- 20 procedimiento la administración de una composición de la reivindicación 12 a un individuo que necesita la misma, en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5.
20. El uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para la fabricación de un agente para su uso en un procedimiento:
- (i) para formar imágenes de la actividad endosómica temprana en un individuo, comprendiendo el procedimiento a) la administración de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,9 a 6,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada; o
- 25 (ii) para formar imágenes de la actividad endosómica tardía o lisosómica en un individuo, comprendiendo el procedimiento a) la administración de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 al individuo, en la que el copolímero en bloque comprende un resto marcador, y en la que la micela tiene un valor de transición de pH de 5,0 a 5,5, y b) determinar la distribución del copolímero en bloque en su forma disociada.
- 30

Figura 1A

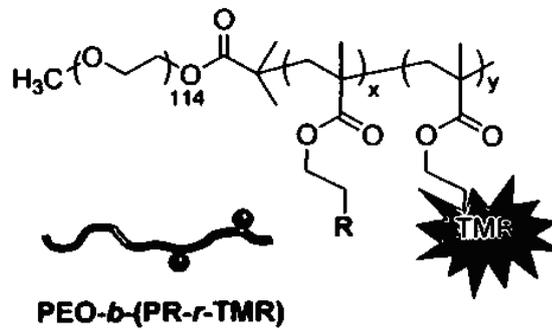
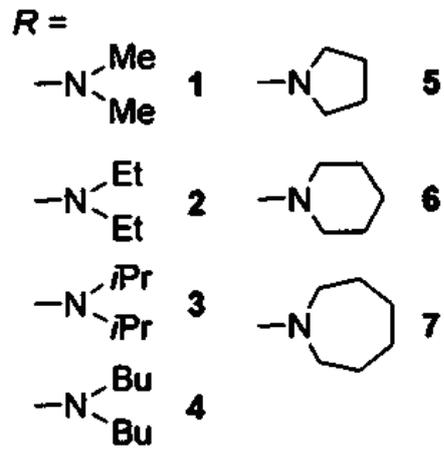


