

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 885**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/12** (2006.01)

**A61K 51/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C08G 77/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/EP2015/056739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15712905 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3122383**

54 Título: **Nanoestructuras y aplicaciones de las mismas**

30 Prioridad:

**28.03.2014 EP 14162399**

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

**06.06.2019**

73 Titular/es:

**SPAGO NANOMEDICAL AB (100.0%)  
Scheelevägen 22  
223 63 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**AXELSSON, OSKAR;  
BÄCKSTRÖM, SANIA y  
PETORAL JR, RODRIGO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 715 885 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

Nanoestructuras y aplicaciones de las mismas

## 5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a nanoestructuras poliméricas quelantes bioinertes con aplicaciones en la radioterapia sistémica y el diagnóstico por imagen del cáncer, tal como se define en las reivindicaciones.

## 10 Antecedentes

El método de referencia para el tratamiento del cáncer es la cirugía. En los casos en los que la cirugía sola no es curativa, se usan regímenes multimodales que incluyen la quimioterapia y el tratamiento con radiación. Aproximadamente la mitad de todos los pacientes con cáncer hoy en día se someten a tratamiento con radioterapia, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos. La radiación suministrada en forma de haces externos ofrece una técnica relativamente sencilla y práctica de causar daño por radiación al tumor. Aunque la intensidad, la localización y la duración de la radiación externa se pueden controlar y modular bien, las desventajas relacionadas con esta técnica incluyen la destrucción del tejido normal en la trayectoria del haz, así como el daño a los tejidos que rodean el tumor. El riesgo de dañar el tejido sano circundante va en contra de la radioterapia externa para los tumores situados en profundidad y los tumores situados junto a órganos vitales. Adicionalmente, con frecuencia se requieren altas dosis de radiación para penetrar en el tejido. Asimismo, con el fin de que sea eficaz, la radioterapia externa a menudo requiere que los pacientes se sometan a sí mismos a visitas diarias al hospital durante períodos de tiempo prolongados.

## 25 La radioterapia sistémica, que suministra internamente sustancias radiactivas al tumor, ofrece soluciones a muchas de las desventajas mencionadas anteriormente relacionadas con la radioterapia externa.

Los radionúclidos más comúnmente usados para la radioterapia sistémica en las clínicas de hoy en día son las partículas de emisión beta. Los emisores beta con energías de entre 0,1 y 2,2 MeV son ideales para el tratamiento de agrupamientos pequeños a grandes de células tumorales (Milenic y col., Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3). El intervalo máximo de penetración en el tejido (1-10 mm) y los efectos de fuego cruzado, es decir, la capacidad de eliminar células de manera indirecta a lo largo de una longitud de trayectoria más larga, de las partículas beta de tales energías permiten, por tanto, la dirección de las células tumorales en la proximidad cercana a la neovascularura. Los radionúclidos, tales como <sup>131</sup>I, se usan solos, tal como en el tratamiento de cánceres de tiroides, o conjugados con anticuerpos monoclonales o péptidos para permitir la radioinmunoterapia dirigida al tumor. El ibritumomab tiuexan con <sup>90</sup>Y (Zevalin®) y el tositumomab acoplado con <sup>131</sup>I (Bexxar®) son dos ejemplos de regímenes de radioinmunoterapia aprobados que se dirigen, ambos, a los linfocitos B para someter a tratamiento el linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (Sharkey y Goldenberg, Immunotherapy, 2011, 3:3).

40 El uso clínico de los emisores alfa es menos común, pero algunos muestran un potencial clínico. Como ejemplo, el emisor alfa <sup>223</sup>Ra (Xofigo®) ha sido aprobado recientemente por parte de la FDA para el tratamiento del cáncer de hueso metastásico (Shirley y McCormack, Drugs, 2014).

Los avances recientes en la nanotecnología han conducido al desarrollo de nanoportadores novedosos diseñados para la detección y el cribado del cáncer, el diagnóstico por imagen molecular y celular *in vivo*, así como el suministro de productos terapéuticos. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de publicaciones que abarcan los portadores de tamaño nanométrico para las terapias contra el cáncer, relativamente pocas han llegado a los ensayos clínicos y solo unos pocos están aprobados por parte de la FDA (Taurin y col., J. Controlled release 2012, 164). Entre las nanoestructuras usadas como vehículos de fármacos, los liposomas son los más establecidos. El Doxil® y el DaunoXome®, dos formulaciones liposomales de doxorubicina y daunorubicina, respectivamente, fueron aprobados en 1995 y 1996, respectivamente. En comparación con los liposomas, los vehículos de fármacos poliméricos deben ser ventajosos como vehículos de fármacos debido a la mayor estabilidad, la distribución de tamaño más definida y las propiedades fisicoquímicas y de liberación del fármaco más controlables. En la lista de materiales poliméricos aprobados por la FDA para las terapias contra el cáncer, solo se mencionan las proteínas pegiladas, por ejemplo, Oncaspar® y Zinostatin Stimalmer® (SMANCS), y Abraxane®, que es paclitaxel enlazado a albúmina (Venditto y Szoka Jr., Adv Drug Rev. 2013, 65:1).

## 60 La carga de nanoportadores diseñados para la radioterapia sistémica con radionúclidos adecuados para el diagnóstico por imagen médico, además de los radionúclidos aptos para la radioterapia, o un radionúclido apto para ambos, ofrece la posibilidad de una aplicación teranóstica de nanoportadores en el tratamiento del cáncer. Los emisores gamma con energías que varían de aproximadamente 75 a 360 keV son aptos para los detectores gamma y la tomografía computerizada de emisión de fotones individuales (SPECT en inglés), mientras que los radionúclidos de emisión de positrones de alta energía, que producen fotones gamma de 511 keV, se pueden aplicar en la tomografía de emisión de positrones (PET en inglés) (Coleman, Cancer. 1991, 67:4). Se hace una revisión de los esfuerzos por crear nanoportadores teranósticos en Luk y col., Theranostics, 2012, 2:12.

65

La presente invención se refiere a nanoestructuras poliméricas globulares, bioinertes y quelantes con aplicaciones en la terapia con radioisótopos y los diagnósticos de cáncer. Los siguientes ejemplos de literatura son ejemplos de publicaciones relevantes de antecedentes, que de ninguna manera deben interpretarse como que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

La publicación internacional WO 2009/124388 desvela un sistema de hidrogel que tiene un núcleo de matriz de polímero con reticulación covalente, con algunas características en común con la parte central de la presente invención. Sin embargo, esta desvela microperlas mucho más grandes que las nanoestructuras de la presente invención, por lo que queda fuera del alcance.

La solicitud de patente estadounidense 20140004048 describe una nanoestructura que, en conformidad con la nanoestructura presentada en la presente divulgación en algunas realizaciones, tiene una parte central y una periférica, pero en la que la parte periférica comprende estructuras dendríticas bien definidas, en lugar de los polímeros aleatorios que son ventajosos para la presente invención.

Los materiales con una estructura de núcleo-cubierta diseñada para llevar, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, en general, no son aptos para la aplicación de la presente invención, por ejemplo, la patente estadounidense 8592036 que describe nanoconstrucciones en las que la parte central es biodegradable y, por tanto, se encuentra fuera del alcance de la presente invención.

La solicitud de patente europea EP1500670 describe un material que, en determinadas realizaciones, tiene características en común con la presente invención, pero en el que el grado de reticulación es bajo y, por tanto, se encuentra fuera del alcance de la presente invención.

Las estructuras del documento WO 2003/089106A2 caen fuera del alcance de la presente invención, ya que abarca materiales en los que la parte central de las estructuras, en algunas realizaciones, está ramificada. Estas también tienen una parte periférica, pero las estructuras carecen de la característica de llevar grupos quelantes, lo que es fundamental para la presente invención.

