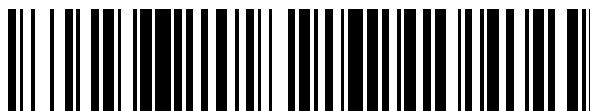


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 243**

51 Int. Cl.:

C07D 475/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013** E 16150319 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018** EP 3034498

54 Título: **Intermedios para copolímeros de PLA-PEG funcionales**

30 Prioridad:

28.02.2012 EP 12305236

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

03.05.2018

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54 Rue de la Boetie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 666 243 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

Intermedios para copolímeros de PLA-PEG funcionales

La presente invención se refiere al campo del suministro farmacológico dirigido y la obtención de imágenes y, en particular, el suministro por medio de la encapsulación no covalente o la conjugación de un fármaco con una nanopartícula de poli(etilenglicol)-(ácido poliláctico) (PEG-PLA).

La síntesis de nanopartículas de PLA-PEG y sus aplicaciones en el suministro farmacológico se ha descrito ampliamente en la bibliografía. En una composición de PLA-PEG, el PLA (ácido poliláctico) es hidrófobo y el PEG es hidrófilo. PLA-PEG se ensambla en nanopartículas en medio acuoso, formando el PLA el núcleo y formando el PEG la corona. Tras la inyección intravenosa, se ha mostrado que la corona de PEG en las nanopartículas de PLA-PEG protege la nanopartícula de la fagocitosis («efecto de ocultación») y, de esta manera, minimiza el aclaramiento sistémico rápido de las nanopartículas y, por lo tanto, incrementa su semivida sistémica (patente de EE. UU. 5 683 723 que describe nanopartículas basadas en un copolímero en bloque de polioxietileno y ácido poliláctico). Es más, tales nanopartículas se acumulan en tumores mediante el efecto descrito previamente de «permeabilidad y retención mejoradas» (EPR, por sus siglas en inglés). En el campo del cáncer en particular, se desean tratamientos específicos del tumor debido a los fuertes efectos secundarios de las quimioterapias y, en este contexto, se han considerado las nanopartículas poliméricas como sistemas de suministro farmacológico prometedores. Cuando se incorporan en las nanopartículas de PLA-PEG, los fármacos experimentan una circulación sistémica prolongada y una concentración potencialmente más elevada en el tumor debido al efecto EPR. Con el fin de suministrar la nanopartícula con un aumento de la especificidad respecto al tumor, se podría emplear una estrategia de direccionamiento/acumulación en el tejido utilizando un dispositivo autoguiado (Pulkkinen *et al. Eur J Pharm Biopharm* 70 (2008) 66-74, Zhan *et al. J Control Rel* 143 (2010) 136-142, Farokhzad *et al. Cancer Res* 64 (2004) 7668-7672, Gao *et al. Biomaterials* 27 (2006) 3482-3490).

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

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

La química click resulta de interés debido a que esta estrategia da como resultado un rendimiento elevado, las condiciones de reacción son fáciles de manejar y se puede cambiar la escala debido a que la reacción no es sensible al oxígeno y al agua. El contexto de esta reacción es muy conocido, implica una cantidad baja de catalizador y conlleva un rendimiento elevado del acoplamiento.

Recientemente, Deshayes *et al. (Pharm. Res.* (2011), 28, 1631-1642) publicaron la conjugación de un ciclopéptido (utilizado como un ligando que se une específicamente a un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) de direccionamiento, a una nanopartícula de (fluoruro de polivinilideno)-(ácido poliacrílico) mediante química click. La química click ya se ha tenido en cuenta para sintetizar macromoléculas que contienen tanto polímeros de PLA como de PEG. Tang *et al. Macromolecules* 2011, 44, 1491-1499 divulgaron el acoplamiento de un intermedio de PEG-g-PLA-alquiniolo con un derivado de azida (poli(azidopropil-L-glutamato)). Además, Yu *et al. Macromolecules*, 2011, 44(12), 4793-4800 describieron recientemente una nanopartícula constituida por la macromolécula PLA-g-paclitaxel-PEG donde el paclitaxel hace de puente entre el esqueleto de PLA y las cadenas laterales de PEG. Sin embargo, el fármaco no está encapsulado físicamente en la nanopartícula y la estructura no comprende un ligando de direccionamiento. Lu *et al. Bioconjugate Chem* 2009, 20, 87-94 también describieron una macromolécula que contiene PLA y PEG generada mediante química click y a la cual se incorpora un péptido (RGD = arginina-glicina-aspartato) para el direccionamiento celular. La estructura de la macromolécula conlleva la síntesis de intermedios complejos desde un punto de vista estructural: el copolímero de azida (poli(2-metil-2-carboxitrimetileno-carbonato-co-D,L-lactida)-g-PEG-azida) y los péptidos modificados con alquino KGRGDS.

Zhang *et al. (Mol. Pharmaceutics* 2012,9, 2228-2236) divulgan nanopartículas constituidas por macromoléculas que contienen PLA y PEG, donde la superficie se conjuga con ligandos utilizando química click, lo que da como resultado de esta manera un ligando incorporado directamente al grupo triazol. Xiao *et al. (International Journal of nanomedicine* 5, 1, 2010, 1057-1065) trata de manera general sobre nanopartículas que contienen PEG-PLA. Arutselvan *et al. (Chemical Communications* 7, 2007, 695-697), WO 2011/046946, Steinmetz *et al. Journal of the American Chemical Society* 131, 47, 2009, 17093-17095) y Adibekian *et al. (Nature Chemical Biology* 7, 2011, 469-479) divulgan derivados de alquino-PEG.

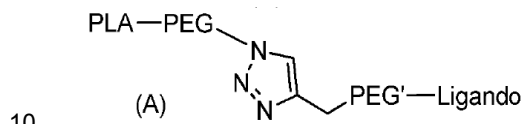
El documento WO 2010/008519 divulga un derivado del ácido fólico con un conector de tipo alqueniolo.

Por lo tanto, es necesario diseñar un proceso de preparación directo de nanopartículas que contienen PEG-PLA capaces de encapsular fármacos para el suministro específico del sitio en las cuales se pueda incorporar un ligando funcional deseado utilizando química click.

Se divulga el suministro de nanopartículas de PLA-PEG que comprenden una cadena de PLA-PEG fácil de preparar unida de manera covalente a un ligando de direccionamiento mediante un conector, que se puede obtener mediante química click.

- 5 Se divulga la preparación de nanopartículas que conlleva la síntesis de un compuesto PLA-PEG-azida que puede actuar como una plataforma copolimérica utilizable en química click a la cual se puede acoplar cualquier alquino-ligando funcional, por ejemplo, dispositivo autoguiado, agente de obtención de imágenes, agente que responde a estímulos, agente de acoplamiento molecular, agente para mejorar la penetración celular, agente detoxificador, fármaco que se puede acoplar utilizando química click mediante una estrategia versátil.

Se divulga un compuesto de fórmula (A)



donde:

PLA representa un resto de ácido poliláctico;

PEG representa un resto de polietilenglicol;

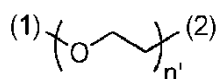
el conector PEG' es un resto de polietilenglicol; y

- 15 el ligando es un resto de un ligando funcional.

El término «resto», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un radical divalente o monovalente dependiendo de la molécula a partir de la cual se origina, o de un derivado de este.

En la fórmula general (A) anterior, se pueden tener en cuenta las siguientes realizaciones particulares o cualquiera de las combinaciones de estas:

- 20 - de acuerdo con una realización, PEG' es de fórmula



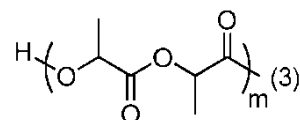
donde:

n' es el número de unidades y está comprendido entre 1 y 10

(1) es la incorporación del enlace al grupo $-(\text{CH}_2)\text{-triazol}$;

- 25 (2) es la incorporación del enlace al ligando.

- de acuerdo con una realización, PLA es de fórmula:

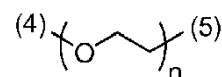


donde:

(3) es la incorporación del enlace a la porción PEG; y

- 30 m es el número de unidades, está comprendido entre 1 y 500, y corresponde a un peso molecular de entre aproximadamente 144 y 72 000. En una realización adicional, m está comprendido por lo general entre 100 y 300, y corresponde a un peso molar de entre aproximadamente 14 400 y 43 200 g/mol.

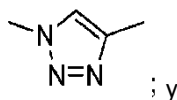
- de acuerdo con una realización, PEG es de fórmula



- 35 donde:

(4) es la incorporación del enlace al -PLA;

(5) es la incorporación del enlace al átomo de nitrógeno de



5 n es el número de unidades, está comprendido entre 1 y 300, y corresponde a un peso molar de entre aproximadamente 44 y 13 200 g/mol. En una realización adicional, n está comprendido entre 20 y 70, y corresponde a un peso molar de entre aproximadamente 880 y 3080 g/mol.

La unión entre PLA y PEG (PLA-PEG) consiste en un enlace de tipo éster entre el grupo carboxílico terminal de la porción PLA y el grupo hidroxilo terminal de la porción PEG.

No se representa la unión entre PEG' y el ligando (PEG'-ligando) pero consiste en un enlace de tipo amida formado por el grupo carboxílico del ligando y el grupo amino resultante del grupo hidroxilo terminal del PEG'.

10 En una realización, se puede elegir un ligando entre restos de dispositivos autoguiados, agentes de diagnóstico, agentes de obtención de imágenes, agentes sensibles a estímulos, agentes de acoplamiento molecular, agentes de penetración celular, agentes detoxificantes, fármacos. En una realización particular de un compuesto de fórmula (A), se puede elegir un ligando entre anisamida, ácido fólico y fluorocromos tales como FP-547.

En el contexto de la presente invención:

15 - se entiende que un átomo de halógeno se refiere a un flúor, cloro, un bromo o un yodo;

- se entiende que un grupo alquilo (C₁-C₆) se refiere a un grupo alifático saturado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono (convenientemente de 1 a 4 átomos de carbono) y que es lineal o ramificado. Cabe mencionar, a modo de ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, pentilo, hexilo y similares.

20 Los compuestos de fórmula (A) se pueden proporcionar en forma de una base libre o en forma de sales de adición con ácidos.

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

Los compuestos de fórmula (A) pueden formar nanopartículas. Por lo tanto, se divulga una nanopartícula que comprende uno o más compuestos idénticos o diferentes de fórmula (A).

25 La expresión «compuestos idénticos o diferentes», tal como se utiliza en la presente, indica que dichos compuestos pueden tener la misma fórmula o tener una diferente dependiendo de las definiciones de sus diversos PEG, PLA, PEG', R, m, n, etc.

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



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

Dichas nanopartículas pueden comprender opcionalmente un fármaco.

35 El término «fármaco» utilizado en la presente se refiere a sustancias terapéuticas que se pueden administrar a un paciente que lo necesite. Cualquier fármaco relevante de interés (especialmente fármacos insolubles en agua) se podría encapsular de manera no covalente en la nanopartícula y/o conjugar de manera covalente con la nanopartícula (opcionalmente mediante un conector) para su suministro al cuerpo.

El fármaco puede ser en particular un antibiótico, agente anticancerígeno, agente antivírico, agente antiinflamatorio, un antígeno vacuna o un nutraceutico.

En particular, el fármaco puede ser un agente citotóxico, tal como uno taxoide y de manera más concreta docetaxel.

40 Por lo tanto, en una realización el fármaco está encapsulado (por ejemplo, encapsulado físicamente) de manera no covalente dentro de las nanopartículas. En otra de sus realizaciones el fármaco está conjugado de manera covalente, opcionalmente a través de un conector, a las nanopartículas, en particular, cuando el ligando es un fármaco.

En una realización particular, el ligando no es un fármaco sino que el fármaco está encapsulado de manera no covalente en la nanopartícula.

El término «nanopartícula», tal como se utiliza en la presente, se refiere a partículas que tienen un diámetro medio entre 10 nm y 900 nm. En una realización adicional, las nanopartículas tienen un diámetro medio entre 50 y 300 nm.

Normalmente muestran un índice de polidispersidad (Pdl, por sus siglas en inglés) de entre 0.01 y 0.4, más específicamente de entre 0.1 y 0.4 y tienen un potencial zeta de entre -30 y +30 mV.

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

Se ilustran nanopartículas en las Figuras 2-3.

- 10 Tal como se divulga, dichas nanopartícula se pueden preparar mediante nanoprecipitación de compuestos de fórmula (A), opcionalmente en presencia de los compuestos de fórmula (I') anteriores y/o a lo que sigue opcionalmente la encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.

El término «nanoprecipitación», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un proceso que comprende la precipitación o emulsiónamiento y la reducción del tamaño de uno o más compuestos en forma de nanopartículas en suspensión.

- 15 Normalmente, dicho proceso comprende la centrifugación de la suspensión. El proceso también puede incluir uno o más pasos elegidos entre:

- preparar una fase orgánica de los compuestos de fórmula (A) y opcionalmente (I') en un disolvente adecuado o mezcla de disolventes, tales como cloruro de metileno, acetato de etilo, acetona, etano, tetrahidrofurano, etc.

- preparar una fase acuosa estabilizada opcionalmente con uno o más agentes estabilizantes, tales como colato de sodio, alcohol polivinílico (PVA, por sus siglas en inglés), poloxámero, fosfolípidos, etc.;

- 20 - mezclar las fases orgánica y acuosa;

- reducción del tamaño de la suspensión (por ejemplo, utilizando ultrasonicación);

- retirada de la fase orgánica, por ejemplo, mediante evaporación al vacío o con una corriente de aire;

- centrifugación de la fase acuosa, en particular ultracentrifugación hasta 50 000 g;

- recoger las nanopartículas; y/o

- 25 - resuspender las nanopartículas obtenidas en medio acuoso.

- 30 Normalmente, las nanopartículas se obtienen utilizando un disolvente orgánico miscible en medio acuoso (tal como acetona) como la fase orgánica precipitada en una fase acuosa utilizando opcionalmente un agente estabilizante, o utilizando diclorometano o acetato de etilo como la fase orgánica mezclada con la fase acuosa que contiene PVA o poloxámero o colato de sodio como agente estabilizante. Los poloxoámeros adecuados para su uso en la producción de nanopartículas están disponibles como TM Pluronic. Un poloxámero adecuado es el poloxámero 188 (disponible como Pluronic® F68 o Lutrol® F68, BASF).

- 35 Las nanopartículas compuestas por el PLA-PEG-ligando funcional se pueden utilizar para una variedad de objetivos que incluyen el suministro de sustancias terapéuticas (fármacos) al cuerpo humano. En una realización, la nanopartícula comprende además un fármaco. En este caso, la sustancia terapéutica está encapsulada de manera no covalente (encapsulación física) en la matriz nanoparticulada y se suministra mejor al tejido previsto.

En otra realización, el fármaco se puede conjugar de manera covalente al compuesto de fórmula (A), por ejemplo, en lugar del ligando, opcionalmente a través de un conector. La conjugación covalente puede ser de interés para mantener la asociación del fármaco al portador *in vivo*, para las aplicaciones de obtención de imágenes y suministro farmacológico.

- 40 Al mezclar diferentes compuestos de fórmula (A) con diferente ligandos, se pueden obtener nanopartículas multifuncionales. Estas nanopartículas multifuncionales se pueden utilizar para aplicaciones combinatorias (remítase a la Figura 3).

La nanopartícula se puede preparar nanoprecipitando uno o más compuestos de fórmula (A), y opcionalmente (I'), opcionalmente en presencia de un fármaco o diferentes fármacos (para la terapia de combinación).