Figura 1B



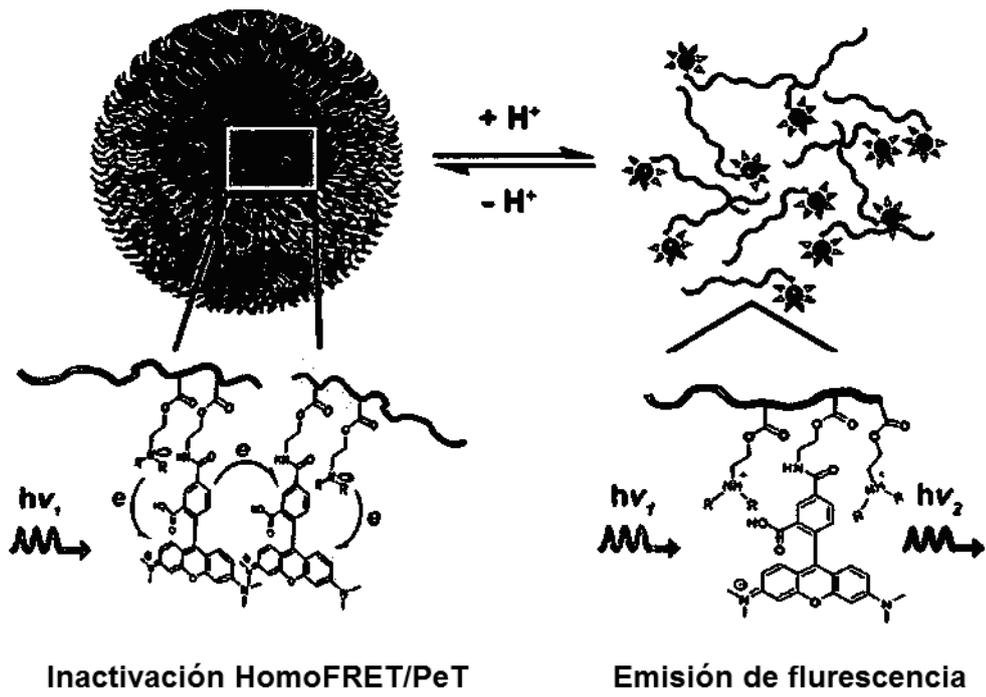


Figura 1C

Figura 2A

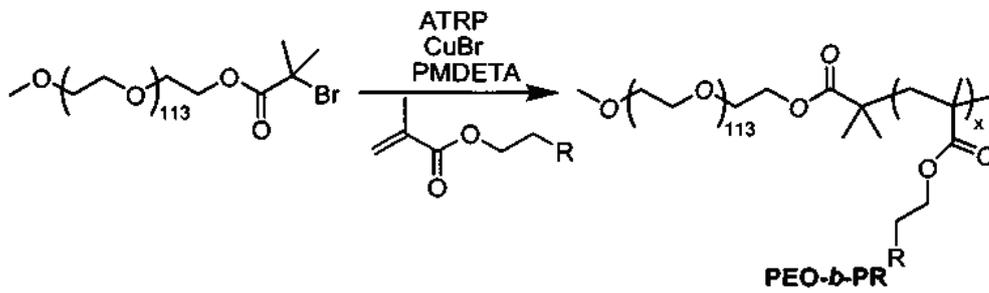