Asimismo, varias técnicas descritas en la literatura (por ejemplo, Ocal H., y col., Drug Development and Industrial Pharmacy, 2014, 40:4; documento WO /2009115579; documento WO 2011/078803) implican materiales biodegradables que permiten una liberación rápida o lenta del agente terapéutico llevado. La estructura presentada en la presente invención es bioinerte, ya que la biodegradabilidad podría causar una pérdida no deseable y no controlada del isótopo radiactivo de la nanoestructura y, por tanto, podría causar daño por radiación en órganos importantes.

En la técnica se conoce una cantidad de agentes de suministro de radiación basados en nanopartículas (por ejemplo, Ting G. y col., Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010; Luk y col., Theranostics. 2012, 2:12). Varias técnicas implican materiales activamente dirigidos, en los que la nanoestructura se une a un bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo o un péptido que permite el suministro dirigido al tumor a través de la interacción molecular. Las técnicas activamente dirigidas a menudo están limitadas por un suministro insuficiente de los agentes terapéuticos a los sitios tumorales debido a la expresión relativamente baja y heterogénea de las dianas específicas tumorales. Asimismo, la expresión de proteínas diana en células no tumorales podría conducir a una toxicidad sistémica. Algunas veces, la introducción del bioconjugado conduce a una absorción del hígado aumentada.

Muchas de las técnicas de la radioterapia que implican nanoportadores sugeridos en la literatura, por ejemplo, nanoportadores basados en liposomas (Malam y col., Trends Pharmacol Sci. 2009, 30:11), están afectadas por el inconveniente de que el isótopo radiactivo tiene que incorporarse en o encapsularse mediante o enlazarse de manera covalente al nanoportador mediante una o más etapas químicas. Esto habitualmente no resulta deseable, puesto que, normalmente, el radioisótopo podría ser suministrado por un tercero e incorporarse en el nanoportador en un hospital con instalaciones de laboratorio limitadas. Los materiales de la presente invención superan esto al ser capaces de enlazarse de manera rápida a los isótopos, cuando se suministran en una forma catiónica multivalente, más específicamente cada ion de radioisótopo que tiene una carga de más dos, tres o cuatro. La solicitud de patente estadounidense 20040258614 desvela un material en el que el radioisótopo se enlaza de manera covalente al portador. En la presente invención, el radioisótopo se selecciona de tal manera que pueda enlazarse mediante interacciones electrostáticas con el nanoportador, en lugar de enlazarse de manera covalente, lo que tiene la ventaja de hacer que la preparación del agente terapéutico sea más sencilla y más fácil de usar. Por tanto, el material en la solicitud de patente mencionada anteriormente se encuentra fuera del alcance de la presente invención. El documento US2008/095699 desvela nanopartículas con un tamaño inferior a 100 nm (reivindicación 1 y 2), que comprenden una cubierta hidrófila y un núcleo hidrófobo. El grupo quelante no está comprendido en la parte central, pero se adhiere a la superficie externa de la nanopartícula (par. 162).

Además, muchas de las técnicas de la terapia con radioisótopos que implican los presuntos nanoportadores mencionados en la literatura están afectadas por el inconveniente de que el nanoportador no es realmente un nanoportador, ya que es mayor de 100 nm y debido a su gran tamaño está afectado por el inconveniente de no suministrar el radioisótopo al tejido tumoral de manera eficaz. Los materiales desvelados en la presente invención se

centran en nanoportadores o nanomateriales que están por encima del umbral en el que se podrían excretar a través de los riñones y, por tanto, podrían causar daño y/o perderse en el cuerpo, al mismo tiempo que son lo suficientemente pequeños (un diámetro por debajo de 100 nm) como para ser capaces de filtrarse a través de capilares defectuosos y difundirse a través de la matriz intracelular y suministrar la radioactividad a las células tumorales. El documento WO 2004/040972 es un ejemplo de un portador que es mayor de 100 nm y, por tanto, se encuentra fuera del alcance de la presente invención. Adicionalmente, la justificación de que los materiales de tamaño nanométrico sean adecuados como portadores de radiación dirigidos al tumor está relacionada con el efecto de permeación y retención potenciada (EPR en inglés). El efecto de EPR se basa en el hecho de que si bien los capilares de los tejidos sanos son prácticamente impermeables a las moléculas mayores de 3-4 nm, los capilares de tejido tumoral de rápido crecimiento son mucho más filtrables. Además, los tumores sólidos tienden a carecer de linfáticos funcionales. En combinación, estas características limitan la retirada de nanomateriales extravasados de la mayoría de los tumores sólidos. Debido a que la dirección del fármaco mediada por la EPR se basa exclusivamente en las propiedades patológicas del tejido diana, es decir, una filtración potenciada y un drenaje linfático deficiente, en general, esta se denomina dirección pasiva al tumor.

Aunque de ninguna manera es seguro o limitante, resulta concebible que el efecto de EPR sea la base de las propiedades de suministro al tumor favorables de los materiales de la presente invención.

#### Sumario de la invención

Algunas ventajas con las nanoestructuras desveladas en el presente documento sobre la técnica anterior incluyen una aplicación "teranóstica" en la que la nanoestructura se puede usar para diagnosticar cáncer, suministrar la terapia dirigida al tumor, así como controlar la respuesta a la terapia. Una técnica dirigida pasiva, tal como se utiliza en la presente invención, permite el tratamiento y la detección de masas tumorales más grandes, así como cargas tumorales más pequeñas y de enfermedades con metástasis. La nanoestructura desvelada permite que se suministre una mayor dosis eficaz al tumor y, por tanto, disminuye la dosis de radiación, así como limita la toxicidad y el daño general al tejido circundante, tal como se observa con frecuencia con la quimioterapia sistémica y la radioterapia de haces externos. El diseño de la presente invención permite una gestión y una manipulación simplificadas en el hospital y, por tanto, mejora su utilidad en la práctica clínica.

El primer aspecto importante de la presente invención se refiere a una nanoestructura globular, tal como se define en las reivindicaciones, que tiene un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de 8-100 nm que comprende una parte central y una parte periférica, en la que dicha parte central tiene un diámetro calculado ( $D_c$ ) de 6-90 nm y dicha parte periférica tiene un espesor estimado ( $T_p$ ), de tal manera que  $D_h = D_c + 2T_p$ , en la que dicha parte central comprende:

- (i) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que al menos el 30 % en número de los residuos monoméricos se han reticulado formando de este modo la estructura polimérica reticulada y/o
- (ii) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que la cantidad de puntos de ramificación es al menos el 30 % de la cantidad de residuos monoméricos,

en la que dicha parte central comprende grupos quelantes de los que al menos 4 permiten la quelación de al menos un catión con carga múltiple, en la que dichos grupos quelantes se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en  $-COOR^1$ ,  $-P=O(OR^1)(OR^2)$  y  $-S(=O)_2OR^1$ , en los que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferior y arilo y en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético adherido de manera covalente a la parte central, en la que el material polimérico sintético es hidrófilo y bioinerte y eléctricamente neutro o zwitteriónico.

El segundo aspecto importante de la presente invención es un proceso para producir dichas nanoestructuras. En su sentido más amplio, este implica, en primer lugar, la formación o adquisición de entidades (001) poliméricas de tamaño nanométrico y globulares, que posteriormente terminan comprendiendo dicha parte central de dichas nanoestructuras y, en ningún orden particular, seguida de una etapa (002), que, algunas veces, se puede incluir en la primera etapa (003), cuando dichos monómeros ya llevan grupos quelantes o precursores de dichos grupos quelantes, la introducción de una multitud de grupos quelantes, y, en ningún orden particular, seguida de una etapa (004), en la que el producto de la/s primera/s etapa/s se pone en contacto con los precursores en dicha parte periférica.

El tercer aspecto importante de la presente invención se refiere a composiciones en las que las nanoestructuras de acuerdo con el primer aspecto importante o las nanoestructuras obtenidas de acuerdo con el segundo aspecto importante se combinan con radionúclidos, en particular, radionúclidos para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

El cuarto aspecto importante de la presente invención se refiere a métodos para la obtención de la composición de acuerdo con el tercer aspecto importante de la invención.