- 45 La expresión «ligando funcional», tal como se utiliza en la presente en un compuesto de fórmula (A) o en las nanopartículas generadas con él, se refiere a cualquier tipo de compuesto capaz de dirigir o rastrear el suministro de un fármaco en el cuerpo humano, o el propio fármaco en particular cuando el fármaco es específico del sitio, tal como un fármaco que se une específicamente a los receptores. Los ligandos funcionales se pueden elegir en particular entre:

- compuestos capaces de seguir la captación y distribución de las nanopartículas en una célula, un tejido, un animal o un paciente, por ejemplo, proporcionando una marca que puede proporcionar una imagen de la distribución de las nanopartículas;
 - agentes químicos o biológicos, incluidos fármacos, que pueden dar lugar a un efecto final deseado de las nanopartículas tal como el desencadenamiento de la muerte celular o activación o inhibición de un receptor, una enzima o un gen;
 - ligandos de receptores tales como un antagonista del receptor de estrógeno, un antagonista del receptor de andrógeno, ácido fólico, anisamida, un péptido RGD, anticuerpos, vectores génicos dirigidos a péptidos, aptámeros y factor de necrosis tumoral.
- 10 Los ligandos funcionales pueden incluir un dispositivo de autoguiado, un agente de obtención de imágenes, un agente sensible a estímulos (agente termosensible, agente sensible al pH, agente fotosensible, etc.), un agente de acoplamiento molecular, un agente para mejorar la penetración celular, un agente detoxificante, un fármaco, etc., dependiendo de las aplicaciones previstas.
- 15 Por ejemplo, un dispositivo autoguiado que reconoce y se une a un tipo celular/tisular específico se podría utilizar para dirigir las nanopartículas cargadas con el fármaco al tejido orgánico/enfermo específico de interés, que también se podría denominar «direccionamiento farmacológico específico del sitio». Se espera que las nanopartículas con PLA-PEG-dispositivo autoguiado mejoren el suministro del fármaco encapsulado al sitio de la enfermedad deseado, aumenten la concentración farmacológica local en el tejido diana y, a la vez, faciliten una liberación farmacológica sostenida. Esto puede dar como resultado una exposición mejor y más prolongada del tejido/células enfermas al fármaco y, así pues, se puede conseguir una mejora del beneficio terapéutico y una reducción de los efectos secundarios. Tales agentes autoguiados se pueden elegir en particular entre ligandos de reconocimiento de membranas, tales como anisamida (que tiene afinidad por los receptores sigma), ácido fólico (que tiene afinidad por los receptores de folato sobreexpresados en la superficie de algunas líneas celulares tumorales), anticuerpos (tales como HER2, transferrina, anticuerpos anti-EGFR, etc.) capaces de reconocer el antígeno superficial correspondiente, secuencia RGD que se une a integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobreexpresadas en el endotelio angiogénico tumoral, ácido hialurónico que se une a los receptores CD44, transferrina que se une a los receptores de transferrina, etc.
- 20 En otro caso, los ligandos también incluyen aquellos que reconocen y se unen a compuestos biológicos solubles o circulantes en los fluidos biológicos (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)), para una estrategia terapéutica o detoxificante.
- 25 Si el ligando funcional acoplado a la nanopartícula PLA-PEG es un agente de obtención de imágenes/agente diagnóstico, entonces se puede emplear la nanopartícula para obtener imágenes/diagnosticar una enfermedad o una imperfección en el cuerpo. Tales agentes de obtención de imágenes/diagnósticos se pueden elegir en particular entre óxido de hierro, complejos de gadolinio, verde de indocianina, sondas fluorescentes cercanas al infrarrojo, emisores de positrones (por ejemplo, ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu).
- 30 Los ligandos funcionales tales como sustancias que responden a estímulos se puede utilizar para guiar las nanopartículas de PLA-PEG al sitio previsto utilizando, por ejemplo, campo magnético externo, creando cambios que responden a estímulos locales tales como calor tras la irradiación con luz cercana al infrarrojo. Tales sustancias que responden a estímulos se pueden elegir en particular entre, por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de oro o cualesquiera sustancias que se pueden activar con radiación.
- 35 Los ligandos funcionales tales como agentes de acoplamiento molecular se pueden utilizar para acoplar el fármaco (por ejemplo, mediante el principio de apareamiento de hierro) para protegerlo de la degradación y para suministrarlo a la ubicación apropiada en el cuerpo. Como un ejemplo, el suministro mediante la vía parenteral de oligonucleótidos se puede hacer más eficaz mediante el acoplamiento molecular con PEG-PLA acopladas con oligopéptidos donde el oligopéptido porta una carga eléctrica opuesta a la del oligonucleótido. Tales agentes e acoplamiento molecular se pueden elegir en particular entre oligopéptidos (por ejemplo, polilisina, poli(leucina-lisina), poli(leucina-lisina-lisina-leucina)).
- 40 Los ligandos funcionales tales como agentes que mejoran la penetración celular se pueden utilizar para mejorar la captación celular de las nanopartículas y, así pues, su fármaco encapsulado lo que puede conllevar una mejora en la eficacia del fármaco. Tales agentes de penetración celular se pueden elegir en particular entre secuencias transactivadoras de la transcripción (TAT), penetratina, secuencias de poliarginina, secuencias de proteína VP22, etc.
- 45 Los ligandos funcionales tales como un agente detoxificador se pueden utilizar para la eliminación de sustancias tóxicas de la circulación sistémica. Tales agentes detoxificantes se pueden elegir en particular entre una variedad de sustancias, por ejemplo, agentes quelantes (para la detoxificación de metales), cobalamina, cobinamida, enzima rodanasa (para detoxificar cianuro), enzima que hidroliza organofósforo (para la detoxificación de organofósforo), naloxona, atropina (para la detoxificación de opioides), anticuerpos/fragmentos de anticuerpos que reconocen una toxina específica.
- 50
- 55

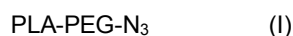
En consecuencia, un ligando, tal como se ha mencionado anteriormente, se puede elegir, por lo tanto, entre:

- 5 ligandos de reconocimiento de la membrana seleccionados entre un antagonista del receptor de estrógeno, un antagonista del receptor de andrógeno, ácido fólico, anisamida, un anticuerpo capaz de reconocer el antígeno superficial correspondiente tal como HER2, transferrina o anticuerpos anti-EGFR, una secuencia RGD que se une a integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobreexpresadas en el endotelio angiogénico tumoral, ácido hialurónico que se une a los receptores CD44, transferrina que se une a los receptores de transferrina, vectores génicos dirigidos a péptidos, aptámeros y factor de necrosis tumoral,
- agentes diagnósticos/de obtención de imágenes seleccionados entre óxido de hierro, complejos de gadolinio, verde de indocianina, sondas fluorescentes cercanas al infrarrojo o emisores de positrones (por ejemplo, ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu),
- 10 sustancias que responden a estímulos seleccionadas entre nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de oro o cualesquiera sustancias que se pueden activar con radiación,
- agentes de acoplamiento molecular seleccionados entre oligopéptidos (por ejemplo, polilisina, poli(leucina-lisina), poli(leucina-lisina-lisina-leucina),
- 15 un agente de penetración celular seleccionado entre secuencias transactivadoras de la transcripción (TAT), penetratina, secuencias de poliarginina o secuencias de la proteína VP22,
- un agente detoxificador seleccionado entre cobalamina, cobinamida, enzima rodanasa, una enzima que hidroliza organofósforo, naloxona, atropina, o anticuerpos/fragmentos de anticuerpos que reconocen una toxina específica; o
- un fármaco seleccionado entre un antibiótico, agente anticancerígeno, agente antivirico, agente antiinflamatorio, un antígeno vacuna o un nutraceutico.

- 20 También se divulga el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (A) anteriores.

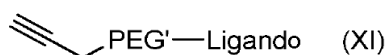
Dicho proceso de preparación de un compuesto de fórmula (A) comprende acoplar:

- un compuesto de fórmula (I):



con

- 25 - un compuesto de fórmula (XI):



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

El acoplamiento se puede realizar mediante la denominada «química click». El término se refiere a cualquier proceso en el que se hace reaccionar un compuesto de tipo azida (N₃) con un grupo alquino para formar un 1,2,3-triazol.

- 30 La reacción de acoplamiento mediante química click se puede llevar a cabo de acuerdo con la reacción de Huisgen aplicando o adaptando cualquier proceso experimental de Huisgen conocido por lo general por el experto en la técnica en particular en referencia a las condiciones divulgadas en *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015. Por lo general dicha reacción de acoplamiento mediante química click se lleva a cabo de acuerdo con la reacción de Huisgen, ya sea en condiciones orgánicas o acuosas.

- 35 Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma de una solución en un disolvente orgánico o en forma de nanopartículas en un medio acuoso, que contiene opcionalmente compuestos de fórmula (I') tal como se definen más adelante.

- 40 En condiciones orgánicas, dicha reacción de acoplamiento mediante química click se lleva a cabo normalmente en presencia de bromuro de cobre (I) (CuBr) y *N,N,N',N',N''*-pentametildietilenoetriamina (PMDETA) (*Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015). Esta reacción se puede realizar, entre otros, en un disolvente orgánico tal como dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), tolueno, sulfóxido de dimetilo (DMSO), a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, convenientemente en condiciones anhidras. Por lo general, se utilizaron exceso del compuesto de fórmula (XI).

- 45 En condiciones acuosas, dicho acoplamiento mediante química click se lleva a cabo normalmente de acuerdo con *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015, en particular en presencia de agua y derivados de cobre tales como CuSO₄·5H₂O. Puede ser conveniente la presencia de un agente reductor para el catalizador, tal como ascorbato de sodio. Por lo general, se utilizan condiciones acuosas cuando los compuestos de fórmula (I) están en forma de nanopartículas, en particular, en una suspensión acuosa.

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

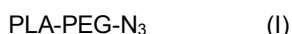


donde PLA y PEG se definen como en la fórmula (A) y R es H o un alquilo C₁-C₆, tal como metilo.

- 5 Se divulgan compuestos de fórmula (I') donde R es metilo en, por ejemplo, el documento US 5 683 723.

Si es necesario, la suspensión de nanopartículas también puede incluir un agente estabilizante tal como alcohol polivinílico (PVA), Pluronic® (por ejemplo, Pluronic® F68) o colato de sodio.

También se divulga un compuesto de fórmula (I):



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

Los compuestos de fórmula (I) pueden formar nanopartículas.

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



como los definidos anteriormente.

- 15 Se ilustran dichas nanopartículas en la Figura 1.

Se pueden obtener dichas nanopartículas nanoprecipitando uno o más compuestos idénticos o diferentes de fórmula (I) como los definidos anteriormente, opcionalmente en presencia de uno o más compuestos idénticos o diferentes de fórmula (I').

- 20 La nanoprecipitación se puede llevar a cabo de acuerdo con el método divulgado anteriormente con respecto a nanopartículas que comprenden uno o más compuestos de fórmula (A).

La nanopartícula que comprende compuestos de fórmula (A) también se puede preparar haciendo reaccionar una nanopartícula que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) y descritos más adelante con uno o más compuestos de fórmula (XI) como los definidos anteriormente, a lo que opcionalmente sigue la encapsulación no covalente o conjugación covalente de un fármaco.

- 25 El proceso es sumamente versátil en el sentido de que permite una modificación fácil de las funcionalidades de las nanopartículas formadas por los compuestos de fórmula (A).

El proceso incluye la posibilidad de alterar o ajustar según se desee la densidad de los ligandos sobre la superficie de las nanopartículas mezclando los compuestos de fórmula (I) con el copolímero de PLA-PEG en diferentes proporciones de manera que se preparen nanopartículas que comprendan compuestos de fórmula (I) o (A) junto con copolímeros de PLA-PEG que no están funcionalizados con un grupo azida (remítase a la Figura 1), haciendo reaccionar dichas nanopartículas a continuación con los compuestos de fórmula (XI).

- 30 El proceso permite el uso de compuestos de fórmula (I) o (A) utilizando diferentes longitudes de cadena de PEG y PLA (remítase a la Figura 2) para diversas aplicaciones. Por ejemplo, se pueden acoplar sustancias terapéuticas que son sensibles a la degradación en un compartimento sistémico (por ejemplo, oligonucleótidos) mediante un agente de acoplamiento molecular ligando al PLA-PEG que contiene PEG con una longitud de cadena corta y mezclarlas a continuación con copolímero de PLA-PEG compuesto por PEG de cadena larga, de manera que el PEG de cadena larga forme una superficie de tipo cepillo en la cual la sustancia terapéutica esté enmascarada y, por lo tanto, protegida de la degradación rápida en la circulación sistémica.

- 35 Además, el proceso permite combinar diferentes tipos de PLA-PEG-ligando funcional (por ejemplo, PLA-PEG-dispositivo autoguiado + PLA-PEG-agente de obtención de imágenes + PLA-PEG-sustancia que responde a estímulos) para la formación de nanopartículas multifuncionales para aplicaciones combinatorias (remítase a la Figura 3).

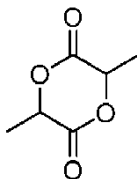
- 40 Los compuestos de fórmula (I) son fundamentales ya que actúan como una plataforma copolimérica biodegradable utilizable en química click, en la cual se podría acoplar cualquier alquino-ligando funcional utilizando química click (mediante los compuestos de fórmula (XI)), para una variedad de aplicaciones dependiendo del tipo de ligando funcional, tal como suministro farmacológico, obtención de imágenes, detoxificación, etc. Por lo tanto, las ventajas incluyen entre otras la flexibilidad de sintetizar una variedad de nanopartículas copoliméricas acopladas a un ligando funcional que se podrían administrar por vía parenteral. Asimismo, la densidad del ligando funcional en la superficie de la nanopartícula se podría ajustar mezclando proporciones apropiadas de los compuestos de fórmula (I) y los compuestos de fórmula (I'). Además, las nanopartículas se pueden construir de manera que posean porciones PEG

con diferentes longitudes de cadena, para facilitar el suministro intravenoso de sustancias terapéuticas que sean sensibles químicamente en la circulación sistémica. Además, la reacción click para el acoplamiento de ligando funcional se puede llevar a cabo antes de la formación de la nanopartícula o en la nanopartícula preformada, dependiendo de la naturaleza química del ligando.

- 5 También se divulga un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I), que comprende el paso de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



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



10

y después, cuando X es un átomo halógeno, se hace reaccionar el compuesto obtenido de fórmula (III):



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

- 15 La reacción con la lactida se lleva a cabo por lo general mediante una polimerización con apertura de anillo (ROP, por sus siglas en inglés). Normalmente, esta reacción se lleva a cabo en presencia de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Se puede llevar a cabo al por mayor, por lo general con calentamiento, o en un disolvente orgánico adecuado con un punto de ebullición elevado tal como tolueno o xileno.

- 20 Por lo general, la cantidad de los compuestos de tipo lactida depende de la n deseada en el compuesto de fórmula (I) pero se sabe que la reacción siempre se puede detener antes de la finalización. Normalmente, la proporción molar entre el macroiniciador PEG y el catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ está comprendida entre 1 y 10.

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

- 25 La reacción con NaN_3 se realiza por lo general en un disolvente orgánico aprótico tal como DMF, dimetilacetamida (DMA), acetona, etc., con un exceso de NaN_3 .