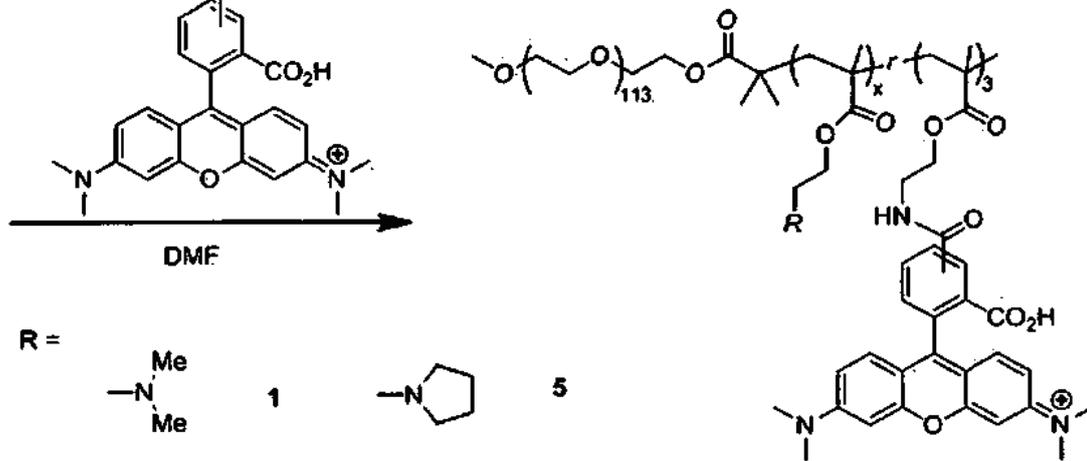
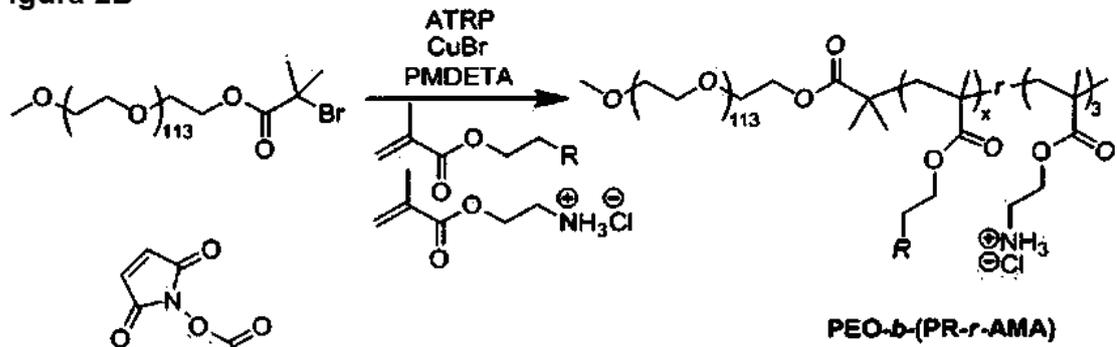
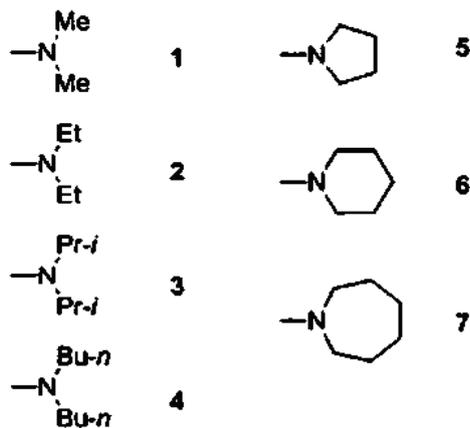