El quinto aspecto importante de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende una pluralidad de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia como agente de diagnóstico por imagen y/o radioterapéutico para los procedimientos de diagnóstico y/o radioterapia. La composición que comprende una pluralidad de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o terapia se puede usar para diagnosticar, suministrar radioterapia, así como controlar la respuesta a la radioterapia.

El sexto aspecto importante de la presente invención se refiere a un kit que comprende nanoestructuras de acuerdo con el primer aspecto importante o nanoestructuras obtenidas de acuerdo con el segundo aspecto importante y, en algunas realizaciones, también un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

#### Definición de términos

El término "nanoestructura", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad con un tamaño total en el intervalo nanométrico, es decir, de hasta 100 nm. Tal como se usa en el presente documento, el término excluye las estructuras a las que a menudo se hace referencia como "nanopartículas de núcleo-cubierta" o simplemente "nanopartículas", que habitualmente tienen un núcleo inorgánico y un recubrimiento orgánico.

El término "globular", tal como se usa en el presente documento, pretende describir una forma tal que el eje menor no es menor de la mitad del eje mayor, es decir, el eje más largo a través del centro (punto de peso) de la estructura no es mayor del doble de la longitud del eje más corto a través del mismo punto. Para una ilustración explicativa, que no limita esta definición, véase la Fig. 1.

El término "nanoestructura globular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una nanoestructura, tal como se ha analizado anteriormente, que tiene una forma esencialmente globular. Esto significa que se excluyen formas, tales como copos, barras, tubos, toroides, cadenas y cintas.

El término "diámetro hidrodinámico", tal como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro de la esfera dura hipotética que se difunde a la misma velocidad que la partícula, es decir, el diámetro de la esfera dura equivalente, tal como se calcula a partir del coeficiente de difusión, de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein. El término también se conoce como "diámetro de Stokes" o "diámetro de Stokes-Einstein". La hidratación y la forma se incluyen en el comportamiento de la esfera. El coeficiente de difusión se calcula, a su vez, a partir de, por ejemplo, los datos de dispersión de la luz en función del tiempo obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS en inglés). Otros métodos técnicos para medir el coeficiente de difusión de las nanoestructuras son conocidos por parte de un experto en la materia y se pueden usar en su lugar. En esos casos, las mediciones deben hacer referencia a la medición de DLS. Como comparación, se mide la albúmina de suero bovino que tiene un diámetro hidrodinámico de 6,5 nm mediante DLS en solución salina acuosa a pH 7 y temperatura ambiente. Dependiendo de si se usa el promedio en número, el promedio en volumen o el promedio en intensidad dispersa, los valores calculados pueden ser algo diferentes. El promedio en volumen es, en general, el más útil, puesto que muestra el tamaño de partícula que tiene la masa del material. Los diámetros promedio a los que se hace referencia en este texto se refieren a los promedios en volumen medidos en solución salina acuosa a pH 7 y temperatura ambiente.

El término "DLS", tal como se usa en el presente documento, es un acrónimo de dispersión de luz dinámica, un método de dimensionamiento de partículas, y también puede denominarse espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz casi estática. Los tamaños de DLS dados, tal como se indican en el texto y en las reivindicaciones, si no se especifica nada más, se refieren a la posición del máximo del pico promedio en volumen para una muestra medida a 25 °C en solución acuosa neutra con una resistencia iónica correspondiente a NaCl 150 mM, también denominada solución salina.

El término "diámetro calculado" se refiere a un diámetro como el de la parte central de la presente invención que no se puede medir habitualmente después del ensamblaje de la nanoestructura. Se calcula de manera obvia para un experto en la materia a partir de propiedades medibles como el diámetro hidrodinámico, la densidad y la composición química. Como alternativa, los cálculos se pueden realizar a partir del conocimiento del tamaño del precursor respecto a la parte central o mediante la construcción de modelos moleculares, por ejemplo, modelos informáticos de dichas nanoestructuras y el cálculo de sus contribuciones al diámetro global. El diámetro de dicha parte central debe interpretarse como un diámetro promedio estimado o calculado en toda la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

El término "espesor calculado" se refiere a un espesor como el de la parte periférica de la presente invención que no se puede medir habitualmente después del ensamblaje de la nanoestructura. Se calcula de manera obvia para un experto en la materia a partir de propiedades medibles como el diámetro hidrodinámico, la densidad y la composición química. Como alternativa, los cálculos se pueden realizar a partir del conocimiento del tamaño del precursor respecto a la parte periférica o mediante la construcción de modelos moleculares, por ejemplo, modelos informáticos de dichas nanoestructuras y el cálculo de sus contribuciones al diámetro global. El espesor de dicha

parte periférica debe interpretarse como un espesor promedio estimado o calculado en toda la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

5 Un "monómero" es una molécula que se puede enlazar de manera covalente a otras moléculas del mismo tipo, (y, opcionalmente, otros tipos) a fin de formar un polímero, es decir, una macromolécula compuesta de varios residuos monoméricos. El término "residuo monomérico" se refiere a los átomos derivados de una unidad monomérica incorporada en el polímero más grande.

10 Una "reticulación" se refiere a una unión entre dos cadenas diferentes en un polímero. Esta se forma habitualmente mediante la reacción de monómeros multifuncionales (es decir, reticuladores) añadidos cuando se forma el polímero. Las reticulaciones también se pueden introducir, por ejemplo, mediante un tratamiento de radiación, medios químicos o calor.

15 El término "reticulado/a" se refiere a una estructura formada después de la formación de al menos una reticulación.

Un "punto de ramificación" es una posición en un polímero en forma de árbol en la que una cadena de polímero se ramifica en dos o más ramificaciones.

20 El término "estructura polimérica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo enlazado de manera covalente de átomos que forman una estructura en forma de árbol de múltiples ramificaciones o una estructura de red con múltiples ramificaciones. Tales estructuras poliméricas se forman a partir de la unión de monómeros y/u oligómeros adecuados (es decir, un complejo molecular que consiste en unos pocos residuos monoméricos) mediante enlaces covalentes. Los monómeros típicos se pueden encontrar en libros de texto de química de polímeros, tales como J. R. Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995. Algunos ejemplos de monómeros son estireno, propileno, etileno, tetrafluoroetileno, trifluoroetileno, difluoroetileno, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de hidroxietilo, acrilamida, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de hidroxietilo,  $H_2N-(CH_2)_p-COOH$ , en el que  $p$  es 1 - 10, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, N-vinil pirrolidona y precursores de silicona como  $(CH_3COO)_2Si(CH_3)_2$ . Algunos ejemplos de estructuras poliméricas se forman a partir de los pares iguales de monómeros como el ácido tereftálico + 1,4 diamino benceno, el ácido tereftálico + etileno glicol y el  $HCOO-(CH_2)_pCOOH + H_2N-(CH_2)_q-NH_2$ , en el que  $p$  y  $q$  son de manera independiente 1 -10. Los oligómeros con 2-10 unidades monoméricas se pueden usar como precursores. Algunos ejemplos de oligómeros diferentes de los grupos unidos de los monómeros anteriores son los silanos cíclicos o policíclicos, tales como hexametilciclotrisiloxano, 2,4,6,8-tetrametilciclotetrasiloxano y decametilciclopentasiloxano. Los agentes reticuladores típicos se pueden encontrar en libros de texto de química de polímeros, tales como J. R. Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995. Algunos ejemplos de agentes reticuladores son N,N'-metileno-bis(acrilamida), O,O'-metileno-bis(ácido acrílico), epíclorhidrina, divinilbenceno, 1,3-divinitetrametildisiloxano, 1,3-fenilendiisocianato, dianhídrido de ácido 3,3"-bifeniltetracarboxílico, 1,4-butanodioldiviniléter, tetraetoxisilano, oligosilicatos, tales como metasilicato, o silsequioxanos, organosilanos, tales como bis(trietoxisilil)metano, bis(trietoxisilil)etano, bis(trietoxisilil)propano, bis(trietoxisilil)butano, metil trietoxisilano, etil trietoxisilano y propil trietoxisilano.