El compuesto de fórmula (II):



se puede preparar a partir de un compuesto de fórmula (IV):



- 30 donde Pg representa un grupo protector de hidroxilo tal como bencilo (fenil- CH_2 -) y PEG es tal como se define en la fórmula (A)

mediante una reacción de sustitución, seguida por una reacción de desprotección.

- 35 Un grupo protector Pg, tal como se ha mencionado anteriormente, corresponde a un grupo que permite, por una parte, la protección de una función reactiva tal como un hidroxilo o una amina durante un paso de síntesis y, por otra parte, recuperar la función reactiva intacta al final del paso de síntesis. Se proporcionan ejemplos de grupos protectores, así como también de métodos para proteger y desproteger diversos grupos funcionales, en P. G. M. Wuts y T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4. ed. (2007), John Wiley & Sons y en J. F. W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

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

Cuando se va a sustituir un grupo halógeno, esta reacción se realiza por lo general con el reactivo de tipo *N*-halogenosuccinimida apropiado con PPh_3 en un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano.

Cuando se va a sustituir un grupo azida, se puede realizar una sustitución inicial con un grupo saliente de la siguiente manera:

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

5 Un «grupo saliente», tal como se utiliza en la presente, corresponde a un grupo que se puede escindir fácilmente de una molécula rompiendo un enlace heterolítico ((es decir) un enlace cuya fisión genera un catión y un anión), con pérdida del par electrónico. A continuación, este grupo se puede reemplazar fácilmente por otro grupo funcional, durante, por ejemplo, una reacción de sustitución. Tales grupos salientes pueden estar constituidos por átomos halógenos o grupos hidroxilo activados tales como grupos mesilato, tosilato, triflato o acetilo. Se proporcionan
 10 ejemplos de grupos salientes, así como también las referencias que se refieren a su preparación, en «Advances in Organic Chemistry», J. March, 3.^a edición, Wiley Interscience, págs. 310-316.

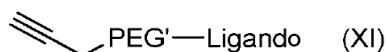
Por ejemplo, en el paso 1), el grupo saliente es un mesilato y, por lo tanto, la sustitución se lleva a cabo en presencia de cloruro de mesilo (MsCl). La reacción se realiza normalmente en presencia de DMAP, en un disolvente orgánico tal como diclorometano.

15 La sustitución del grupo saliente con el grupo azida en el paso 2) se puede llevar a cabo en presencia de azida de sodio, en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF.

El paso de desprotección comprende hidrolizar el grupo protector Pg del compuesto de tipo azido o halógeno sustituido, de manera que se obtenga el compuesto de fórmula (II).

La hidrólisis se lleva a cabo normalmente en condiciones ácidas, de acuerdo con procedimientos muy conocidos, en particular utilizando HCl concentrado cuando Pg- es fenil-CH₂-.

De acuerdo con un objeto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (XI):

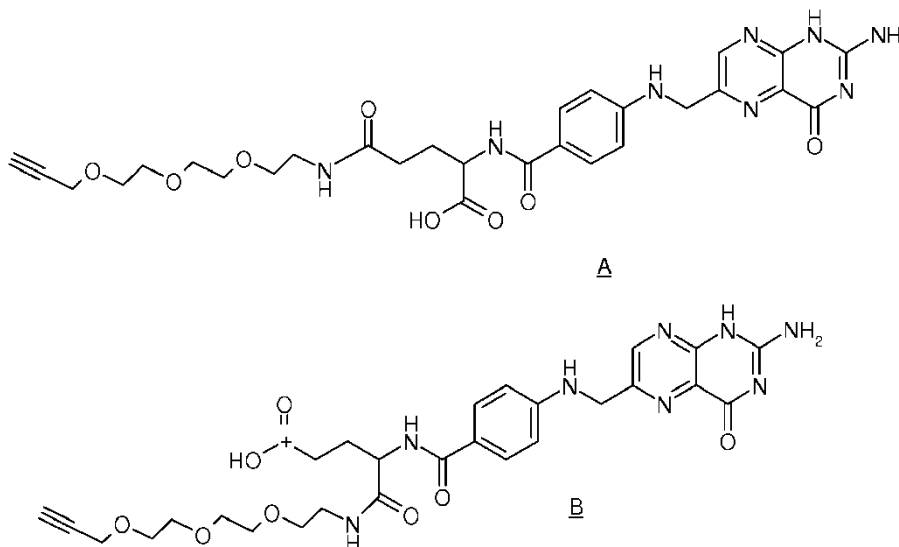


donde

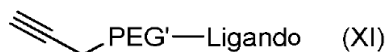
el conector PEG' es un resto de polietilenglicol; y

25 el ligando es un resto de ligando funcional de ácido fólico,

escogiéndose dicho compuesto entre A y B, que son como sigue:

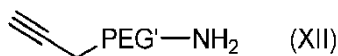


30 De acuerdo con un objeto adicional, la presente invención también se refiere a un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (XI):



que comprende acoplar

- un compuesto de fórmula (XII);



con

5 - un ligando precursor

donde PEG' y el ligando se definen como en la fórmula (A) anterior.

Un «ligando precursor» es un compuesto que, cuando se hace reaccionar con el grupo -NH₂ de un compuesto de fórmula (XII) da lugar al grupo -ligando, donde el ligando es un resto de un ligando funcional tal como se ha definido en la fórmula (A).

10 Dicho acoplamiento se puede llevar a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico, en presencia de una base.

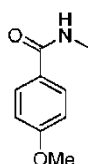
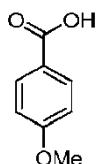
Dicho agente de acoplamiento peptídico se puede escoger entre agentes de acoplamiento peptídicos conocidos y más especialmente entre PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) o EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/*N*-hidroxisulfosuccinimida).

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

En lo que se refiere a combinaciones particulares, en una realización, se utiliza PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) con *N,N*-diisopropiletildiamina (DIPEA) y, en otra realización, se utiliza EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/*N*-hidroxisulfosuccinimida) con trietilamina.

20 La reacción se puede realizar en un disolvente orgánico adecuado tal como diclorometano, DMF o sulfóxido de dimetilo (DMSO).

Los precursores de ligandos representativos incluyen:



que es un precursor de anisamida, que da lugar al ligando- = $\text{—NH—C(=O)—(CH}_2\text{)}_2\text{—FP547}$ que es un resto de anisamida;

ácido fólico;

25 FP-547-NHS que da lugar al ligando- = -NH-C(=O)-(CH₂)₂-FP547 que es un resto de FP547.

De acuerdo con una realización, el compuesto de fórmula (XII) se puede preparar:

- haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (XIII):



con un compuesto de fórmula (XIV):

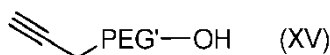
30



y una base,

donde PEG' se define como en la fórmula (A) y Hal' representa un átomo de halógeno, tal como Br,

para formar el compuesto de fórmula (XV):



35 y después:

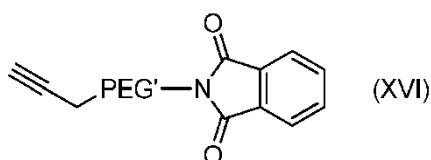
- transformando el compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII).

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

La transformación del compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII) se puede lograr mediante varios métodos.

5 En particular, puede comprender:

- hacer reaccionar el compuesto de fórmula (XV) con ftalimida y PPh_3 para formar el compuesto de fórmula (XVI):



y después:

- hacer reaccionar el compuesto de fórmula (XVI) con hidrato de hidrazina para formar el compuesto de fórmula (XII).

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

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

15 Como alternativa, la transformación del compuesto de fórmula (XV) en el compuesto de fórmula (XII) comprende:

- hacer reaccionar el compuesto de fórmula (XV) con un compuesto de fórmula (XVII):



donde Lg es un grupo saliente y Hal'' es un átomo halógeno,

para formar el compuesto de fórmula (XVIII):



y después:

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

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

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

30 La reacción del compuesto obtenido de fórmula (XVIII) se realiza por lo general añadiendo en primer lugar ftalato de potasio y cantidades catalíticas de yoduro de sodio (NaI) en un disolvente tal como DMF, y después eliminando el disolvente y añadiendo hidrato de hidrazina ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un disolvente tal como etanol.

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

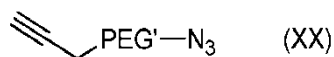
- haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (XIX):



con un compuesto de fórmula (XIV):



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



y después:

- haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (XX) con trifetilfosfina (PPh_3), lo que da lugar al compuesto de fórmula (XII).

- 5 La reacción de un compuesto de fórmula (XIX) con el compuesto de fórmula (XIV) se realiza por lo general en presencia de una base, tal como NaH, en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF.

La reacción del compuesto de fórmula (XX) con trifetilfosfina (PPh_3) se lleva a cabo por lo general en un disolvente tal como tetrahidrofurano (THF), opcionalmente en presencia de agua.

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



donde Pg se define como la fórmula (VI), mediante una reacción de sustitución y después una reacción de desprotección.

Las reacciones de sustitución y desprotección se pueden llevar a cabo como con respecto al compuesto (II) tal como se ha analizado anteriormente.

- 15 El proceso de la invención también puede comprender el paso de aislar o purificar los compuestos obtenidos después de cada paso si se desea o necesita y/o llevar a cabo los pasos deseados en secuencia.

Por lo tanto, los compuestos preparados se pueden recuperar de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos se pueden recuperar eliminando el disolvente de la mezcla de reacción por destilación o, si es necesario después de eliminar el disolvente de la mezcla de reacción por destilación, vertiendo el residuo en agua a lo que sigue la extracción con un disolvente orgánico miscible en agua y la eliminación del disolvente del extracto por destilación. Adicionalmente, si se desea, el producto se puede purificar posteriormente mediante diversas técnicas muy conocidas tales como la recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas cromatográficas, especialmente cromatografía en columna o cromatografía en capa fina preparativa.

- 25 En los procesos anteriores, a menos que se indique lo contrario, los compuestos y reactivos de partida están comercializados o descritos en la bibliografía o se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en la bibliografía, tal como se divulga en los siguientes ejemplos o tal como sabe un experto en la técnica.

- 30 Las variaciones de los procesos descritos anteriormente pueden ser reconocidas por el experto si son necesarias y también son parte de la invención. Las modificaciones y sustituciones apropiadas son evidentes y muy conocidas por los expertos en la técnica o estos las pueden obtener fácilmente a partir de la bibliografía científica. En particular, se pueden consultar métodos de este tipo en R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers, 1989.

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

- 35 Por lo tanto, se divulga un medicamento, el cual comprende al menos un compuesto de fórmula (A), opcionalmente en forma de una nanopartícula.

Se divulga una composición farmacéutica, la cual comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (A) opcionalmente en forma de una nanopartícula con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Estas composiciones farmacéuticas comprenden una dosis eficaz de al menos un compuesto (A) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 Dichos excipientes se eligen de acuerdo con la forma farmacéutica y la vía de administración deseada, entre los excipientes normales conocidos por el experto en la técnica.

- 45 En las composiciones farmacéuticas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica o rectal el principio activo se puede administrar a animales y seres humanos, mezclado con excipientes farmacéuticos normales, como una forma farmacéutica unitaria.

Las formas farmacéuticas unitarias apropiadas comprenden las formas orales tales como comprimidos, cápsulas de gelatina duras o blandas, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, las formas sublinguales, bucales, intratraqueales, intraoculares, intranasales, las formas por inhalación, tópicas, transdérmicas, subcutáneas,

intramusculares, intravenosas o intraarteriales, las formas rectales y los implantes. Para la aplicación tópica, los compuestos se pueden utilizar como cremas, geles, pomadas o lociones.

Como un ejemplo, una forma farmacéutica unitaria para un compuesto tal como se divulga aquí, en forma de un comprimido, puede comprender los siguientes ingredientes:

Compuesto tal como se divulga aquí	50.0 mg
Manitol	223.75 mg
Croscarmelosa de sodio	6.0 mg
Almidón de maíz	15.0 mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	2.25 mg
Estearato de magnesio	3.0 mg

5

En casos específicos, pueden ser apropiadas dosificaciones más elevadas o más bajas. De acuerdo con la práctica habitual, la dosificación adecuada para cada paciente la puede determinar el médico de acuerdo con la vía de administración, el peso y la respuesta del paciente.

FIGURAS

10 La Figura 1 ilustra una superficie de nanopartículas utilizables en química click de PLA-PEG-N₃ expuesta con una densidad diferente de N₃. La densidad de N₃ de la superficie de la nanopartícula se puede alterar según se desee mezclando una proporción adecuada de PLA-PEG-N₃ con el copolímero de PLA-PEG.

15 La Figura 2 ilustra una nanopartícula utilizable en química click de PLA-PEG sintetizada utilizando diferentes longitudes de cadena de PEG (más cortas y más largas) para facilitar la carga y suministro intravenoso de sustancias químicamente sensibles (por ejemplo, oligonucleótidos).

La Figura 3 ilustra una nanopartícula multifuncional preparada mezclando una variedad de copolímeros de PLA-PEG-ligando funcional en proporciones adecuadas para aplicaciones combinatorias (por ejemplo, una nanopartícula que contiene un dispositivo autoguiado, agente de obtención de imágenes, agente que responde a estímulos).

20 La Figura 4 representa la evaluación de la capacidad de unión al receptor de las nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico utilizando experimentos de resonancia de plasmones superficiales. El gráfico indica la evolución de la señal específica (unidad de resonancia, RU observadas) respecto a la concentración de ácido fólico en las nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico.

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

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

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

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

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen la síntesis de algunos compuestos de acuerdo con la invención. No se pretende que estos ejemplos sean limitantes y únicamente ilustran la presente invención. Los números de los compuestos ejemplificados se refieren a los de la tabla que se proporciona más adelante, los cuales ilustran las estructuras químicas y las propiedades físicas de varios compuestos de acuerdo con la invención.

40

Abreviaturas:

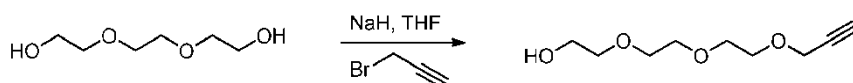
	MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxiimetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolio
	ACN	Acetonitrilo
	N ₃	Azida
	Bz	Bencilo
5	PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
	CuBr	Bromuro de cobre (I)
	CuSO ₄	Sulfato de cobre (II)
	cHex	Ciclohexano
	Da	Dalton
10	DCM	Diclorometano
	Et ₂ O	Éter dietílico
	DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
	DMSO	Sulfóxido de dimetilo
	DMAP	Dimetilaminopiridina
15	DMF	Dimetilformamida
	DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
	DLS	Dispersión de luz dinámica
	EPR	Permeabilidad y retención mejoradas
	equiv., Eq.	Equivalente
20	EtOH	Etanol
	AcOEt	Acetato de etilo
	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
	FBS	Suero bovino fetal
	FC	Canal de flujo
25	FP-547	Fluoprobe-547
	FBP	Proteína de unión a folato
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	N ₂ H ₄ .H ₂ O	Hidrato de hidrazina
	HBr	Ácido bromhídrico
30	HCl	Ácido clorhídrico
	IgG	Inmunoglobulina G
	MgSO ₄	Sulfato de magnesio
	MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
	MeOH	Metanol
35	OMe	Metoxi
	EDC	Clorhidrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
	PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -Pentametildietilenotriamina

	DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
	NP	Nanopartícula
	NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
	NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
5	RMN	Resonancia magnética nuclear
	<i>M_n</i>	Peso molecular promedio numérico
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	PLA	Ácido poli(D,L-láctico)
	PLGA	Poli(D,L-lactida-co-glicólido)
10	PEG	Polietilenglicol
	Pdl	Índice de polidispersidad
	PVA	Alcohol polivinílico
	R.U.	Unidad de resonancia
	ROP	Polimerización con apertura de anillo
15	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
	NaN ₃	Azida de sodio
	NaCl	Cloruro de sodio
	NaCh	Colato de sodio
20	NaH	Hidruro de sodio
	NaOH	Hidróxido de sodio
	NaI	Yoduro de sodio
	Sn(Oct) ₂	Octoato estañoso
	SPR	Resonancia de plasmones superficiales
25	THF	Tetrahidrofurano
	Et ₃ N (TEA)	Trietilamina
	PPh ₃	Trifenilfosfina
	Mw	Peso molecular promedio ponderal

Ejemplo 1: Preparación de precursores para obtener nanopartículas

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

1. Procedimiento para la síntesis de monoalquinopoli(etilenglicol) (Preparación 1 A)



Procedimiento experimental:

35 Se disolvió trietilenglicol (Sigma-Aldrich, 5620 mg, 37.4 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (50 mL) y la solución resultante se enfrió hasta 0 °C en condiciones secas. Se añadió lentamente hidruro de sodio (988 mg, 1.1 equiv.) seguido por la adición gota a gota de bromuro de propargilo (80% en peso en tolueno, 4360 µL, 1.1 equiv.). La reacción se agitó durante 12 h a la temperatura ambiente en una atmósfera inerte.