Figura 2B



R =



**PEO-b-(PR-r-TMR)**

Figura 3A

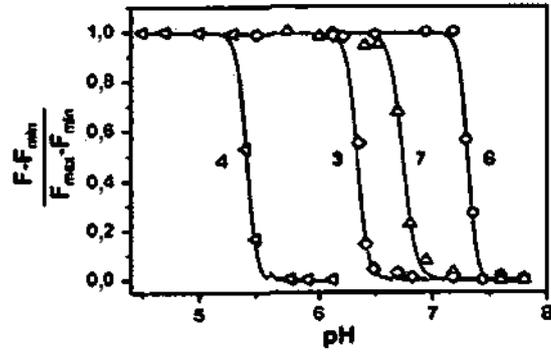


Figura 3B

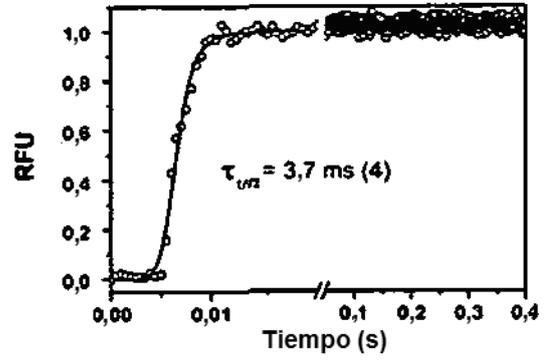


Figura 4A

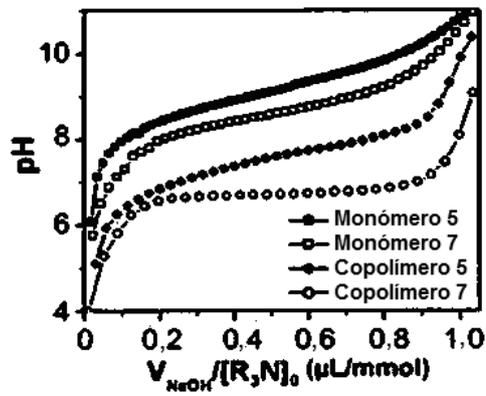
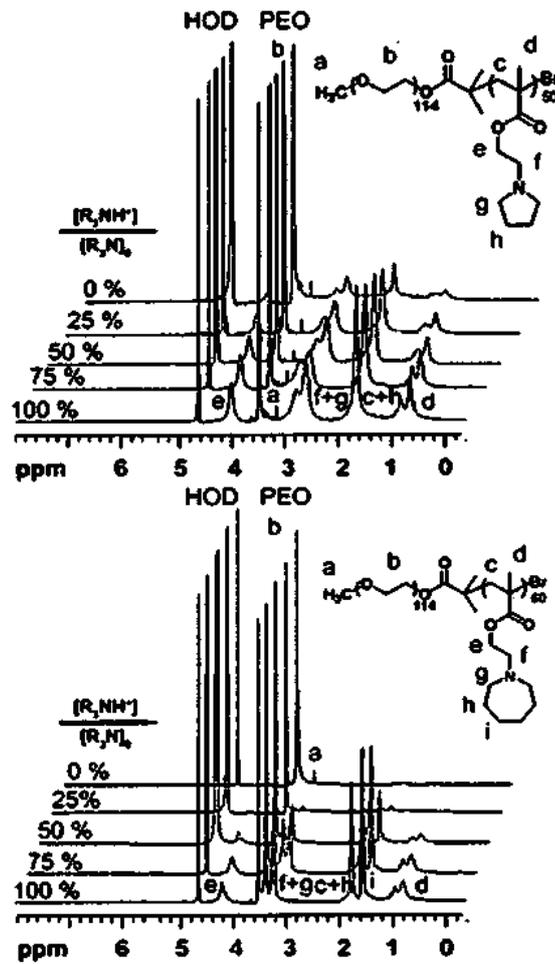