45 La estructura polimérica constituye el esqueleto de la parte central de la nanoestructura. La persona experta se da cuenta de que la naturaleza aleatoria del proceso de polimerización hace que los materiales sean mezclas de muchos patrones de ramificación, posiciones de reticulación y pesos moleculares similares, pero, en la mayoría de los casos, no idénticos.

50 El término "ramificado/a", en el contexto de la estructura polimérica de la parte central de acuerdo con la presente invención, se refiere a materiales poliméricos que no están muy lejos de los dendrímeros convencionales a nivel de composición, pero muestran una arquitectura menos regular y, a menudo, un grado inferior de ramificación. Las moléculas tienen una estructura fractal con una multitud de ramificaciones. Se crean en la síntesis en un solo recipiente sin las fases prolongadas de reacción y purificación graduales necesarias con los dendrímeros tradicionales (Peleshanko, S. y Tsukruk, V. V., Prog. Polym. Sci. 2008, 33:523). El término incluye tanto las denominadas estructuras poliméricas de ramificación múltiple como las denominadas estructuras poliméricas hiperramificadas. Sin embargo, un criterio de acuerdo con la presente invención es que las estructuras poliméricas ramificadas comprenden residuos monoméricos en los que la cantidad de puntos de ramificación es de al menos el 30 % de la cantidad de residuos monoméricos.

60 El término "grupo quelante" se refiere a un grupo químico con la capacidad de competir de manera exitosa con el agua en el enlazado electrostático de un ion cargado positivamente. Un grupo quelante individual no se enlaza con mucha fuerza, pero si varios de los mismos rodean un ion cargado positivamente, se produce un fortalecimiento sinérgico del enlazado. Esto se denomina quelación.

65 La expresión "dispuestos de una manera que permite la quelación" significa que una cantidad de agentes quelantes, tal como se han definido anteriormente, se dispone de tal manera que se pueda producir el fortalecimiento sinérgico del enlazado de un ion cargado positivamente. Esto se puede obtener mediante medios estadísticos; cuando una gran cantidad de grupos quelantes se incorpora en un polímero aleatorio a tal densidad que al menos unos pocos de

los mismos se encuentran en proximidad para que se puedan unir al mismo ion cargado positivamente; o mediante la incorporación de una unidad preformada en la que los grupos quelantes ya están colocados en una proximidad cercana. Un ejemplo de estos últimos es el conocido quelante DOTA.

5 La expresión "adherido/a de manera covalente", "unido/a de manera covalente" y "enlazado/a de manera covalente", tal como se usan en el presente documento, son sinónimas y el significado de las mismas es bien conocido por parte de la persona experta.

10 La expresión "seleccionado/a de manera independiente", tal como se usa en el presente documento, significa que cada uno de los diferentes constituyentes mencionados antes de la expresión se selecciona del grupo que sigue después de la expresión de manera independiente o por separado de la selección de los otros constituyentes mencionados.

15 La expresión "grupo bisfosfonato geminal" se refiere a dos grupos fosfonato separados por un átomo de carbono, es decir, los grupos fosfonato se enlazan al mismo átomo de carbono. Los compuestos que comprenden tal grupo bisfosfonato geminal se denominan, a menudo, 1,1-bisfosfonatos (o 1,1-difosfonatos). Los grupos fosfonato en el grupo bisfosfonato geminal se pueden sustituir. En algunas realizaciones, los grupos fosfonato tienen, cada uno, la Fórmula  $-P=O(OR^1)(OR^2)$  en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferiores y arilo.

20 El término "radionúclido" se refiere a una forma inestable de un elemento químico que se desintegra radiactivamente, lo que da como resultado la emisión de radiación  $\alpha$ ,  $\beta$  y/o  $\gamma$ .

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia" se refiere a actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ); cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ); cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ); cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ); galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ); galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ); holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ); indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ); plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ); lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ); radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ); renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ); renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ); rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ); samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ); estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ); tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ); talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ); torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ); itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ); itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ); y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen" se refiere a cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ); cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ); galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ); galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ); indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ); lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ); renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ); rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ); tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ); talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ); itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen de PET" se refiere a cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ); galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ); rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ); itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen de SPECT" se refiere a galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ); indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ); tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para la radioterapia" se refiere a actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ); cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ); cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ); holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ); plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ); lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ); radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ); renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ); renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ); samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ); estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ); torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ) e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ). La expresión "un radionúclido para la radioterapia" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

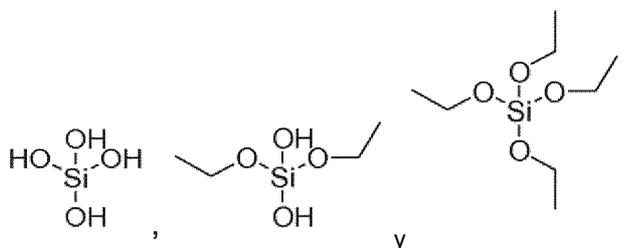
55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen de PET y la radioterapia" se refiere a actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ); cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ); cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ); cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ); galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ); holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ); plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ); lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ); radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ); renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ); renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ); rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ); samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ); estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ); torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ); itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET y la radioterapia" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radionúclidos para el diagnóstico por imagen de SPECT y la radioterapia" se refiere a actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ); cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ); cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ); galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ); holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ); indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ); plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ); lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ); radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ); renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ); renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ); samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ); estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ); tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ); talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ); torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ) e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ). La expresión "un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT y la radioterapia" también abarca combinaciones de dos o más de los radionúclidos mencionados anteriormente.

65

El término "bioinerte", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material que es biocompatible, es decir, inofensivo para los mamíferos y las células de los mamíferos y, al mismo tiempo, estable a la degradación *in vivo*, en un ser humano (menos del 10 % degradado) durante periodos de una semana o más.

El término "oxisilano", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto orgánico con uno o más átomos de oxígeno adheridos al átomo de silicio. Los ejemplos del mismo son:



El término "organosilano", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos que contienen uno o más enlaces de carbono-silicio.

El término "hidrocarburo" y la expresión "cadena de hidrocarburo" se usan en el presente documento para indicar un residuo orgánico que consiste en hidrógeno y carbono. El hidrocarburo puede estar completamente saturado o este puede comprender una o más insaturaciones. El hidrocarburo, de acuerdo con la presente invención, puede contener cualquier cantidad de átomos de carbono entre 1 y 50.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada completamente saturada (sin enlaces dobles ni triples). El grupo alquilo puede tener, en el presente texto, 1-15 átomos de carbono. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

El término "alquilo inferior", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alquilo que tiene 1-8 átomos de carbono.

El término "alcohol inferior", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alcohol que tiene 1-8 átomos de carbono.

Intervalos numéricos: siempre que se use en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, un intervalo numérico, tal como "de 1 a 8" o "1-8", se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "de 1 a 8 átomos de carbono" y "1-8 átomos de carbono" significan que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta, e incluyendo, 8 átomos de carbono. Sin embargo, existen algunas excepciones que son evidentes para las personas expertas. En particular, siempre que se proporcione un intervalo en el presente documento para una relación molar, tal como la relación molar de P/N o la relación molar de Si/P en las nanoestructuras, para un diámetro o tamaño, para un pH, para un periodo de tiempo, para una concentración, para una osmolalidad o para una temperatura, el intervalo incluye también todos los números decimales que se encuentran dentro del intervalo, incluyendo los límites superiores e inferiores.