Proceso de tratamiento:

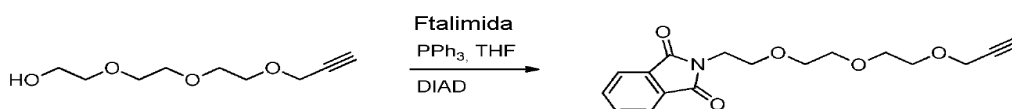
- 5 Se eliminó el THF a presión reducida, se añadió cloruro de metileno al residuo (diclorometano, DCM) y se lavó varias veces con salmuera. La fase orgánica resultante se secó con sulfato de magnesio (MgSO_4), se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: ciclohexano (cHex)/acetato de etilo (AcOEt): 8/2) y se recuperaron 3.31 g de un aceite amarillo (47% de rendimiento).

Caracterización por RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.70 - 3.60 (m, 10H), 3.57 - 3.53 (m, 2H), 2.70 (m, 1H), 2.41 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H).

- 10 2. La síntesis del compuesto de tipo ftalimida-alquinotrietilenglicol se ha realizado utilizando dos rutas diferentes, bien en un paso o bien en dos pasos a través de un intermedio de tipo mesilato.

2a) Procedimiento de un paso para la síntesis de ftalimida-alquinotrietilenglicol (Preparación 1B)

Procedimiento experimental:

- 15 Se disolvieron la preparación 1A (2000 mg, 10.6 mmol, 1 equiv.), ftalimida (2345 mg, 1.5 equiv) y trifetilfosfina (4179 mg, 1.5 equiv) en THF anhidro (50 mL) en condiciones secas. Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (3.14 mL, 1.5 equiv.) lentamente y la reacción se agitó durante 48 h a la temperatura ambiente en una atmósfera inerte.

Proceso de tratamiento:

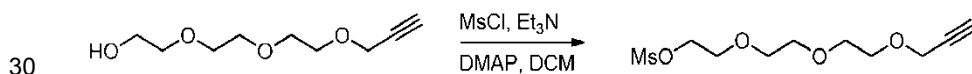
- 20 Se eliminó el THF a presión reducida, se añadió DCM al residuo y se lavó varias veces con salmuera. La fase orgánica resultante se secó con MgSO_4 , se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: cHex/AcOEt: 8/2) y se recuperaron 3.37 g de un aceite amarillo (60% de rendimiento).

Caracterización por RMN:

- 25 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (dd, $J = 5.4, 3.1$ Hz, 2H), 7.64 (dd, $J = 5.4, 3.1$ Hz, 2H), 4.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.74 (dt, $J = 11.4, 6.0$ Hz, 4H), 3.60 - 3.50 (m, 8H), 2.38 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H).

2b) Para la síntesis de dos pasos de ftalimida-alquinotrietilenglicol, se sintetizó en primer lugar el mesilato de la siguiente manera:

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

Procedimiento experimental:

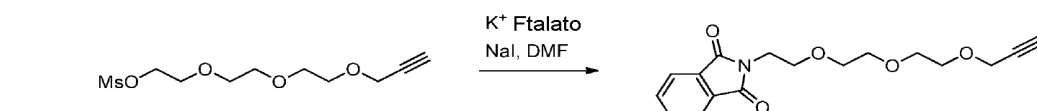
A una solución de alquino-trietilenglicol (preparación 1A, 4 g, 212 mmol, 1 equiv.) en DCM (60 mL) se añadió en una atmósfera inerte una cantidad catalítica de DMAP, cloruro de metanosulfonilo (3.3 mL, 2 equiv.) y trietilamina (5.9 mL, 2 equiv.) gota a gota. La reacción se agitó durante 4 h a la temperatura ambiente.

35 Proceso de tratamiento:

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

El producto final participó directamente (sin caracterización) en el siguiente paso.

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



40

Procedimiento experimental:

A una solución de mesil-alquino-trietilenglicol (Preparación 1C, 5.1 g, 19.2 mmol, 1 equiv.) en DMF (100 mL) se añadió ftalato de potasio (7.87 g, 2.2 equiv.) y una cantidad catalítica de yoduro de sodio (menos de un equivalente, por ejemplo, una punta de espátula). La solución se agitó a 80 °C durante toda la noche y el disolvente se eliminó a presión reducida.

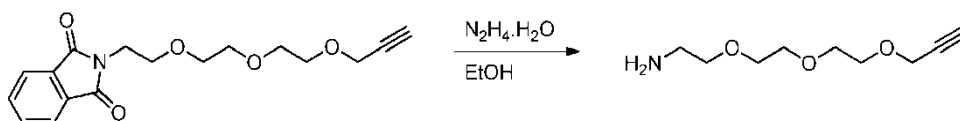
Proceso de tratamiento:

El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: cHex/AcOEt: de 2/8 a 4/6). Se recuperaron 5.7 g de aceite amarillo (94% de rendimiento).

Caracterización por RMN:

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 7.69 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 4.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.80 (dt, *J* = 11.4, 6.0 Hz, 4H), 3.65 - 3.56 (m, 8H), 2.40 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

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

Procedimiento experimental:

Se disolvió la preparación B (2034 mg, 6.4 mmol, 1 equiv.) en etanol (EtOH) (200 mL) y se añadió hidrato de hidrazina (3.1 mL, 10 equiv). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche en condiciones de reflujo.

Proceso de tratamiento:

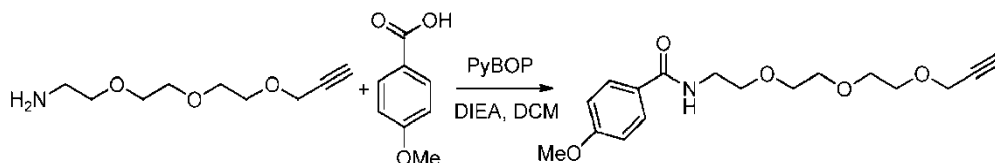
La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadieron a la reacción 8 mL de ácido clorhídrico concentrado (pH~2-3). El precipitado se eliminó por filtración y el pH se elevó por encima de 10 utilizando NaOH (2 M). La fase acuosa se extrajo tres veces con DCM. La fase orgánica resultante se secó con MgSO₄, se filtró, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. Se recuperaron 911 mg de aceite amarillo (76% de rendimiento).

Caracterización por RMN:

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 4.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.69 - 3.50 (m, 8H), 3.43 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.33 (s, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 79.64, 74.53, 73.47, 70.59, 70.40, 70.25, 69.09, 58.37, 41.80.

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

1) Procedimiento para la síntesis de anisamido-alquino-trietilenglicol (Preparación 2A)

Procedimiento experimental:

A una solución de la preparación 1E (200 mg, 1.07 mmol, 1 equiv.) en DCM (20 mL) se añadió, en una atmósfera inerte, PyBOP (780 mg, 1.4 equiv.), ácido *p*-metoxibenzoico (229 mg, 1.4 equiv.) y DIEA (260 μL, 1.4 equiv.). La reacción se agitó durante toda la noche a la temperatura ambiente.

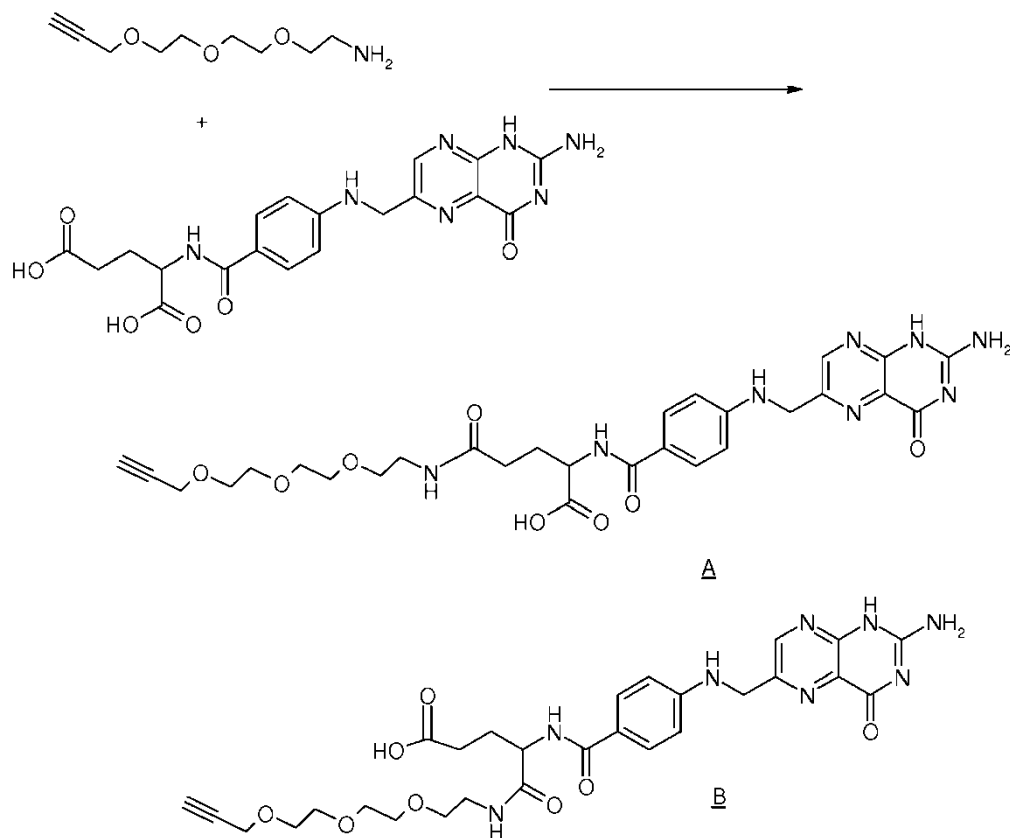
Proceso de tratamiento:

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

Caracterización por RMN:

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.84 (ancho, 1H), 4.14 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.71 - 3.53 (m, 12H), 2.42 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

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

Procedimiento experimental:

- 5 A una solución de la preparación 1E (319 mg, 1.70 mmol, 1 equiv.) en DMF (70 mL) se añadió, en una atmósfera inerte, EDC (393 mg, 1.2 equiv.), NHS (236 mg, 1.2 equiv.) y unas pocas gotas de trietilamina (Et_3N). La reacción se calentó hasta 50 °C y se añadió ácido fólico (Sigma-Aldrich, 754 mg, 1 equiv.) a la mezcla de reacción. A continuación, la reacción se agitó durante toda la noche a 50 °C.

Proceso de tratamiento:

- La solución se concentró a presión reducida. El residuo se precipitó en DCM y acetona, se filtró y se secó al vacío.
- 10 El producto obtenido se analiza en una columna de fase inversa (C18, Kromasil 10 μm , 4.6x250mm), por ejemplo, utilizando un gradiente de un 5 a un 95% de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio (ajustado a pH 5) 20 mM en 20 min, después un 95% de acetonitrilo durante 5 min.
- 15 El producto se solubiliza en un 20% de DMF en el eluyente. La purificación se lleva a cabo en Kromasil C18 10 μm empaquetado en una columna de 100 mm (1.5 kg de fase) y elución en un 85% de tampón de acetato de amonio pH 5, 20 mM y un 15% de acetonitrilo.

Se eluyen 200 mg del producto crudo a la vez que el pico de inyección de DMF.

Proceso de purificación (Compuesto B):

- La purificación final se realiza solubilizando 200 mg del producto crudo utilizando HPLC preparativa con una columna de fase inversa XBridge C18 (30x100 mm), 5 μm de Waters.
- 20 El producto se disuelve en primer lugar en DMSO (5 mL) y 5 mL de solución tampón (carbonato de amonio 10 mM ajustado a pH 9.3 con una solución acuosa de amoniaco al 28%). Se realizaron 10 inyecciones de 1 mL utilizando un gradiente desde 95:5 (solución tampón (carbonato de amonio)/acetonitrilo) hasta 5:95 en 12 min a 30 mL/min.

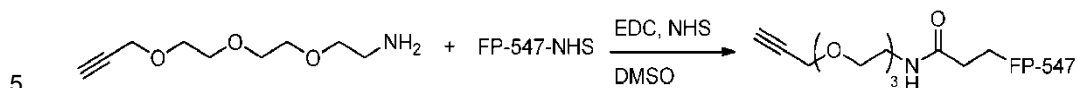
Caracterización por RMN (Compuesto B):

- 25 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.0-11.0 (s ancho, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.29 (s ancho, 1H), 7.8 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.03 (s ancho, 2H), 6.85 (t ancho, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.44 (d, $J = 6.5$

Hz, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.12 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.57 - 3.36 (m, 11H), 3.35 - 3.1 (m, 2H), 2.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.91 (m, 2H). Caracterización por LCMS:

611 [M+H]⁺

3) Procedimiento para la síntesis de FP547-alquinoetrietilenglicol (Preparación 2C)



Procedimiento experimental:

A una solución de FP-547-NHS (Interchim, 2.5 mg, 2.55 μmol , 1 equiv.) en DMSO (356 μL) se añadió una solución de DMSO (92 μL) que contenía EDC (0.49 mg, 1 equiv.), NHS (0.29, 1 equiv.), TEA (0.35 μL , 1 equiv.) y la preparación 1E (1.07 mg, 2.2 equiv.).

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

Proceso de tratamiento:

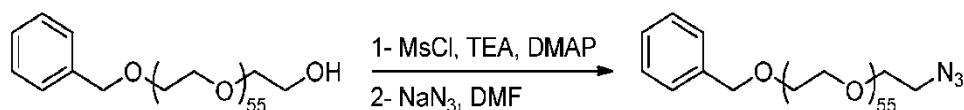
La reacción se concentró a presión reducida, se disolvió en DCM y se extrajo con salmuera. Se obtuvo un aceite rosa.