Figura 4B



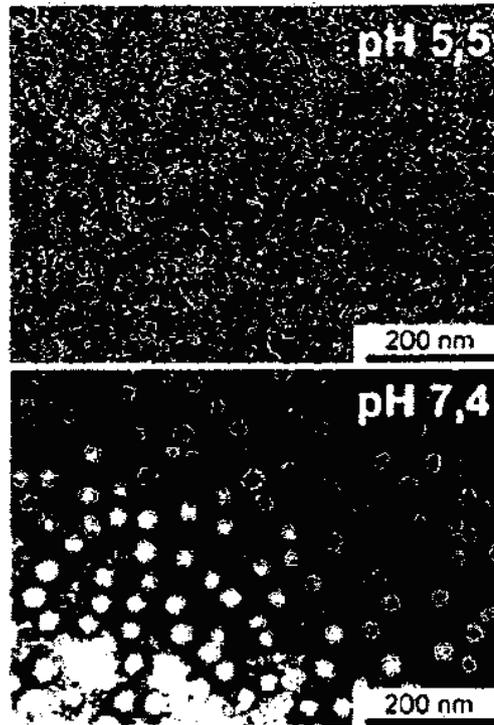


Figura 4C

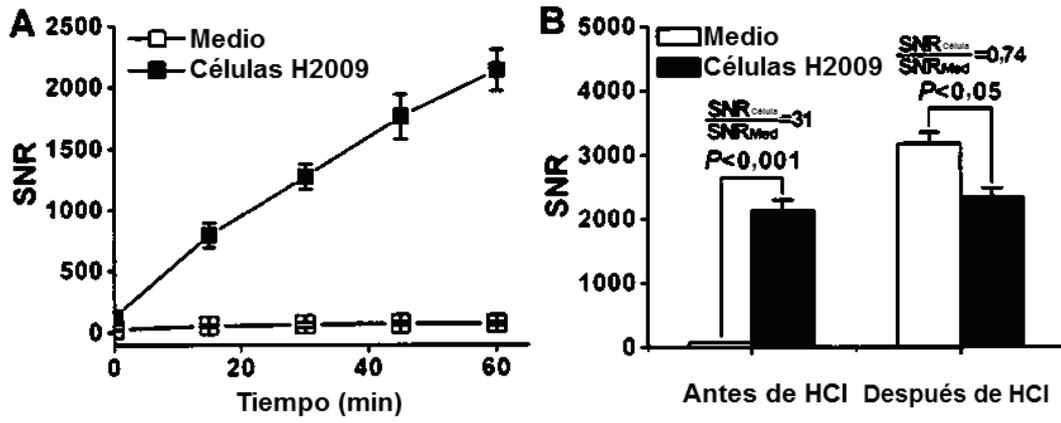