Tal como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a la Fórmula -OR en la que R es un alquilo inferior, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metil etoxi (isopropoxi), n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, *terc*-butoxi, amiloxi, iso-amiloxi y similares. Un grupo alcoxi de acuerdo con la presente invención se puede sustituir opcionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un anillo carbocíclico (es decir, todo el carbono) o dos o más anillos condensados (es decir, anillos que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que tienen un sistema de electrones pi completamente deslocalizados. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, benceno, naftaleno y azuleno. Un grupo arilo de acuerdo con la presente invención se puede sustituir opcionalmente, por ejemplo, fenoxi, naftaleniloxi, azuleniloxi, antraceniloxi, naftaleniloxi, feniltio y similares. Un ariloxi se puede sustituir opcionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere al grupo funcional RC(=O), siendo R un residuo orgánico.

El término "conjugado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad molecular que es un indicador de fluorescencia, colorante, marcador espín, marcador radiactivo, péptido, ligando a un receptor biológico, quelato, inhibidor enzimático, sustrato enzimático, anticuerpo o estructura relacionada con anticuerpo. Véase, por ejemplo, "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson second edition, Elsevier 2008, ISBN 978-0-12-370501 -3 para información sobre el tema.

## Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una ilustración explicativa de una forma globular.

La Fig. 2 es un dibujo esquemático de una nanoestructura que ilustra cómo se miden las distancias  $D_h$ ,  $D_c$  y  $T_p$ .

La Fig. 3 ilustra cómo se pueden distribuir los grupos quelantes colocados de manera aleatoria (semicírculos en un tallo) en dicha parte central y forman, por casualidad, un buen sitio de enlazado para los cationes con carga múltiple.

La Fig. 4 ilustra cómo se pueden incorporar los quelantes preformados (círculos en un tallo) en dicha parte central.

La Fig. 5 ilustra una nanoestructura con la parte central marcada de color blanco y las cadenas poliméricas lineales unidas de manera covalente de la parte periférica marcadas de color negro.

La Fig. 6 ilustra una nanoestructura con la parte central marcada de color blanco y las cadenas poliméricas ramificadas unidas de manera covalente de la parte periférica marcadas de color negro.

La Fig. 7 ilustra una nanoestructura con la parte central marcada de color blanco y las cadenas poliméricas reticuladas unidas de manera covalente de la parte periférica marcadas de color negro.

La Fig. 8 es una ilustración esquemática de un proceso que se puede usar para la producción de las nanoestructuras.

La Fig. 9 muestra los picos de FTIR relacionados con el siloxano y el cambio en la intensidad de pico frente al tiempo de calentamiento a 114 °C.

La Fig. 10 muestra los picos de FTIR relacionados con el fosfonato y el cambio en la intensidad de pico frente al tiempo de calentamiento a 114 °C.

La Fig. 11 muestra los espectros de FTIR del monómero de PEG-silano (9-12) (línea de color negro) y del monómero de PEG-silano (9-12) calentado (línea de color negro discontinua).

La Fig. 12 muestra las intensidades de pico normalizadas después de 7 h de calentamiento del monómero de PEG-silano. Estas se normalizan para proporcionar la misma intensidad de pico en  $2.868 \text{ cm}^{-1}$  (que se atribuye al estiramiento de  $\text{CH}_2$  simétrico).

La Fig. 13 es una imagen de TEM de nanoestructuras recubiertas con el 130 % en moles de PEG9-12 y cargadas con acetato de uranilo mediante la agitación de nanopartículas recubiertas vacías con acetato de uranilo a temperatura ambiente durante 24 h. La concentración de nanoestructura es P 29,2 mM. La carga con uranilo es en una relación de 10 P/U. El pH=2,97. El pH se ajustó a 9,07 con tampón tris. Tiempo de retención de GPC: 13,11. Tiempo de retención de albúmina: 12,52. El  $d_h$  en DLS= $6,56 \pm 1,78$  nm. La imagen de TEM muestra que las nanoestructuras son globulares y tienen un diámetro de aproximadamente 6 nm. Los círculos de color negro en el centro de las nanoestructuras se atribuyen a las nanopartículas de núcleo con carga de uranilo y los anillos de color blanco se interpretan como un recubrimiento de PEG.

## Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto importante de la presente invención se refiere a una estructura globular, tal como se define en las reivindicaciones, con un diámetro hidrodinámico  $D_h$ , definido y medido tal como se ha descrito anteriormente, que se encuentra en el intervalo de tamaño de algunos a varios nanómetros, tal como de 8 a 100 nm, o de 8 a 50 nm o de 8 a 20 nm, denominada en lo sucesivo nanoestructura.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es de entre 8 y 100 nm.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es de entre 8 y 50 nm.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es de entre 8 y 20 nm.

En algunas realizaciones de la invención, como ejemplo de uso en una composición para su uso como agente de diagnóstico por imagen intravenoso y/o agente radioterapéutico, el diámetro hidrodinámico promedio de las nanoestructuras es entre 8 y 100 nm, o entre 8 y 50 nm o entre 8 y 20 nm.

Dicha nanoestructura se prepara y/o usa normalmente como una pluralidad de dichas nanoestructuras.

Las composiciones que comprenden las nanoestructuras de la presente invención siempre contendrán una pluralidad de dichas nanoestructuras y estas pueden estar caracterizadas por medidas estadísticas, tales como, el diámetro promedio, el peso molecular, el índice de monodispersidad, la densidad, la concentración, o medidas de tamaño, tales como el porcentaje que pasa a través de determinados filtros calibrados con valores límite para el peso molecular.

El intervalo útil de tamaños de las nanoestructuras de la presente invención está limitado desde abajo por la fisiología del riñón de un organismo, tal como un ser humano. Las estructuras compactas con un diámetro hidrodinámico mayor de 8 nm tienen una excreción insignificante a través del riñón y, por tanto, un potencial de circulación prolongada en el torrente sanguíneo después de la administración mediante, por ejemplo, una inyección intravenosa (Venturoli y Rippe, American Journal of Physiology, 2005, 288). La propiedad de ser de circulación prolongada resulta ventajosa para el cuarto aspecto de la presente invención. El límite superior de los tamaños de

las nanoestructuras de la presente invención, que resulta útil para la presente invención, se establece por la necesidad de penetrar desde el torrente sanguíneo hasta el tejido tumoral en el cuerpo de un organismo, tal como se describe más adelante en el quinto aspecto de la presente invención. Aunque existe una amplia literatura sobre diversas micro y nanoconstrucciones para el suministro de una carga útil al tejido tumoral, los inventores de la presente invención han hallado que resulta más ventajoso usar entidades pequeñas para este fin, puesto que la resistencia a la difusión en el tejido es alta, y para las entidades de por encima de 100 nm de diámetro, es lo suficientemente alta como para que la dosis suministrada localmente a un tumor sea útil en el quinto aspecto de la presente invención.

Aunque el objetivo principal de la presente invención es basarse en el efecto de EPR para el suministro selectivo de radioisótopos a un tumor, se puede contemplar el uso de dianas específicas de las nanoestructuras de la presente invención si se superan determinados obstáculos. La diana específica del tumor de los nanoportadores hoy en día es problemática debido a razones relacionadas con, por ejemplo, la expresión relativamente baja y heterogénea de dianas específicas de tumores, así como los riesgos de toxicidad sistémica debido a la expresión de proteínas diana sobre células no tumorigénicas, estando el área en rápido desarrollo. Por tanto, en el futuro es concebible que una introducción de grupos específicos dirigidos al tumor en las nanoestructuras de la presente invención pueda potenciar tanto la actividad terapéutica antitumoral como la eficacia del diagnóstico por imagen con efectos adversos reducidos en el tejido sano. Tales grupos dirigidos al tumor concebibles incluyen, pero sin restricción, péptidos, peptoides, proteínas, anticuerpos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN y fragmentos de PNA.