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

15 Los espectros obtenidos fueron similares a los que proporciona la fuente comercial del compuesto fluoróforo.

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

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



Procedimiento experimental:

20 A una solución de PEG2500-bencilo (fuente del polímero, $M_n = 2572$ g.mol⁻¹, 2.43 g, 0.94 mmol, 1 equiv.), DMAP (58 mg, 0.5 equiv.) y TEA (747 μL , 5.6 equiv.) en DCM (65 mL), enfriada hasta 0 °C, se añade lentamente MsCl (326 μL , 4.4 equiv.) a lo largo de 20 min. La reacción se agita durante toda la noche a la temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El residuo se disuelve en DMF (20 mL) y se añade azida de sodio (330 mg, 5.3 equiv.) a la solución. La reacción se agita a 50 °C durante 24 h.

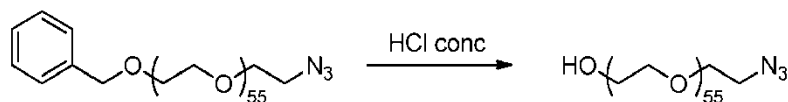
25 Proceso de tratamiento:

La reacción se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con salmuera (tres veces con 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra a presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Este último se precipita en éter dietílico. Se obtienen 2.16 g de un polvo blanco.

Caracterización por RMN:

30 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 - 7.05 (m, 5H), 4.43 (s, 2H), 3.93 - 3.03 (m, 222H), 3.27 (t, 2H).

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



Procedimiento experimental:

35 Se solubiliza la preparación 3A (2.16 g, 0.83 mmol, 1 equiv.) en HCl concentrado (20 mL) y se agita a la temperatura ambiente durante 2 días.

Proceso de tratamiento:

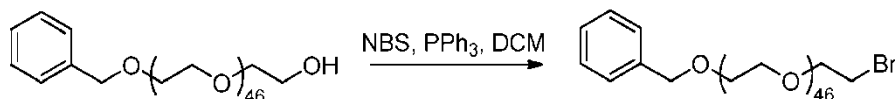
La solución se basicifica hasta pH 1 con una solución de NaOH conc. La fase acuosa se extrae con DCM (cuatro veces con 50 mL) y las fases orgánicas combinadas se secan con sulfato de magnesio, se filtran y se concentran a

presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Este último se precipita en éter dietílico. Se obtienen 1.89 g de un polvo blanco.

Caracterización por RMN:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3.73 - 3.33 (m, 222H), 3.27 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.75 (s, 1H).

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



Procedimiento experimental:

10 A una mezcla de PEG2100-bencilo preparado según Nicolas *et al. Macromol* 2008, 41, 8418 ($M_n = 2176 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 500 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) y NBS (50 mg, 1.2 equiv.) se añade una solución fría de trifetilfosfina (PPh_3) (75 mg, 1.2 equiv.) en DCM (50 mL). La reacción se agita a continuación durante toda la noche a la temperatura ambiente.

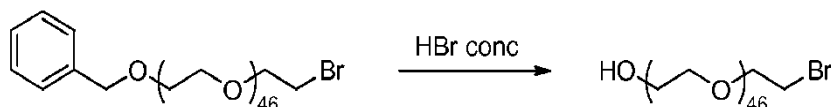
Proceso de tratamiento:

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

Caracterización por RMN:

15 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.30 - 7.16 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.85 - 3.15 (m, 188H)

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



Procedimiento experimental:

20 Se solubiliza la preparación 3C (500 g, 0.22 mmol, 1 equiv.) en HBr concentrado (20 mL) y se agita a la temperatura ambiente durante 2 días.

Proceso de tratamiento:

25 La solución se basicifica hasta pH 1 con una solución de NaOH conc. La fase acuosa se extrae con DCM (cuatro veces con 50 mL) y las fases orgánicas combinadas se secan con MgSO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida hasta un volumen mínimo de DCM. Este último se precipita en éter dietílico para obtener una forma pulverulenta.

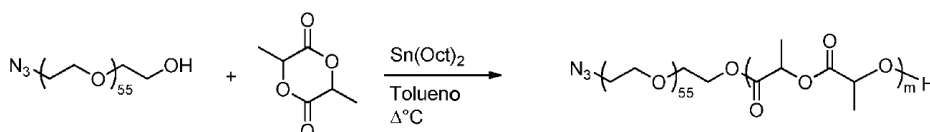
Caracterización por RMN:

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.82 - 3.13 (m, 188H), 2.79 (s, 1H)

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

30 Los compuestos de fórmula (I) se han sintetizado utilizando 2 rutas diferentes. La primera (4A) es de un paso y la segunda (4B) es de dos pasos.

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



donde m es el número de unidades de PLA

35

Procedimiento experimental:

- 5 A una mezcla de azido-poli(etilenglicol) (3B, $M_n = 2507 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 293 mg, 0.12 mmol) y D,L-lactida (7,01 g, 48.62 mmol) se añadió, en condiciones secas, una solución de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (18.7 mg, 46.1 μmol) en tolueno anhidro (11.2 mL). La mezcla de reacción se desgasificó burbujeando argón durante 20 min y a continuación se agitó en un baño de aceite precalentado a 120 °C durante 90 min en una atmósfera inerte. La reacción se detuvo a aproximadamente un 55% de conversión.

Proceso de tratamiento:

El tolueno se eliminó a presión reducida y el producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó posteriormente en éter dietílico. A continuación, se disolvió el precipitado en una cantidad mínima de THF, se precipitó posteriormente en agua y después se liofilizó durante toda la noche para generar un polvo blanco.

10 Caracterización por RMN:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.41 - 4.83 (m, 456H), 4.38 - 4.15 (m, 3H), 3.84 - 3.40 (m, 220H), 3.36 (t, $J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H), 1.82 - 1.21 (m, 1372H).

Tabla 1:

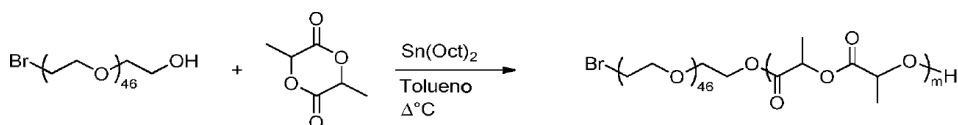
Mn (teórico)	m teórico (unidad de PLA)	Mn experimental (RMN)	m medido (unidad de PLA)
62460	415	35340	228

Mn = peso molecular promedio numérico determinado por RMN

Teórico: con un 100% de conversión

NB : Se han sintetizado y utilizado diferentes lotes del polímero de la preparación 4A.

El valor de m varía en cada lote. Normalmente m estuvo comprendido entre 180 y 250.

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

donde m es el número de unidades de PLA

Procedimiento experimental:

- 20 A una mezcla de bromo-poli(etilenglicol) (3D, $M_n = 2149 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 49 mg, 22.8 mmol) y D,L-lactida (0,72 g, 4.97 mmol) se añadió, en condiciones secas, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (1 mg, 2.5 μmol). La mezcla de reacción se desgasificó con argón durante 20 min y a continuación se agitó en condiciones al por mayor en un baño de aceite precalentado a 120 °C durante 20 horas en una atmósfera inerte. La reacción se detuvo cuando la conversión fue total.

Proceso de tratamiento:

- 25 El producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó posteriormente en éter dietílico. A continuación, se disolvió el precipitado en una cantidad mínima de THF, se precipitó posteriormente en agua y después se liofilizó durante toda la noche para generar un polvo blanco.

Tabla 2:

Mn (teórico)	m teórico (unidad de PLA)	Mn experimental (RMN)	m medido (unidad de PLA)
33510	218	34120	222

Mn = peso molecular promedio numérico determinado por RMN

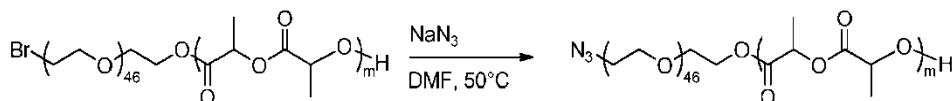
Teórico: con un 100% de conversión

Mn (teórico)	m teórico (unidad de PLA)	Mn experimental (RMN)	m medido (unidad de PLA)
--------------	---------------------------	-----------------------	--------------------------

$m = (\text{Mn experimental determinado por RMN} - \text{Mn de PEG-Br}) / \text{MW del monómero de lactida} = (34120 - 2100) / 144 = 222$

NB: El valor de m varía en cada lote. Normalmente m estuvo comprendido entre 100 y 300, más especialmente entre 180 y 250.

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



m se define como en la tabla anterior.

5 Procedimiento experimental:

A una solución de la preparación 4B(1) (200 mg, 5.9 μmol , 1 equiv.) en DMF (10 mL) se añade azida de sodio (20 mg, 54 equiv.) en condiciones inertes. A continuación, la reacción se agita a 50 °C durante 3 días en una atmósfera inerte.

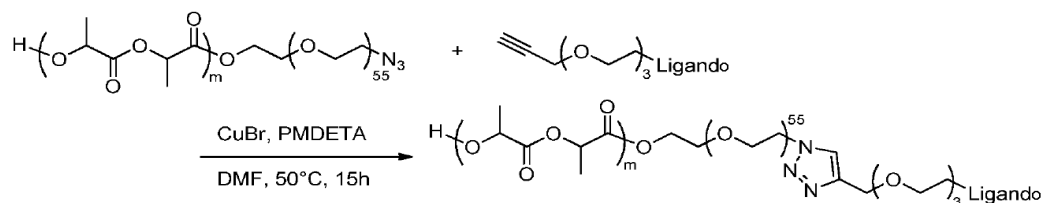
10 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.42 - 4.83 (m, 440H), 4.38 - 4.11 (m, 3H), 3.83 - 3.40 (m, 192H), 3.35 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 1.73 - 1.31 (m, 1320H).

Proceso de tratamiento:

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

Preparación 5: Síntesis de compuestos de fórmula (A)

15 Procedimiento típico para la reacción de Huisgen en condiciones orgánicas



donde m es el número de unidades de PLA, que varía en cada lote.

Ejemplo del procedimiento experimental optimizado:

20 A una solución desgasificada previamente del compuesto de fórmula (I) PLA-PEG- N_3 preparado de acuerdo con el método descrito para las preparaciones 4A (200 mg, cantidad molar dependiendo del lote, en un caso representativo: 6.7 μmol , 1 equiv.) y el derivado de alquino de fórmula (XI) (0.12 mmol, 18 equiv.) en DMF anhidro (2.5 mL) se añadió, con una jeringuilla, una solución desgasificada de CuBr (5.8 mg, 6.1 equiv.) y PMDETA (16.8 μL , 17.8 equiv.) en DMF anhidro (400 μL). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a 50 °C en una atmósfera inerte. Se utilizó la misma metodología para todas las preparaciones.

25 Ejemplo del proceso de tratamiento optimizado:

La solución se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó posteriormente en agua. El precipitado se liofilizó, se disolvió de nuevo en una cantidad mínima de THF y se precipitó posteriormente en agua. El precipitado se liofilizó para generar un polvo blanco.

30 Si el derivado de alquino es insoluble en agua, entonces se puede añadir un paso intermedio donde se disuelve el primer precipitado liofilizado en una cantidad mínima de DCM y se precipita posteriormente en éter dietílico.

El último paso debería ser una precipitación de THF en agua. Además, se pueden añadir pasos de purificación si algunos materiales de partida permanecen después. Se utilizó la misma metodología en todas las preparaciones en la obtención de un compuesto de fórmula (A) (remítase a la siguiente tabla 3).

Tabla 3:

Ligando	Copo (mg)	Mn* _(Copo) (g/mol)	Alquino-ligando (mg)	Eq. de alquino	CuBr (mg)	Eq. de CuBr	PMD ETA (μL)	DMF (mL)	Temp (°C)	Tiempo (h)
Anisamida	200	35050	32.0	18.0	5.5	6.9	12.0	6.0	40	18
Ácido fólico(*)	200	29580	67.5	16.3	5.8	5.9	16.8	2.9	50	15
FP-547	300	35050	3.0	0.3	6.0	5.1	18.0	4.0	50	15

(*) reacción realizada con la mezcla de Compuestos A y B de la preparación 2B

Mn*: Peso molecular promedio numérico determinado por RMN

Copo: PLA-PEG-N₃

Eq: Equivalente

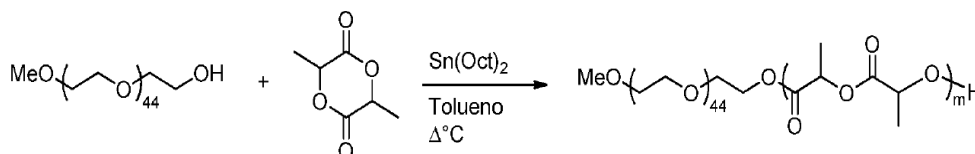
5 Caracterización por RMN de PLA-PEG-triazol-PEG'-anisamida

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.31 (m grande, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.97 - 5.48 (m, 389H), 4.50 (s grande, 4H), 4.10 - 4.26 (m, 3H), 3.80 (s grande, 5H), 3.30 - 3.67 (m, 198H), 1.28 - 1.62 (m, 1164H)

Rendimiento: 90%

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

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



m es el número de unidades de PLA

15 Procedimiento experimental:

A una mezcla de metoxipoli(etilenglicol) (Sigma-Aldrich, $M_n = 2012 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 245 mg, 0.12 mmol) y D,L-lactida (7.01 g, 48.62 mmol) se añadió, en condiciones secas, una solución de Sn(Oct)₂ (18.7 mg, 46.1 μmol) en tolueno anhidro (11.2 mL). La mezcla de reacción se desgasificó burbujeando argón durante 20 min y a continuación se agitó en un baño de aceite precalentado a 120 °C durante 30 min en una atmósfera inerte. La reacción se detuvo a aproximadamente un 54,2% de conversión.

20

Proceso de tratamiento:

El tolueno se eliminó a presión reducida y el producto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de DCM y se precipitó posteriormente en éter dietílico. A continuación, se disolvió el precipitado en una cantidad mínima de THF, se precipitó posteriormente en agua y después se liofilizó durante toda la noche para generar un polvo blanco.

25 Caracterización por RMN:

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.34 - 4.85 (m, 434H), 4.40 - 4.17 (m, 3H), 3.86 - 3.41 (m, 178H), 3.36 (s, 3H), 1.77 - 1.19 (m, 1302H).

Tabla 4:

Mn (teórico)	m teórico (unidad de PLA)	Mn (RMN)	m medido (unidad de PLA)
59560	400	33260	217

Mn (teórico) m teórico (unidad de PLA) Mn (RMN) m medido (unidad de PLA)

Mn = peso molecular promedio numérico determinado por RMN

Teórico: con un 100% de conversión

Ejemplo 2: Formación de nanopartículas

Se prepararon las nanopartículas de acuerdo con el siguiente protocolo y utilizando los componentes y cantidades especificados en las siguientes tablas.

5 Protocolo general

1. El copolímero o una mezcla de copolímeros se disuelve en el disolvente orgánico (con una concentración polimérica acuosa final que varía entre 1 y 40 mg/mL).
2. La fase orgánica se mezcla con la fase acuosa (con una proporción de volumen acuoso/orgánico que varía entre 2.5 y 5) que contiene el estabilizante (concentración que varía entre un 0.1% y un 1% p/v). Para la preparación de nanopartículas utilizando la técnica de emulsión y reducción del tamaño, la mezcla se agita vigorosamente utilizando un agitador vorticial durante 1 minuto para obtener una emulsión. La emulsión se sonica (utilizando una sonda con un tiempo que varía entre 1 y 10 minutos).
3. La fase orgánica se elimina por evaporación (presión reducida o con flujo de aire).
4. Las nanopartículas se ultracentrifugan a 30 000 g durante 30 minutos.
5. Las nanopartículas se resuspenden en medio acuoso.
6. Las nanopartículas se filtran sobre un disco filtrante de vidrio de 1 µm (Acrodisc).
7. Las nanopartículas se almacenan a 4 °C hasta su uso.