Figura 5

Figura 6

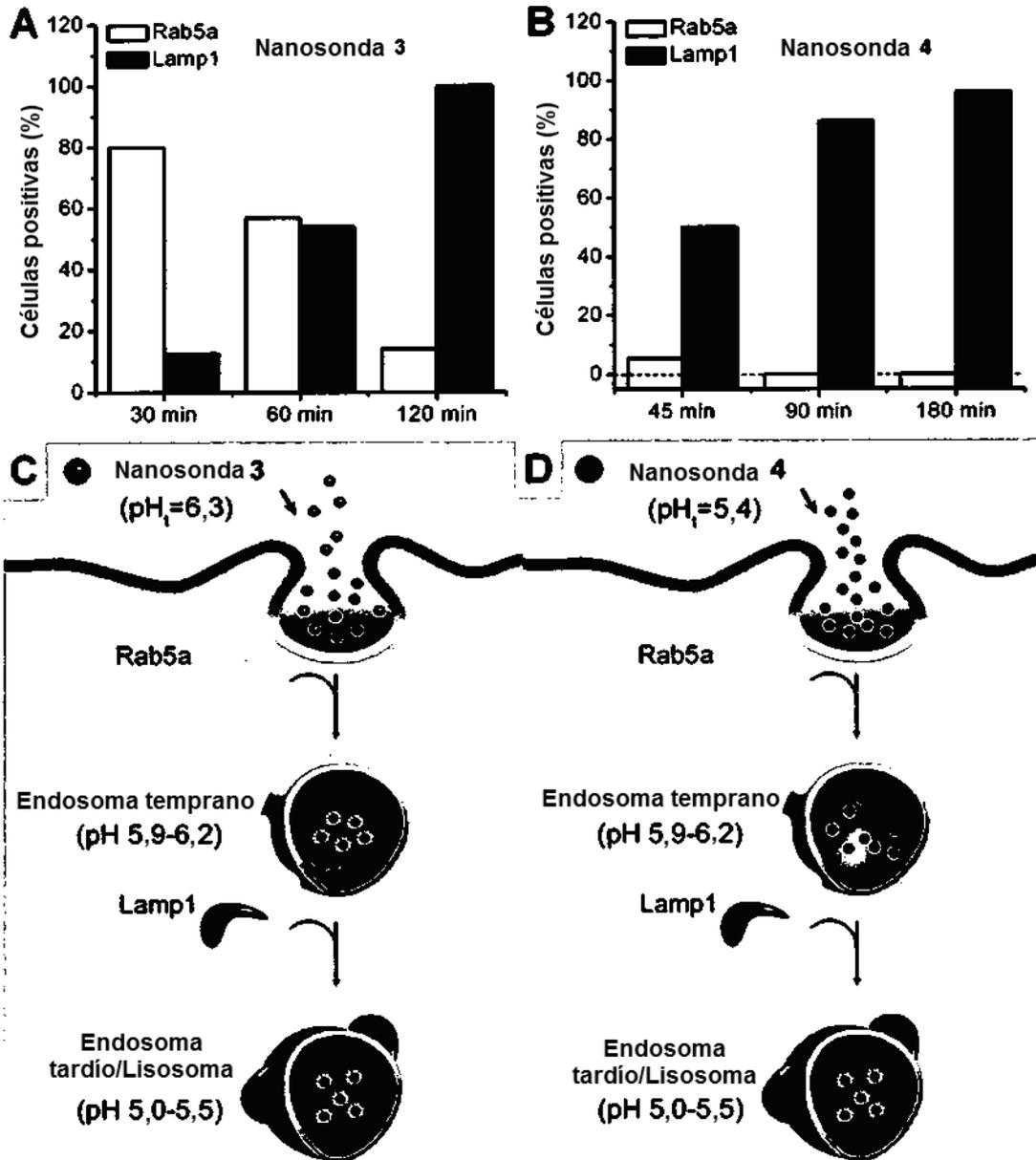
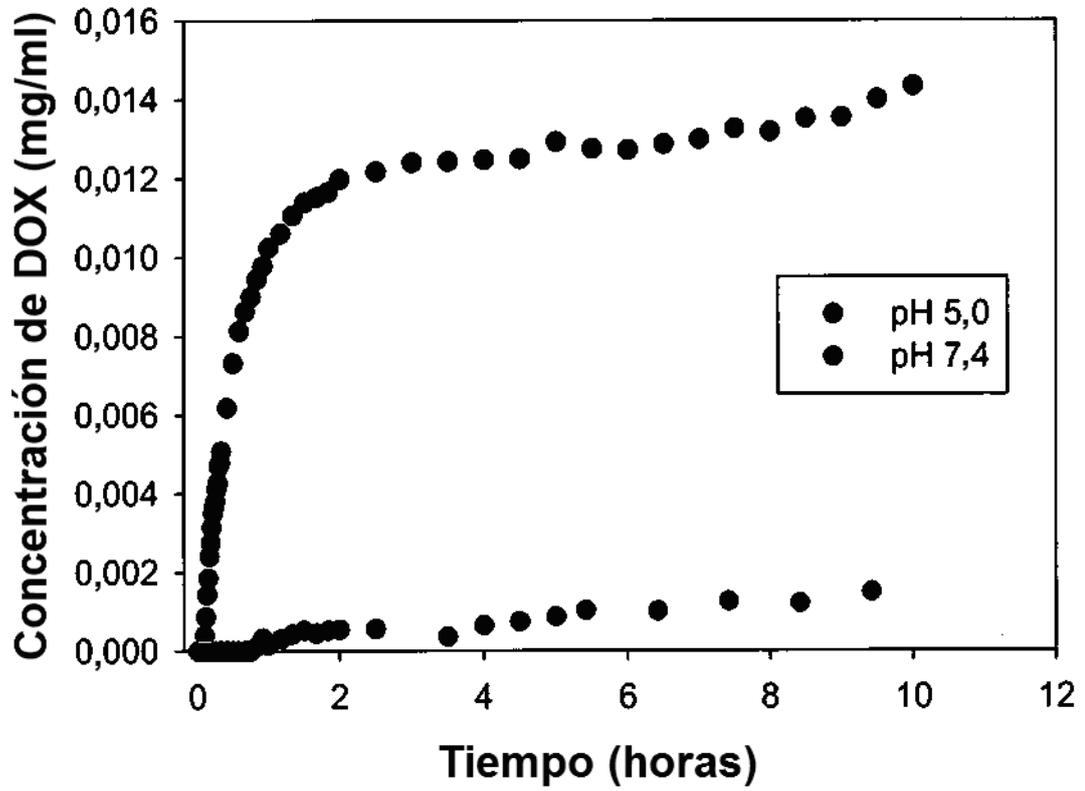