Las nanoestructuras de la presente invención tienen una parte central y una parte periférica adherida a y que rodea la parte central. La parte central y la parte periférica constituyen el conjunto de dicha nanoestructura. La parte central es globular en su forma general, pero la interfaz entre la parte central y la parte periférica puede ser convoluta. El diámetro de la parte central ( $D_c$ ) y el espesor de la parte periférica ( $T_p$ ) se pueden calcular basándose en sus contribuciones relativas al diámetro global, tal como se ha descrito anteriormente.

De manera realista, se necesita un espesor de un nanómetro o más de la parte periférica que rodea la parte central para hacer que la nanoestructura sea bioinerte y, puesto que la parte periférica está presente en todos los lados de la parte central, esto contribuirá dos veces al diámetro global, por tanto:

$$D_h = D_c + 2T_p \quad (\text{Ec. 1})$$

$$T_p = (D_h - D_c)/2 \quad (\text{Ec. 2})$$

La forma en la que se miden el  $D_h$ ,  $D_c$  y  $T_p$  se muestra en la Fig. 2.

Puesto que la presente invención se refiere a nanoestructuras con un diámetro hidrodinámico global de 8-100 nm, los tamaños calculados adecuados de la parte central son de 6-90 nm o 6-45 nm o de 6-15 nm y los intervalos adecuados del espesor de la parte periférica ( $T_p$ ) se deducen de la Ec. 2.

En algunas realizaciones, dicho diámetro hidrodinámico,  $D_h$ , es de 8-20 nm, el diámetro calculado de la parte central,  $D_c$ , es de 6-15 nm y el espesor de la parte periférica es de 1-2,5 nm.

Para que sea útil en el quinto aspecto de la presente invención, la parte periférica debe recubrir la parte central para protegerla de la interacción con sistemas biológicos. En función de la solución técnica usada para obtener esta cobertura, se puede explicar este requisito de manera cuantitativa de diferentes maneras.

En el caso en el que dicha parte periférica comprende polímeros lineales, tales como grupos  $A-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$ , en los que A, m y  $R^9$  son tal como se definen más adelante, extendiéndose hacia afuera desde la superficie de dicha parte central, resulta adecuada una densidad de superficie de 0,1-3  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  o 0,5-2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ . El área superficial a la que se hace referencia en este contexto es el área de la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

En algunas realizaciones, dicha parte periférica comprende  $A-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$  unidos de manera covalente a dicha parte central en una densidad de superficie de 0,5-2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ .

En el caso en el que dicha parte periférica comprende residuos poliméricos ramificados, aplicándose el mismo intervalo de densidad de superficie, pero dividido por el número de ramificaciones de cada polímero ramificado individual, que, por ejemplo, en una parte periférica que comprende polímeros enlazados de manera covalente a la superficie, ramificando cada uno en un punto, denominados en lo sucesivo dos polímeros ramificados, resulta adecuada una densidad de superficie de 0,05-1,5  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  o de 0,25 a 1,0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ . En un sentido similar, en una parte periférica que comprende polímeros n-ramificados enlazados de manera covalente a la superficie, resulta adecuada una densidad de 0,1/n-3/n  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  o de 0,5/n a 2,0/n  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ .

En el caso en el que dicha parte periférica comprende un polímero reticulado, no resulta adecuado indicar la densidad de superficie de dicha parte periférica tal como anteriormente, sino más bien como un requisito de que

dicha parte periférica recubra la parte central y el espesor de dicha parte periférica en ningún lugar sea menor de 1 nm.

5 La densidad de superficie de la parte periférica normalmente no es directamente medible, sino que tiene que calcularse a partir de otros parámetros. A menudo, tiene que calcularse a partir de los datos sobre el diámetro hidrodinámico global y el tamaño calculado de la parte central y la densidad de la parte central o la densidad y composición de la parte periférica de acuerdo con métodos bien conocidos por parte de un experto en la materia.

10 Dicha parte central comprende una estructura polimérica reticulada y/o ramificada que comprende o se compone de una multitud de grupos quelantes. Dicha estructura polimérica puede ser un homopolímero de un monómero individual o un copolímero de dos o más monómeros diferentes. La presente invención se refiere a partes centrales que comprenden polímeros aleatorios, en lugar de polímeros en cascada, tales como dendrímeros o arbores, o macromoléculas, tales como proteínas, que tienen, en conjunto, estructuras molecularmente bien definidas en las que esencialmente todas las entidades moleculares son idénticas. La ventaja de este procedimiento es que, aunque resulta posible lograr el tamaño mínimo deseado de 6 nm en dicha parte central con entidades moleculares bien definidas, resulta muy costoso y complicado hacerlo. Un ejemplo sería el dendrímero PAMAM-G7 que, de acuerdo con el proveedor, tiene un diámetro hidrodinámico de 8,1 nm y cuesta aproximadamente 6.992 € (7.850 \$) para una muestra de investigación de 100 mg. Los costes de materiales típicos de los polímeros aleatorios de la presente invención son menores del 1 % de este. El dendrímero más grande que parece estar disponible en el mercado es el PAMAM-G10 y se indica que tiene un diámetro hidrodinámico de 13,5 m, que alcanza solo la parte inferior del intervalo de tamaño deseado de 6-90 nm de dicha parte central de las nanoestructuras de acuerdo con la presente invención.

25 Las estructuras poliméricas de acuerdo con la presente invención se pueden construir a partir de un gran número de monómeros bien conocidos, tal como se puede encontrar en cualquier libro sobre química de polímeros (por ejemplo, Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995). Algunos ejemplos no limitantes son los polialquenos, los poliácridatos, los polimetacrilatos, las poliamidas, los poliestirenos, los poldimetilsiloxanos (siliconas), los poliorganosilanos, las poliaminas, tales como la polietilenimina, o los carbohidratos; en especial, las estructuras altamente ramificadas o reticuladas.

30 En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica se deriva de polietileno.

En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica se deriva de poliestireno.

35 En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica se deriva de ácido poliacrílico.

40 El grado de polimerización (número promedio de residuos monoméricos) de dicha parte central se ajusta para producir productos del tamaño deseado mediante la manipulación de los parámetros del proceso, tal como se conocen en la técnica. Resulta menos útil describir el tamaño mediante el grado de polimerización que el diámetro hidrodinámico, pero es otra forma de conceptualizar las estructuras. Se incluye un intervalo no como limitante, sino como referencia. Por ejemplo, en un polímero con una densidad cercana a 1 g/ml, el grado típico de polimerización varía de 100-2.000.000 monómeros.

45 Resulta concebible mezclar dos, tres o varias de las estructuras poliméricas dichas en cualquier combinación monomérica químicamente compatible, ya sea mediante el mezclado de los monómeros antes de la polimerización o mediante el injerto de un polímero a otro.

50 Una manera establecida de lograr una estructura polimérica con una estructura en red es mediante la introducción de reticulaciones a través de la incorporación de una fracción de monómeros bi o polifuncionales en el proceso de polimerización. La ventaja del alto grado de reticulación y/o ramificación usado en la presente invención es hacer que dicha parte central sea rígida y menos propensa a hincharse en medios de diversas concentraciones de sal. El hinchamiento podría afectar a la capacidad del material de difundirse en el tejido y también podría, en muchos casos, tales como aquellos en los que los grupos quelantes se distribuyen de manera aleatoria en el polímero, conducir a una disminución no deseable de la capacidad del material de quelar dichos cationes con carga múltiple.

55 Una lista de agentes de reticulación típicos son N,N'-metilénbis(acrilamida), epíclorhidrina, divinilbenceno, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 1,3-fenilendiisocianato, dianhídrido de ácido 3,3'-bifeniltetracarboxílico, bis(trimetoxisilil)metano, bis(trimetoxisilil)etano y 1,4-butanodioldiviniléter.