Como un ejemplo, se utilizó el siguiente protocolo donde se utilizaron 1.2 mL de AcOEt como disolvente orgánico (remítase a los últimos 3 ejemplos de la siguiente Tabla 6)

1. El copolímero o una mezcla de copolímeros (masa total: 30 mg) se disuelve en AcOEt (1.2 mL).
2. La fase orgánica se añade a 3.3 mL de una fase acuosa que contiene un 1% de Pluronic F68.
3. La mezcla se agita vigorosamente con un agitador vorticial durante 1 minuto.
4. La emulsión se ultrasonica (utilizando una sonda) durante 3 minutos.
5. La fase orgánica se elimina a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio.
6. Las nanopartículas se ultracentrifugan a 30 000 g durante 30 minutos.
7. Las nanopartículas se resuspenden en 3 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4.
8. Las nanopartículas se filtran sobre un disco filtrante de vidrio de 1 µm (Acrodisc).
9. Las nanopartículas se almacenan a 4 °C hasta su uso.

Las nanopartículas se caracterizaron utilizando DLS (siglas en inglés de dispersión de luz dinámica) y un aparato de Malvern (Zetasizer Nano ZS). Cada copolímero mencionado en las siguientes tablas tiene un peso molecular medio comprendido entre 30 000 Da y 35 000 Da.

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

Copolímero (%)		Fase orgánica (mL)			Fase acuosa (mL)			Concentración de copolímero final (g/L)	Caracterización		
PLA-PEG-OMe	PLA-PEG-N ₃	DCM	EtOAc	Acetona	(Colato Na. %)	(PVA . %)	(Pluronic®.%)		Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
100				6.7	12 (0%)			2.8	33	0.22	
100		2.3			11.7(0.1%)			1.2	Precipitación		
100		2.3			11.7 (0.2%)			10	149	0.15	

ES 2 666 243 T3

Copolímero (%)		Fase orgánica (mL)			Fase acuosa (mL)			Concentración de copo final (g/L)	Caracterización		
PLA-PEG-OMe	PLA-PEG-N ₃	DCM	EtOAc	Acetona	(Colato Na. %)	(PVA . %)	(Pluronic®.%)		Tamaño (nm)	Pdl	Potencia I zeta (mV)
100		2.3			11.7 (0.5%)			1.2	133	0.13	
100		2.3			11.7 (1%)			1.2	115	0.17	
100		1			2.5 (1%)			10.2	133	0.07	
100		2.3				11.7 (1%)		10	192	0.12	
100		1				2.5 (1%)		10.1	300	0.07	
100		2.3					11.7 (1%)	10	Precipitación		
100			0.5				2 (1%)	15.4	174	0.12	-8.7
100			1.2				3 (1%)	10.3	129	0.09	-8.3
100			3				7.5 (1%)	4.1	109	0.16	-7.2
100			1.2				4.8 (1%)	6.4	89	0.19	-7.8
100			1.2				3.3 (1%)	9.3	108	0.12	-6.6
83	17	2.3			11.7 (0.2%)			9.9	148	0.14	
83	17	2.3				11.7 (1%)		10	202	0.1	
90	10	1				2.5 (1%)		10.1	227	0.1	
50	50	1				2.5 (1%)		9.9	221	0.14	

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

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

PVA = alcohol polivinílico ~ 9500 Da

PLA = 30 000 Da (promedio); PEG = 2500 Da para PLA-PEG-N₃ y 2000 Da para PLA-PEG-OMe

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

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

Tabla 6: Nanopartículas compuestas por copolímero PLA-PEG-ligando mezclado o no con el copolímero PLA-PEG-OMe

PLA-PEG-OMe	Copolímero PLA-PEG-ligando (%)			Fase orgánica (mL)			Fase acuosa (mL)			Concentración de copo final (g/L)	Caracterización		
	Anisamida	Ácido fólico	FP547	DCM	EtOAc	Acetona	(Colato Na. %)	(PVA. %)	(Pluronic®. %)		Tamaño (nm)	Pdl	Zeta (mV)
90		10			1		2.5 (1%)			4	163	0.05	
85	10		5	1			2.5 (1%)			10.1	95	0.18	-29
85	10		5	1				2.5 (1%)		10.1	220	0.16	-13.7
90	10			1				2.5 (1%)		10	224	0.09	
50	50			1				2.5 (1%)		10.1	246	0.14	
90		10			4				10 (1%)	1	90	0.08	
95			5	1			2.5 (1%)			10	90	0.15	-29
95			5	1				2.5 (1%)		10	205	0.11	-13.7
85		10	5	1			2.5 (1%)			10.1	95	0.15	-29
85		10	5	1				2.5 (1%)		10.1	205	0.13	-13.7
90		10		1				2.5 (1%)		10	230	0.07	
50		50		1				2.5 (1%)		10.1	288	0.07	
47.5		47.5	5	1				2.5 (1%)		10.4	220	0.15	-13.7
50		50			1.2				3.3 (1%)	9.4	113	0.13	-5.7
90		10			1.2				3.3 (1%)	9.3	110	0.1	-5.3

Copolímero PLA-PEG-ligando (%)	Fase orgánica (mL)						Fase acuosa (mL)			Concentración de copo final (g/L)	Caracterización		
	Anisamida	Ácido fólico	FP547	DCM	EtOAc	Acetona	(Colato Na. %)	(PVA . %)	(Pluronic®. %)		Tamaño (nm)	Pdl	Zeta (mV)
PLA-PEG-OMe													
												4	
90			10		1.2				3.3 (1%)	9.1	107	0.13	-8.5
		90	10		1.2				3.3 (1%)	9.1	116	0.14	-7.6

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

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

PVA = alcohol polivinílico ~ 9500 Da,

PLA = 30 000 Da (promedio); PEG = 2500 Da para PLA-PEG-N₃ y PEG = 2000 Da para PLA-PEG-OMe

5 PLA-PEG-OMe - preparación 6

PLA-PEG-anisamida - preparación 5

PLA-PEG-ácido fólico - preparación 5

PLA-PEG-FP547 - preparación 5

10 Las tablas anteriores muestran que:

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

- EtOAc/NaCh dio lugar a nanopartículas físicamente estables con un intervalo de diámetro medio de 160 nm

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

- El uso de acetona dio como resultado micelas con un intervalo de diámetro promedio de 30 nm

15 Número de ligandos por nanopartícula:

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

N_p = Número de nanopartículas (NP.L⁻¹ de la suspensión)

τ = contenido sólido (g. L⁻¹)

D = diámetro promedio (cm)

20 d_p = densidad del polímero (g.cm⁻³)

Para los polímeros de PLA, la densidad promedio citada es a menudo 1.24 o 1.27 g.cm⁻³.

El diámetro promedio es de aproximadamente 110 nm (1.1x10⁻⁵ cm).

El contenido polimérico sólido es de aproximadamente 10 g.L⁻¹ para la solución madre.

Por lo tanto: N_p ~ 10¹⁶ NP.L⁻¹.

Considerando que el copolímero tiene un peso molecular de aproximadamente 35 000 g.mol⁻¹. Considerando que la concentración máxima de ácido fólico en la superficie de las nanopartículas (para que las nanopartículas sean estables en una solución de PBS, pH 7.4) es de aproximadamente un 30%.

El número de Avogadro es $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

- 5 Considerando los datos que se proporcionan anteriormente, por nanopartícula hay:
 17 000 moléculas de copolímero y 5100 moléculas de ácido fólico (si $Mn_{(copo)}=35\ 000 \text{ g.mol}^{-1}$)
 20 000 moléculas de copolímero y 6000 moléculas de ácido fólico (si $Mn_{(copo)}=30\ 000 \text{ g.mol}^{-1}$)

Ejemplo 3: Resonancia de plasmones superficiales (SPR) utilizando nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico

Preparación del chip sensor CM5 serie S (GE Healthcare)

- 10 El chip sensor se cubre con una matriz de dextrano carboximetilado incorporado de manera covalente a la superficie de oro del chip y compuesto por 4 canales.

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

- El protocolo utilizado para la inmovilización de la proteína es el descrito por Johnson (Johnson *et al. Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277). Resumiendo, después de equilibrar el instrumento con PBS, pH 7.4, se inyectaron las siguientes muestras de manera automática y sucesiva en el BIAcore T100: (i) NHS/EDC en una solución mixta (1:1, v/v) durante 420 s para activar el dextrano carboxilado; (ii) FBP disuelta con una concentración de 125 µg/mL en tampón acetato (pH 5.0) durante 420 s, (iii) etanolamina durante 420 s para desactivar los grupos NHS-éster residuales en el chip sensor. Cada paso estuvo acompañado por lavados con PBS. El protocolo de inmovilización, que se llevó a cabo con una tasa de flujo de 10 µL/min, permitió la unión de ~6.8 ng/mm² de FBP por canal.
- 15
- 20 El primer canal de flujo (Fc1) se bloqueó únicamente con etanolamina de manera que se pudiera utilizar como canal de referencia con el fin de comprobar si el dextrano desempeñaba o no una función en la adsorción de las nanopartículas.

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

- 25 Con el fin de comprobar si la FBP inmovilizada estaba en la conformación correcta, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-FBP (IgG anti-FBP, Thermo Scientific). La inmunoglobulina G (IgG) se inyectó a 50 µg/mL durante 120 s a 30 µL/min.

La señal específica es 4.5 veces mayor que la señal no específica (IgG en el canal de referencia Fc1) que representa aproximadamente un 22% de la señal total.

- 30 Se consideró que el uso de glicina y etilenglicol regeneraba la superficie. Ciertamente, fue posible obtener después una señal específica similar con la IgG anti-FBP. La suspensión de nanopartículas se estudió posteriormente en un canal del chip sensor cubierto con proteína recién preparado.

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

- 35 Se realizaron análisis por resonancia de plasmones superficiales de la adsorción de las nanopartículas de PLA-PEG-ácido fólico sobre FBP inmovilizada utilizando nanopartículas no conjugadas de PLA-PEG como control. Los experimentos se realizaron con una tasa de flujo de 5 µL/min con un tiempo de contacto de 500 s.

Nanopartículas utilizadas:

- 40 Se prepararon diferentes suspensiones de nanopartículas, utilizando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), como el objetivo de variar la concentración de ácido fólico en la superficie de las nanopartículas. Con el fin de hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-OMe ($Mn_{(RMN)}=34\ 820 \text{ g.mol}^{-1}$) y PLA-PEG-ácido fólico ($Mn_{(RMN)}=32\ 880 \text{ g.mol}^{-1}$).

Tabla 7: Compendio de los datos de caracterización de las nanopartículas utilizadas para los experimentos de SPR:

Muestra	Ácido fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
1	24	118.0	0.23	-21.7
2	20	111.6	0.20	-19.6

Muestra	Ácido fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
3	16	106.1	0.18	-19.0
4	12	111.1	0.17	-16.6
5	8	109.1	0.14	-18.0
6	29	116.1	0.23	-21.2
7	0	110.6	0.16	-9.6

Pdl : Índice de polidispersidad

El porcentaje de ácido fólico se ha calculado a partir de la cantidad de PLA-PEG-ácido fólico que se ha utilizado para cada preparación y el rendimiento del acoplamiento click entre el alquino-ácido fólico y PLA-PEG-N₃. Con más de un 30% de ácido fólico las nanopartículas de copolímero se aglomeran.

5 Experimentos por resonancia de plasmones superficiales:

Se estudió cada suspensión de nanopartículas en un canal del chip sensor cubierto con proteína recién preparado.

Tabla 8: Compendio de los experimentos realizados:

FC	Superficie	Muestra	RU _{FBP Inmov}	Dilución PBS	Conc copo (g/L)	PLA-PEG-fólico (%)	Conc fólico (μM)	RU _{Nanos}
1	Ref	2	228	0.5	5.03	20%	32.8	
1	Ref	3	228	0.5	5.00	16%	25.8	
1	Ref	4	228	0.5	5.08	12%	19.6	
1	Ref	5	228	0.5	5.04	8%	12.9	
1	Ref	7	228	0.5	5.05	0%	0.0	
1	Ref	6	228	0.5	5.06	29%	48.0	
1	Ref	1	228	0.5	5.02	24%	38.9	24
2	FBP	1	6627	0.5	5.02	24%	38.9	1803
3	FBP	5	7723	0.5	5.04	8%	12.9	2201
4	FBP	7	6865	0.5	5.05	0%	0.0	1062
1	FBP	6	6368	0.5	5.06	29%	48.0	2226
2	FBP	3	5626	0.5	5.00	16%	25.8	2887
3	FBP	2	8249	0.5	5.03	20%	32.8	1667
4	FBP	4	6008	0.5	5.08	12%	19.6	3292

FC = Canal de flujo

RU_{FBP Inmov} = Unidad de resonancia de FBP inmovilizada

10 RU_{Nanos} = Unidad de resonancia de nanopartícula inmovilizada

Copo = copolímero

PBS = solución salina tamponada con fosfato

Análisis del resultado:

5 Se representaron gráficamente los valores finales de las señales obtenidas a partir de los sensogramas de SPR de cada muestra en un gráfico frente a la concentración de ácido fólico en las nanopartículas (Figura 4).

10 Por lo tanto, este gráfico muestra la evolución de la señal específica respecto a la concentración de ácido fólico en la superficie de la nanopartícula. A un 12%, se alcanza un máximo donde la señal específica representa aproximadamente un 70% de la señal total. Con más de un 12% la señal específica desciende. Esto se puede deber a un cierto apilamiento entre las distintas porciones de ácido fólico que previene de esta manera una mejor interacción. La señal no específica la proporciona el valor de las nanopartículas que no tienen ácido fólico en su superficie.

Tal como se muestra en las primeras 7 líneas de la tabla, sin importar qué nanopartículas se inyecten en el canal de referencia, no se obtiene señal. Por lo tanto, la superficie de recubrimiento original (dextrano) no induce ninguna adsorción de las nanopartículas.

15 La no especificidad se debe ciertamente al recubrimiento de PEG de las nanopartículas con la FBP.

Ejemplo 4: Citotoxicidad

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

20 Con el fin de estudiar estas nanopartículas, se utilizó la línea celular KB-3-1 (carcinoma de cuello de útero humano, DSMZ (colección de microorganismos y cultivos celulares alemana, código de catálogo: ACC 158) ya que expresa receptores de folato.

Cultivo celular:

25 Esta es una línea celular adherente que crece en monocapas y las células se cultivaron con el fin de inducir una sobreexpresión de los receptores de folato. El medio utilizado para sobreexpresar los receptores de folato fue DMEM 2429 (medio sin ácido fólico) al cual se añadieron L-glutamina (200 mM a 0.584 g/L, BioWhittaker, Lonza) y bicarbonato de sodio (3.7 g/L, Sigma-Aldrich) y complementado con un 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza) y un 10% de suero bovino fetal (FBS, Lonza) en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37 °C.

Nanopartículas utilizadas:

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

Con el fin de hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-OMe ($Mn_{(RMN)}=34\ 820\ g.mol^{-1}$; 70% o 100% en peso) y PLA-PEG-ácido fólico ($Mn_{(RMN)}=32\ 880\ g.mol^{-1}$; 30% o 0% en peso, respectivamente).