Figura 7



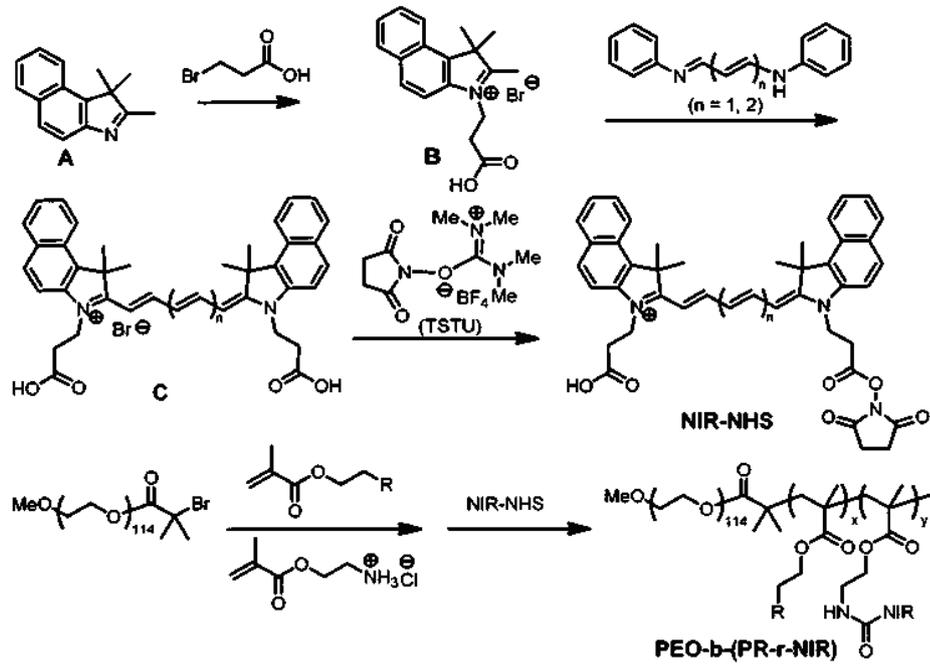


Figura 8

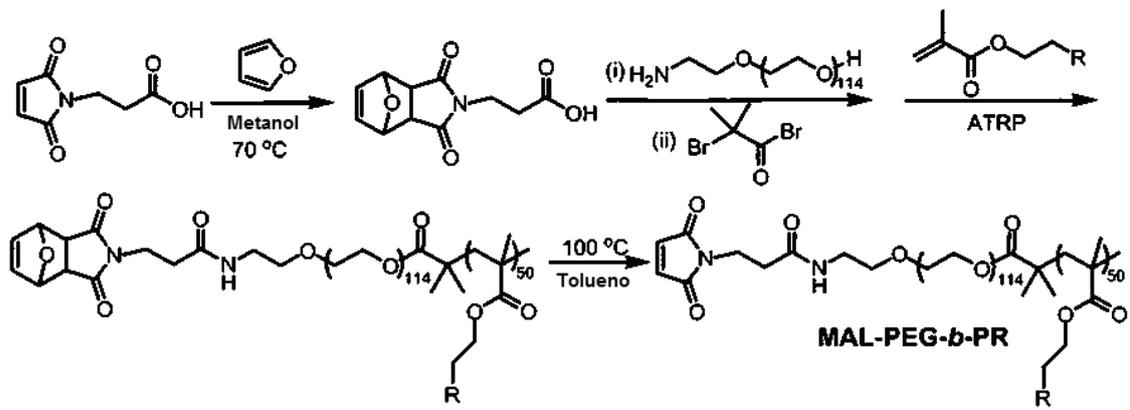


Figura 9

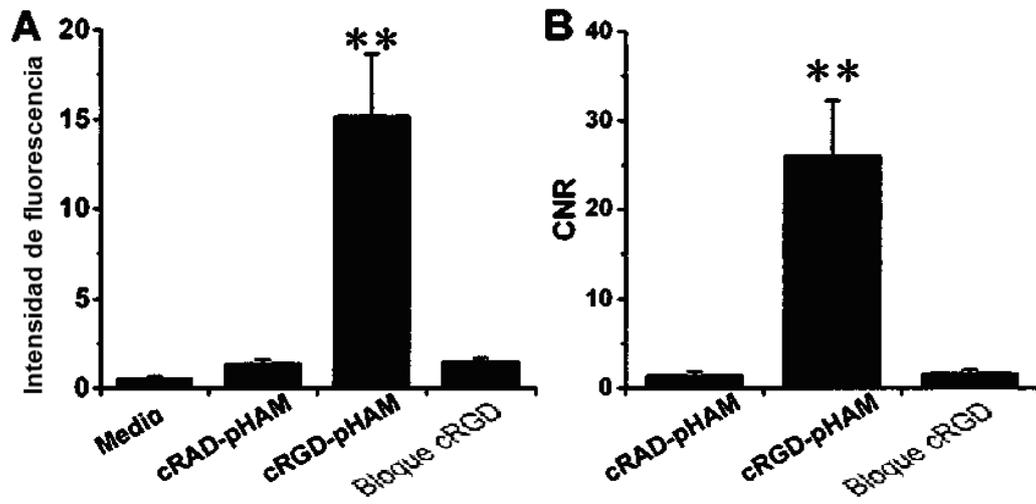


Figura 10

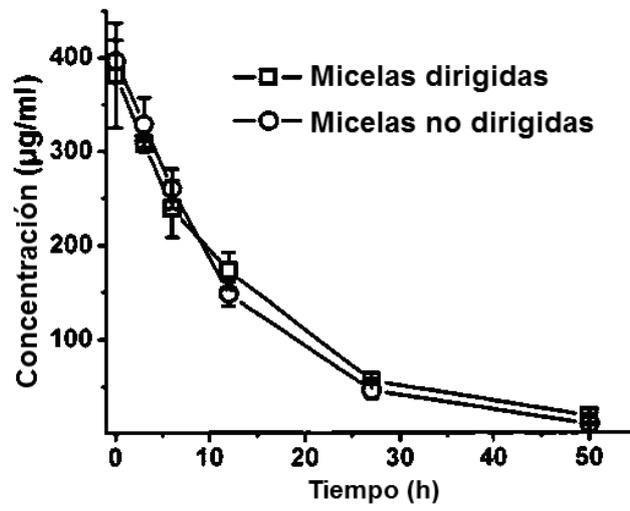