60 El grado de reticulación o ramificación de dicho polímero de dicha parte central de la presente invención normalmente no es alto en los polímeros aleatorios, tal como, en promedio, más de una reticulación por monómero, es decir > 100 % de reticulación o ramificación; o el 50 % de reticulación o ramificación; o el 30 % de reticulación. Se pueden contemplar grados incluso tan altos como el 300-400 % o menores de, pero cercanos a, el 600 % en algunas estructuras poliméricas de la presente invención. Resulta obvio para la persona experta en la materia que, aunque se usen monómeros con potencial para la reticulación o ramificación como los monómeros usados para producir dicha parte central, no se cumplirá todo el potencial en la práctica, por lo que quedarán algunos grupos residuales con potencial para la reticulación o ramificación en la estructura de dicha parte central. En la literatura de polímeros,

a menudo no se indica si el grado de reticulación es el real, el logrado o el potencial para la reticulación. En la presente divulgación, se indica a qué caso se refieren los inventores al indicar claramente "% de reticulador añadido" en el caso del potencial para la reticulación y "% de reticulación lograda" para los valores medidos reales.

5 En algunas realizaciones, dicha parte central comprende un homopolímero en el que hay seis grupos con potencial para la reticulación en el monómero que corresponde al 600 % del reticulador añadido y entre 2 y 5 de los grupos, en realidad, forman reticulaciones que corresponden al 200 %-500 % de la reticulación lograda.

En algunas realizaciones, el porcentaje de reticulador añadido es entre el 30 % y el 100 %.

10

En algunas realizaciones, el grado de reticulación logrado es entre el 30 % y el 100 %.

En algunas realizaciones, el grado de ramificación logrado es entre el 30 % y el 100 %.

15 En algunas realizaciones, el grado de reticulación logrado es entre el 200 % y el 400 %.

En algunas realizaciones, el porcentaje de reticulador añadido es entre el 500 % y el 600 %.

20 Una estructura en particular que puede ser ventajosa en algunas realizaciones de la invención se forma mediante la polimerización por condensación de trialcoxiorganosilanos  $R^{12}\text{-Si}(\text{OR}^{13})_3$ , siendo  $R^{12}$  H o un residuo orgánico y siendo, de manera independiente,  $R^{13}$  un alquilo inferior o un arilo. Tal estructura tiene la propiedad de ser altamente polar, por tanto, compatible con el agua, y el grado de reticulación se puede controlar mediante los parámetros del proceso durante la producción. Puede resultar ventajoso usar monómeros con más de un grupo trialcoxisililo presente.

25

En algunas realizaciones de la invención, hay dos grupos alcoxisilano presentes en el monómero.

En algunas realizaciones de la invención, dichos alcoxisilanos se separan en 1-10 átomos de carbono o 3-9 átomos de carbono.

30

En algunas realizaciones de la invención, dichos alcoxisilanos se separan en 7 átomos de carbono.

En algunas realizaciones de la invención, los dos grupos fosfonato son parte del grupo  $R^{12}$ .

35 En algunas realizaciones de la invención, dichos dos silanos se separan en 7 átomos de carbono y los dos grupos fosfonato son parte del grupo  $R^{12}$ .

En algunas realizaciones de la invención, dichos silanos tienen la estructura genérica:

40 
$$\{(R^1)(R^2)PO\}_2\text{-C}\{(CH_2)_n\text{Si}(\text{OR}^{14})(\text{OR}^{15})(\text{OR}^{16})\}\{(CH_2)_n\text{Si}(\text{OR}^{17})(\text{OR}^{18})(\text{OR}^{19})\}$$

en la que

45  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilo inferior y arilo y  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$  y  $R^{19}$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en alquilo inferior y arilo;

y  
n = 1-5.

50

En algunas realizaciones, dichos residuos monoméricos incluyen residuos monoméricos que tienen la estructura  $(R^3O)(R^4O)(R^5O)\text{Si}-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{P}=\text{O}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2))_2-(\text{CH}_2)_n\text{-Si}(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)(\text{OR}^8)$ , en la que  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferior y un enlace a la estructura polimérica y n=1-5

55 y en la que dichos residuos monoméricos se incorporan en dicha estructura polimérica por medio de enlaces -O-Si, en los que el átomo de silicio es un átomo de silicio en la estructura anterior.

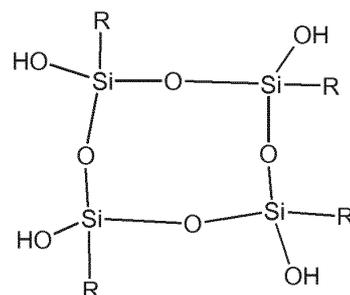
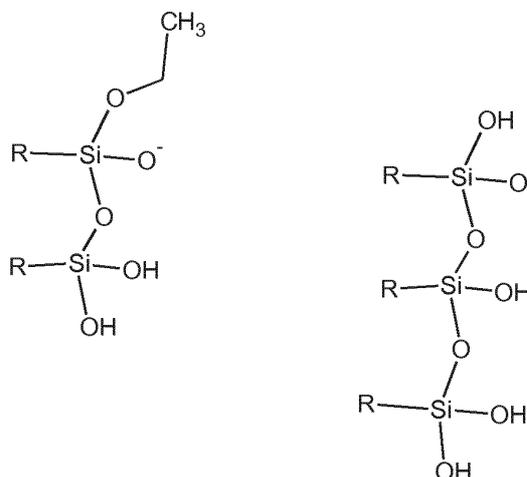
La reactividad de los trialcoxi silanos en los monómeros anteriores hacia la polimerización varía con la identidad de los grupos  $R^{14-19}$ . Los inventores han hallado que esto es un factor crítico en el control del tamaño molecular durante la producción y han hallado que el metilo y el etilo, en particular este último, son adecuados para la producción de las estructuras de la presente invención, aunque resulta concebible usar cualquier otro grupo alquilo inferior, arilo, silil amida, acilo, sililfluoruro o sililcloruro.

60

En algunas realizaciones de la invención,  $R^{14-19}$  en dichos monómeros son grupos etilo.

65

Hay muchas maneras diferentes en que los trialcóxi silanos pueden unirse entre sí mediante enlaces Si-O-Si. Los elementos estructurales diméricos, así como lineales, ramificados y cíclicos, se conocen (Fessenden y Fessenden, "Trends in Organosilicon Biological Research; Advances in Organometallic Chemistry, 1980, 18). Asimismo, las estructuras de caja de silicio-oxígeno de diversos tamaños se conocen bien a partir de la literatura (Hanssen, Eur. J. Inorg. Chem, 2004, 675) y también pueden estar presentes grupos alcóxi residuales o grupos silanol libres a diferentes grados. Algunos elementos estructurales, aunque de ninguna manera deben interpretarse como limitantes, que pueden estar presentes en tales estructuras son:



en los que R es cualquier residuo orgánico.

- 15 Las estructuras de ramificación se pueden formar teniendo más de una posición reactiva en los monómeros (Peleshanko and Tsukruk, Prog. Polym. Sci. 2008, 33)

En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica comprende residuos monoméricos ramificados.

- 20 En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica comprende residuos monoméricos que se unen terminalmente a más de un monómero diferente.

En algunas realizaciones, dicha estructura polimérica comprende una estructura polimérica ramificada seleccionada del grupo que consiste en polietilenimina, polietilenimina modificada, polioli hiperramificado y triazina hiperramificada.