Tabla 9: Compendio de los datos de caracterización de las nanopartículas utilizadas para el ensayo citotóxico:

Muestra	Fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Zeta (mV)
S1	30	118.0	0.23	-21.7
S2	0	110.6	0.16	-9.6

35

Metodología del ensayo de citotoxicidad:

40 En una placa de 96 pocillos, se depositaron 5×10^2 células por pocillo diluidas en 50 μ L de medio de cultivo (tal como se ha descrito anteriormente). Después de 24 h en una incubadora de células, se añadieron 50 μ L de tampón PBS que contenía nanopartículas con diferentes concentraciones de copolímero (0.5, 0.1, 0.05, 0.01 mg/mL). A continuación, se permitió que la placa permaneciera en una incubadora de células (5% de CO₂, 37°C) durante 48 h.

A continuación, se añadieron 20 μ L de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio) (MTS, un compuesto de tetrazolio incluido en el ensayo de proliferación celular no radioactivo CellTiter 96° AQ_{ueous},

Promega) y la placa se analizó con un lector de microplacas (Labsystem Multiscan MS, Tipo 352) a 492 nm después de 3 horas de incubación en una incubadora de células.

Los datos se compararon respecto a un pocillo que contenía únicamente 5×10^2 células en 50 μL de medio de cultivo y 50 μL de tampón PBS y reveladas con 20 μL de MTS. En todos los datos, se eliminó un fondo constituido por nanopartículas, con la concentración relevante, en 50 μL de medio de cultivo y 50 μL de tampón PBS y reveladas con 20 μL de MTS. Los experimentos se realizaron por triplicado.

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

Resultados:

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

Se observó que incluso con una concentración elevada, sin importar la presencia o no de ácido fólico, las nanopartículas no inducen ninguna citotoxicidad en las células KB-3-1 que sobreexpresan los receptores de folato.

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

15 Con el fin de estudiar estas nanopartículas, se utilizó la línea celular PC-3 (adenocarcinoma de próstata humano, ATCC (Número: CRL-1435)) ya que expresa receptores sigma a los cuales se puede unir la porción anisamida.

Cultivo celular:

20 Esta línea celular adherente se cultivó en RPMI 1640 (Fisher Scientific) complementado con 1% de penicilina/estreptomina (Lonza) y un 10% de suero bovino fetal (FBS, Lonza) en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 a 37 °C. Esta línea celular sobreexpresa los receptores sigma. Se utilizaron cultivos con una confluencia de un 85-90% para todos los experimentos. Las células se tripsinizaron (tripsina-EDTA, Invitrogen, Gibco), se contaron, se subcultivaron en placas de 96 pocillos para los estudios de viabilidad. Se permitió que las células se adhirieran durante 24 h antes de utilizarlas para los experimentos.

Nanopartículas utilizadas:

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

30 Con el fin de hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-FP547 ($M_{n(RMN)}=34\ 820\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 10% en peso en ambas preparaciones) y PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34\ 820\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 45% o 90% en peso) y PLA-PEG-anisamida ($M_{n(NMR)}=37\ 060\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 45% o 0% en peso, respectivamente).

Tabla 10: Compendio de los datos de caracterización de las nanopartículas utilizadas para el ensayo de citotoxicidad:

Muestra	Anisamida (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Zeta (mV)
S3	45	119.7	0.20	-8.9
S4	0	111.7	0.11	-9.1

Metodología del ensayo de citotoxicidad:

35 En una placa de 96 pocillos, se depositaron 5×10^3 células por pocillo diluidas en 50 μL de medio de cultivo (tal como se ha descrito anteriormente). Después de 24 h en una incubadora de células, se añadieron 50 μL de tampón PBS que contenía nanopartículas con diferentes concentraciones de copolímero (5, 2.5, 0.5, 0.05 mg/mL).

40 A continuación, se permitió que la placa reposara en una incubadora de células (5% de CO_2 , 37 °C) durante 48 h. A continuación, se añadieron 20 μL de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (MTS, un compuesto de tetrazolio incluido en el ensayo de proliferación celular no radioactivo CellTiter 96® AQueous, Promega) y la placa se analizó con un lector de microplacas (Labsystem Multiscan MS, Tipo 352) a 492 nm después de 3 horas de incubación en una incubadora de células.

Los datos se compararon respecto a un pocillo que contenía únicamente 5×10^3 células en 50 μL de medio de cultivo y 50 μL de tampón PBS y reveladas con 20 μL de MTS. En todos los datos, se eliminó un fondo constituido por

nanopartículas, con la concentración relevante, en 50 µL de medio de cultivo y 50 µL de tampón PBS y reveladas con 20 µL de MTS. Los experimentos se realizaron por triplicado.

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

5 Resultados:

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

10 Se observó que incluso con concentraciones elevadas de hasta al menos 5 mg/mL, sin importar la presencia o no de anisamida, las partículas fluorescentes no indujeron ninguna citotoxicidad en las células PC-3 que expresan los receptores sigma.

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

Con el fin de estudiar estas nanopartículas, se utilizó la línea celular KB-3-1 (carcinoma de cuello de útero humano, DSMZ (colección de microorganismos y cultivos celulares alemana, código de catálogo: ACC 158) ya que expresa receptores de folato.

15 Cultivo celular:

20 Son una línea celular adherente que crece en monocapas y se cultivaron con el fin de inducir una sobreexpresión de los receptores de folato. El medio utilizado para sobreexpresar los receptores de folato fue DMEM 2429 (medio sin ácido fólico) al cual se añadieron L-glutamina (200 mM a 0.584 g/L, BioWhittaker, Lonza) y bicarbonato de sodio (3.7 g/L, Sigma-Aldrich) y complementado con un 1% de penicilina/estreptomina (Lonza) y un 10% de suero bovino fetal (FBS, Lonza) en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37 °C.

Nanopartículas utilizadas:

25 Se prepararon tres lotes de 2 suspensiones diferentes de nanopartículas, utilizando el protocolo descrito previamente (con pluronic® como estabilizante), como el objetivo de tener nanopartículas fluorescentes con ácido fólico y nanopartículas fluorescentes de control (sin ácido fólico). Con el fin de hacer esto, se prepararon nanopartículas a partir de una mezcla de PLA-PEG-FP547 ($M_{n(RMN)}=34\ 820\ g.mol^{-1}$), PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34\ 820\ g.mol^{-1}$) y PLA-PEG-ácido fólico ($M_{n(RMN)}=32\ 880\ g.mol^{-1}$).

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

Tabla 11: Compendio de los datos de caracterización de las nanopartículas utilizadas para el ensayo de citotoxicidad:

Muestra	OMe (%)	FP547 (%)	Ácido fólico (%)	Tamaño (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
S1'	52.2	32.9	14.9	103.2	0.18	-15.9
S2'	77.0	33.0	0	103.9	0.15	-12.4
S3'	68.3	16.3	15.4	110.1	0.19	-17.3
S4'	84.1	15.9	0	108.6	0.19	-11.6
S5'	65.4	19.1	15.5	125.8	0.20	
S6'	81.0	19.0	0	117.8	0.21	

30

Metodología de la separación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés):

35 Se permitió que la línea celular KB-3-1 cultivada en un medio para sobreexpresar sus receptores de folato (tal como se ha mencionado anteriormente) creciera en una placa de 24 pocillos hasta casi la confluencia (~300 000 células/pocillo). A continuación, se eliminó el medio de cultivo y se incubó 1 mL de nanopartículas diluidas en el mismo medio de cultivo, con una concentración de copolímero final de ~60 µg/mL, con las células durante diferentes periodos de tiempo (desde 10 min hasta 24 horas). Después, se elimina el medio de cultivo, cada pocillo se lava dos veces con tampón PBS (1 mL) y las células se desprenden con tripsina (200 µL durante 3 min). A continuación, se

neutraliza la tripsina con medio de cultivo (800 μL) y las células se centrifugan (5 min a 1000 g). Se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden PBS (1 mL), se centrifugan (5 min a 1000 g) y finalmente se recuperan con paraformaldehído (200 μL , 1% en PBS).

- 5 Se consiguió el estudio por citometría de flujo utilizando un analizador celular BD LSRFortessa con una longitud de onda de excitación de 561 nm y una señal de emisión recuperada entre 575 y 589 nm.

Resultados:

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

- 10 Se observó que cuando está presente el ácido fólico en la superficie de las nanopartículas (S3'), estas últimas se internalizan 115 veces más que las nanopartículas sin ácido fólico (S4'). También se observó que se alcanza un estado estacionario entre 6 y 10 horas de incubación.

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

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

- 15 Para encapsular docetaxel, se utilizó el mismo protocolo mencionado previamente para la preparación de las nanopartículas. Se utilizó docetaxel tritiado durante el proceso para evaluar la carga farmacológica y la eficacia de atrapamiento.

- 20 A 30 mg de copolímeros (una mezcla de PLA-PEG-OMe ($M_{n(RMN)}=34\ 820\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 60% en peso) y PLA-PEG-anisamida ($M_{n(NMR)}=37\ 060\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 40% en peso)) diluidos en 1.2 mL de acetato de etilo se añadieron 2.8 mg de DTX (3.24 μmol ; 861.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y 4 nmol de ^3H -DTX ($5.38\times 10^5\ \text{Bq}$). La fase orgánica se mezcló con 3.3 mL de una solución acuosa de pluronic F68 (1% p/v). Las dos fases se agitaron vigorosamente con un vórtex durante 1 min y después se sonicaron con una sonda durante 3 min. Después, la fase orgánica se eliminó a presión reducida y la fase acuosa resultante se filtró a través de un filtro de vidrio de 1 μm antes de la ultracentrifugación (30 min a 30 000g). El sobrenadante se eliminó y las nanopartículas se resuspendieron en tampón PBS (10 mL) y se filtraron a través de un filtro de vidrio de 1 μm .

25

Resultados:

El sobrenadante y la solución de NP se contaron con un contador beta de Beckman que permitió calcular una carga farmacológica de un 4.3% y una eficacia de atrapamiento de un 46%.

- 30 **Ejemplo 7: Procedimiento típico para la reacción de Huisgen en condiciones acuosas para llevar a cabo química click en las nanopartículas de PLA-PEG-N₃ preformadas**

Tabla 12

Ingredientes	$M_{n(RMN)}$ (Da)	Masa (mg)	Cantidad (μmol)	Equiv	Volumen (mL)
PLA-PEG-OMe	42 800	57.8	1.35	4.0	
PLA-PEG-N ₃	35 400	12.0	0.34	1.0	
PEG-alquino	2100	1.5	0.70	2.1	
CuSO ₄ .5H ₂ O	250	2.2	8.89	26.3	
Ascorbato Na	198	3.6	18.02	53.3	
PVA	9500	10.0	1.05	3.1	
H ₂ O	18			0.0	7.8

Procedimiento experimental:

A una suspensión de nanopartículas (compuesta por PLA-PEG-N₃ (20% p/p) y PLA-PEG-OMe (80% p/p)) preparada siguiendo el protocolo descrito previamente y estabilizadas con alcohol polivinílico (PVA) (1% p/v) se añadió PEG-alquino (2 equiv en comparación con el grupo azido), CuSO₄·5H₂O y ascorbato de sodio (en exceso).

La mezcla de reacción se agitó durante 24 h.

- 5 Finalmente, la suspensión se sometió a diálisis frente a agua utilizando una membrana de celulosa con un valor de corte de 20 000 Da (SpectrumLabs).

Observación:

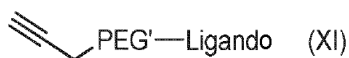
El tamaño de la suspensión de NP permanece estable durante el proceso click.

Z-promedio = 198.5 nm y Pdl = 0.09

- 10 De manera similar, se pueden unir otros ligandos (por ejemplo, ligandos fluorescentes) a la nanopartícula de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

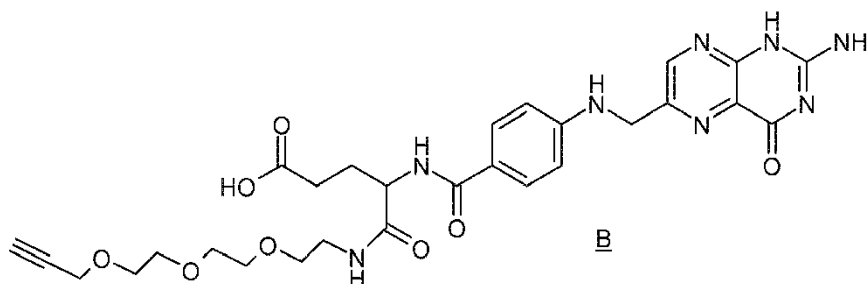
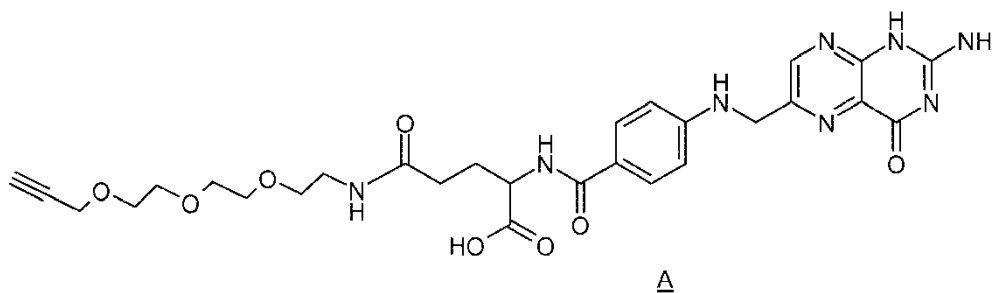
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (XI):

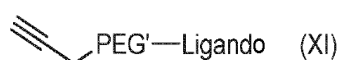


donde

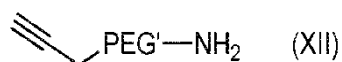
- 5 el conector PEG' es un resto de polietilenglicol; y
 el ligando es un resto de ligando funcional de ácido fólico,
 escogiéndose dicho compuesto entre A y B, que son como sigue:



- 10 2. Un proceso para preparar el compuesto de fórmula (XI) de acuerdo con la reivindicación 1: que comprende hacer reaccionar