Figura 11

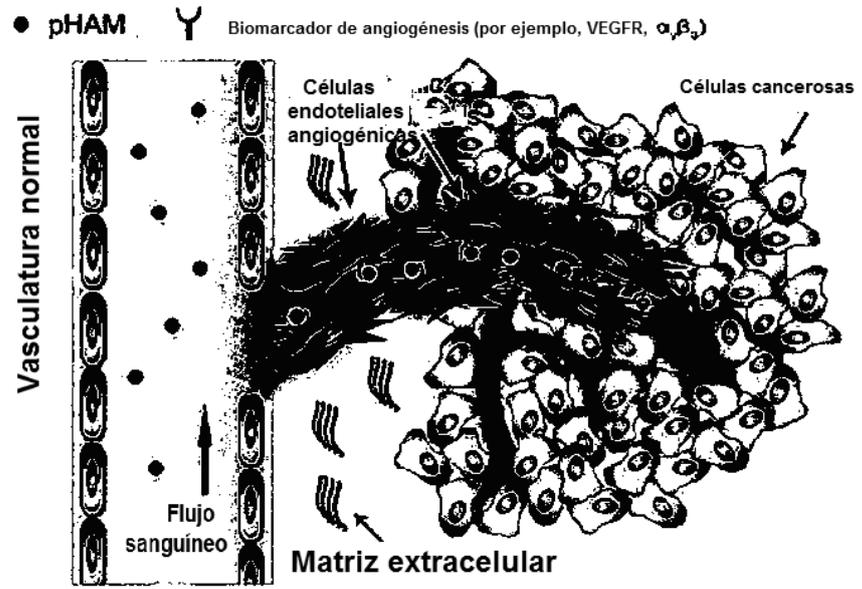


Figura 12

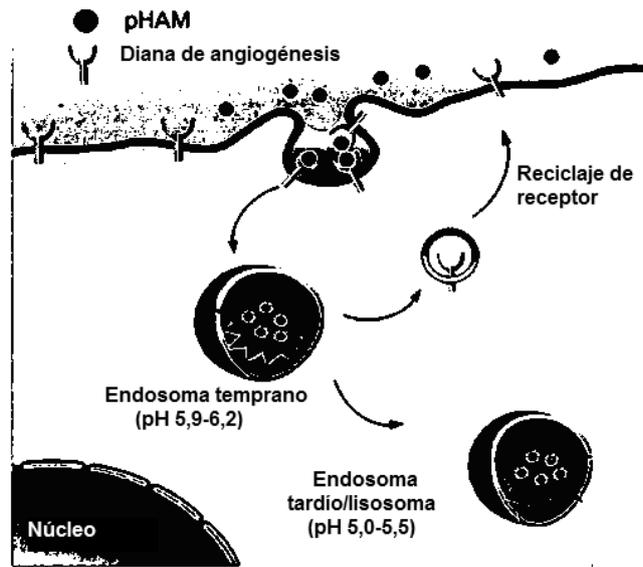


Figura 13

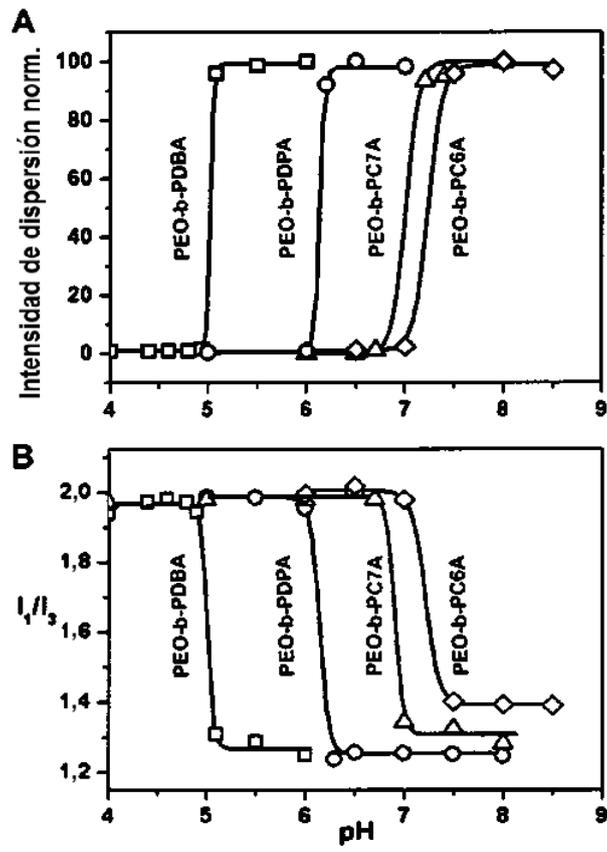


Figura 14

Figura 15