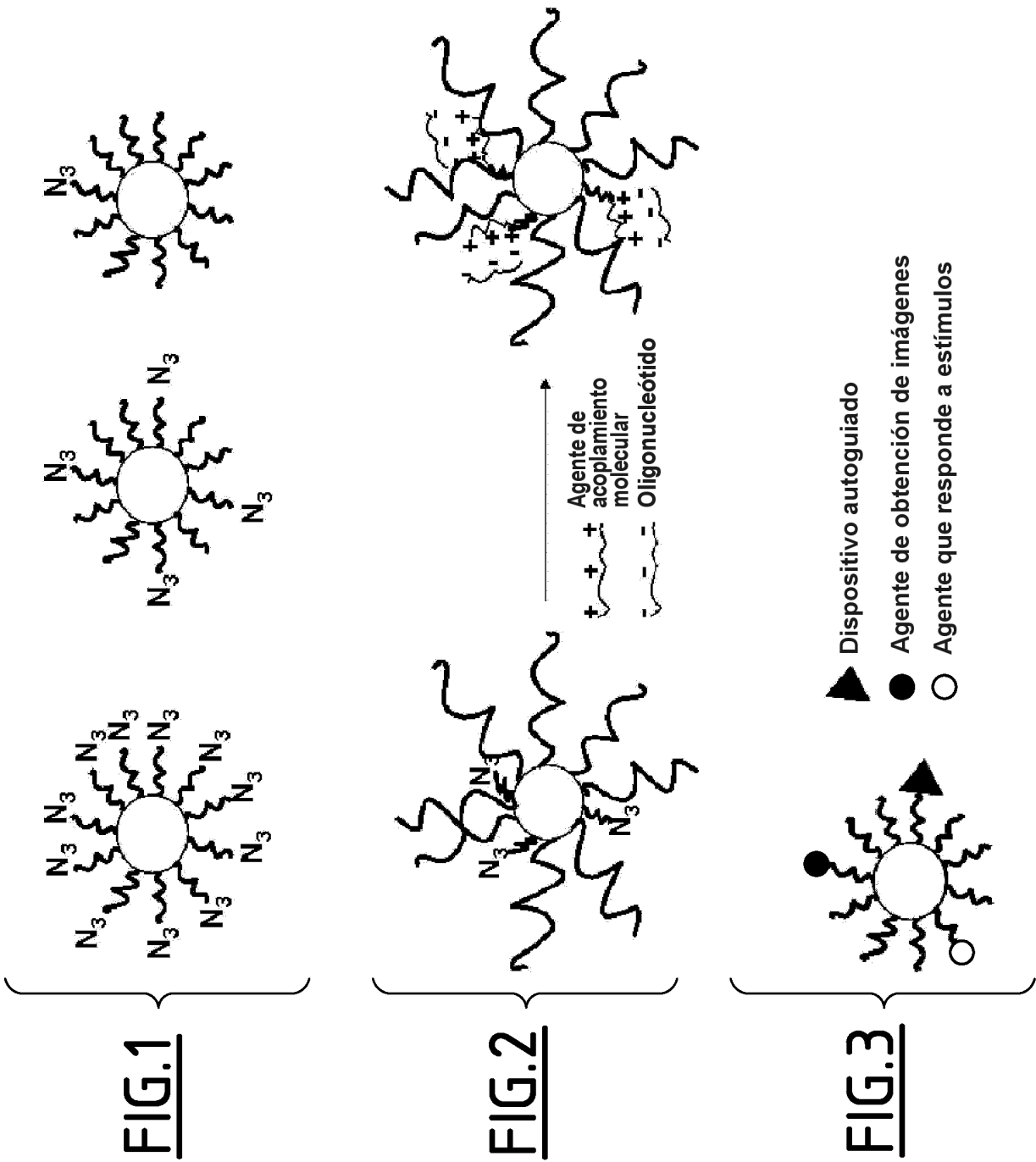
- un compuesto de fórmula (XII);



- 15 con
 - un ligando precursor

donde PEG' es tal como se ha definido en la reivindicación 1.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico, en presencia de una base.
- 20 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho reactivo de acoplamiento peptídico es PyBOP (hexafluorofosfato de benzotiazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) y la base es *N,N*-diisopropiletilenodiamina (DIPEA).
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho reactivo de acoplamiento peptídico es EDC/NHS (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/*N*-hidroxisulfosuccinimida) y la base es trietilamina.



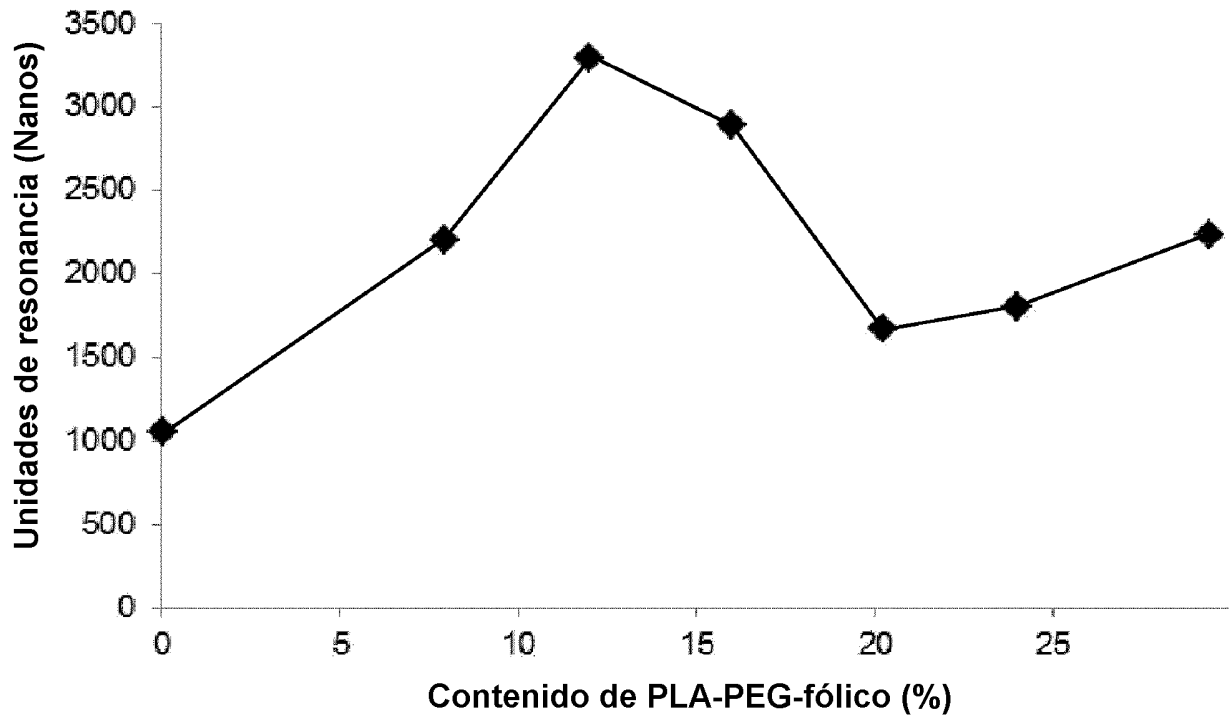
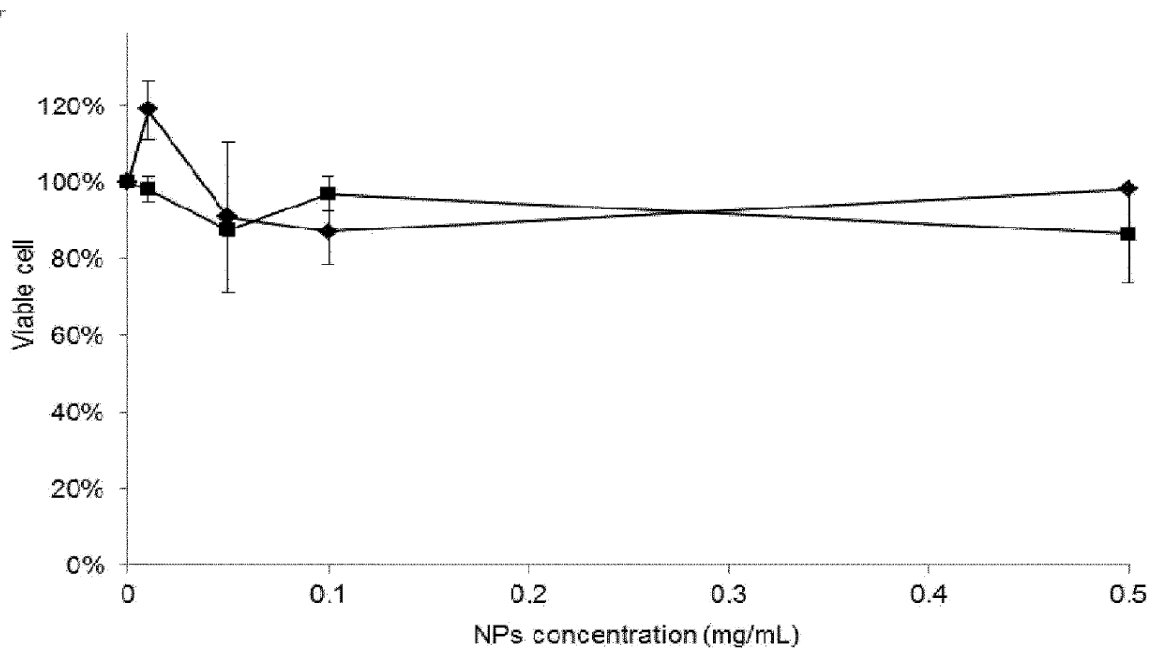


FIG.4

a.



b.

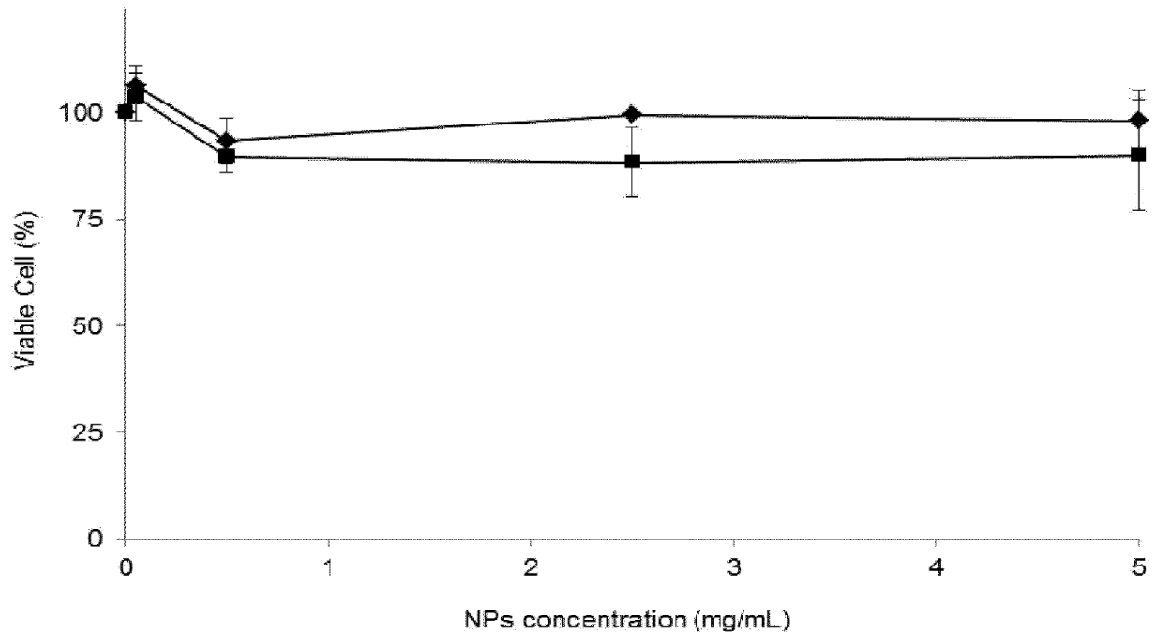
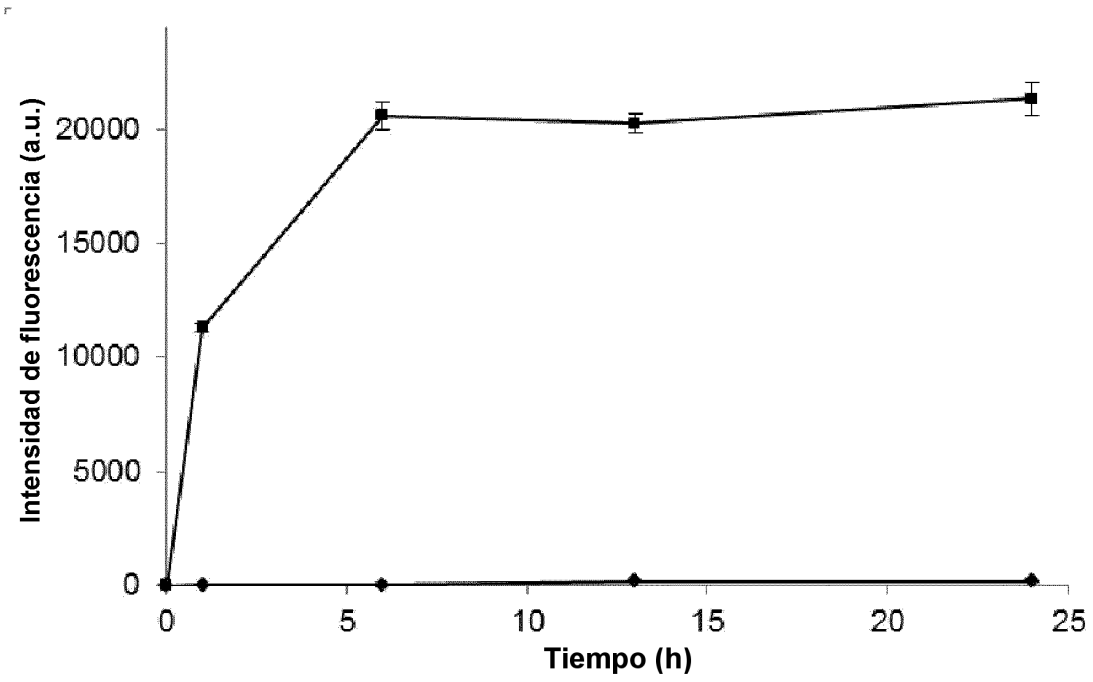


FIG.5

a.



b.

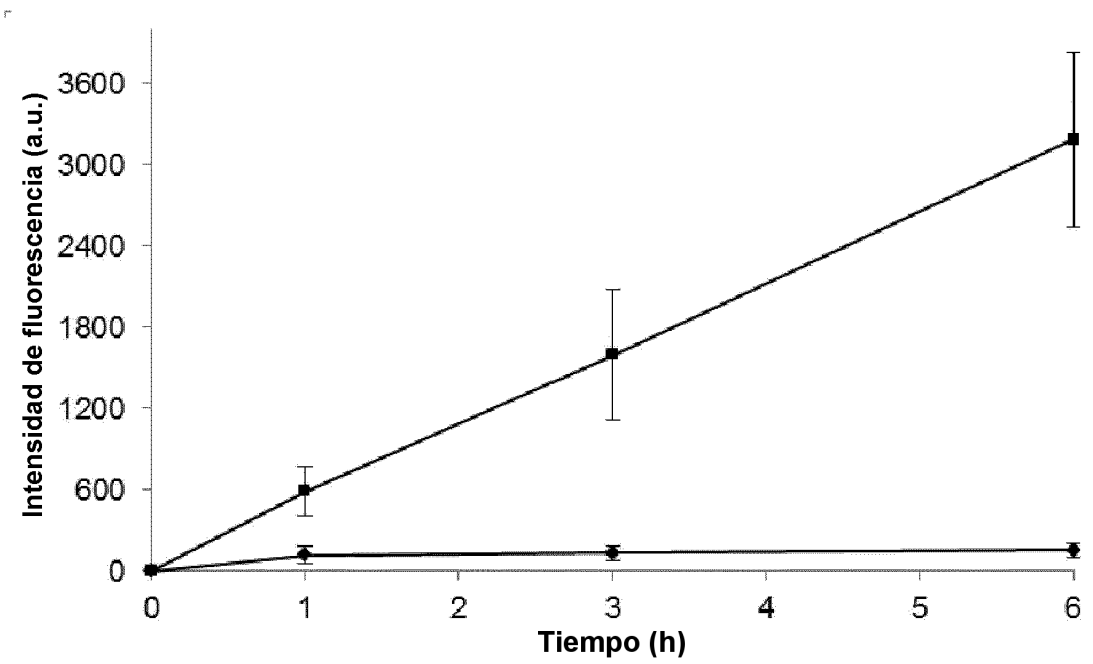


FIG.6