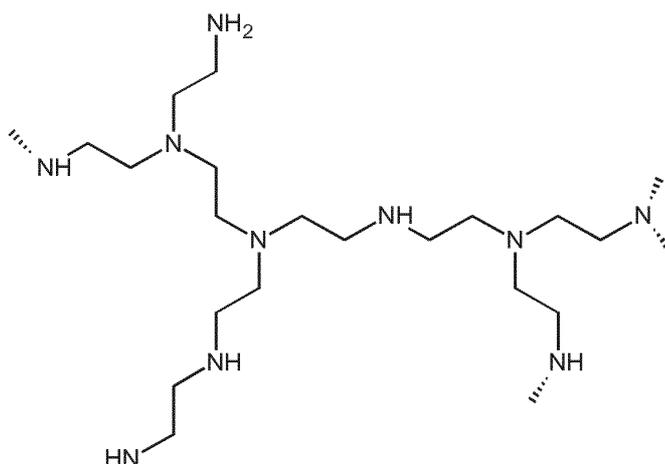
- 25 Un ejemplo bien conocido de un polímero aleatorio ramificado es la polietilenimina formada mediante la polimerización de aziridina. La polietilenimina contiene una mezcla de grupos amino primarios, secundarios y terciarios y esta tiene una estructura aleatoria de ramificación, tal como se indica en el esquema más adelante. La estructura exacta dibujada únicamente se debe interpretar como típica. Los grupos quelantes, tales como los bisfosfonatos, cruciales para la presente invención, se pueden adherir a los grupos amino primarios y/o secundarios, tal como se amplía más adelante.

En algunas realizaciones de la invención, dicha estructura polimérica es polietilenimina.

- 35 En algunas realizaciones de la invención, dicha estructura polimérica es polietilenimina con un grado de ramificación del 40-60 %.

A continuación, se muestra un fragmento estructural de polietilenimina típico, en el que los enlaces discontinuos indican que la red polimérica continúa:

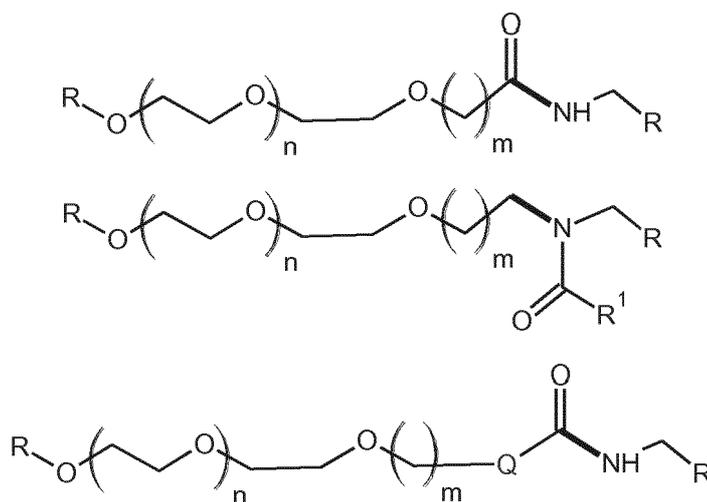
40



Un ejemplo de una estructura que puede resultar ventajosa para algunas realizaciones de la presente invención es una con dicha parte central que comprende una estructura polimérica ramificada basada en polietilenimina compuesta de grupos quelantes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en  $-\text{COOR}^1$ ,  $-\text{P}=\text{O}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$  y  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}^1$ , en los que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferiores y arilo. Una forma útil de introducir grupos quelantes en forma de carboxilatos es introducir un quelante DOTA mediante una unión de amida, tal como se muestra más adelante en el Esquema 1.

A fin de optimizar adicionalmente las propiedades bioinertes de las nanoestructuras basadas en polietilenimina, se puede introducir una cantidad de grupos cargados negativamente, tales como carboxilatos, para hacer que la nanoestructura en conjunto sea neutra a un pH fisiológico. Una forma establecida de hacer esto es introducir los carboxilatos mediante un tratamiento con anhídrido succínico (Wen y col. J. Appl. Polym. Sci. 2013, 3807).

Dicha parte periférica, que se amplía adicionalmente más adelante, comprende una multitud de residuos de polietilenglicol adheridos de manera covalente a las partes externas de dicha parte central. La adhesión puede adoptar muchas formas, tal como es bien conocido por parte de un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Hermanson, 2ª ed., Bioconjugate Techniques, Greg T. Elsevier 2008, para conocer los antecedentes sobre el tema. Algunas formas específicas de enlazar dichos residuos de polietilenglicol a dicha parte central son:



en las que R es dicha parte central con un átomo de nitrógeno adecuado para la adhesión a dicha parte periférica,  $n=6-100$ ,  $m=1-10$ ,  $\text{Q} = \text{O}$  o  $\text{NH}$  y el enlace covalente entre dicha parte periférica y dicha parte central se marca en negra.  $\text{R}^1$  es H o alquilo inferiores.

Cualquier mezcla entre las estructuras de ramificación y reticuladas también resulta útil en las aplicaciones consideradas en la presente invención. Un ejemplo es la polietilenimina hiperramificada reticulada mediante la adición de glutaraldehído.

De dichos grupos quelantes, existen al menos cuatro en cada nanoestructura, dispuestos de una forma que permita la quelación de uno o más cationes con carga múltiple. Los cuatro o más grupos quelantes pueden formar una

unidad organizada previamente enlazada de manera covalente ya favorable para la quelación de un catión con carga múltiple y adherirse a la estructura polimérica a través de uno o más enlaces covalentes, opcionalmente, con un grupo separador en el medio (véase la Fig. 4) o dichos grupos quelantes se pueden distribuir de manera aleatoria a través de dicha parte central y dependen de la probabilidad de disponerse por sí mismos de una forma que permita la quelación de dichos cationes con carga múltiple (véase la Fig. 3). Cuando se depende de la probabilidad, resulta necesario incorporar un gran exceso de grupos quelantes en la parte central para conseguir una probabilidad razonable de formar un agrupamiento de grupos quelantes con capacidad quelante.

Los inventores han descubierto que cuando los grupos quelantes, tales como la estructura de bisfosfonato  $R^3R^4C(P=O(OR^1)(OR^2))_2$  en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferior y arilo, se incorporan en una estructura polimérica y se les deja enlazarse a cationes con carga múltiple, estos se enlazan a dichos cationes de manera fuerte.

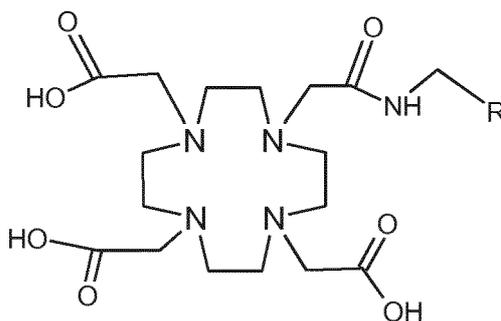
Los grupos fosfonato pueden estar completamente presentes en su forma de éster, hidrolizarse completa o parcialmente a su forma ácida y, posteriormente, ionizarse en cierto grado desde parcial hasta completo, de acuerdo con el valor de pH del medio circundante o cualquier mezcla de los mismos. Las nanoestructuras que comprenden dichos grupos fosfonato se enlazan a cationes multivalentes mejor a un pH neutro o básico. Esto indica que esta es, al menos en parte o algunas veces o incluso completamente, la forma aniónica del fosfonato hidrolizado, que desempeña una parte importante en el enlazado de los iones de metal. No solo los ésteres o ácidos de fosfonato, sino también las amidas fosfónicas, pueden contemplarse como parte del material o usarse como material de partida.

La cantidad de grupos quelantes puede variar desde solo cuatro hasta una gran cantidad determinada por la cantidad de residuos monoméricos en dicha parte central. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de cuántos monómeros y, por tanto, cuántos grupos quelantes se pueden empaquetar de manera real en dicha parte central cuando dicha parte central tiene diversos tamaños. Por simplicidad, se eligió un ejemplo no limitante de peso molecular típico del fragmento de monómero, tal como de 200 g/mol, y la densidad del material hipotético se estableció en 1 g/ml.

Tabla 1:

Diámetro de la parte central (nm)	Cantidad máxima de grupos quelantes
6	341
10	1.580
15	5.320
20	12.600
50	39.400
70	541.000
90	1.150.000

Cuando un grupo organizado previamente se une a dicha red de polímero, este se puede elegir de una enorme cantidad de grupos quelantes conocidos, siendo el más bien conocido el EDTA, DTPA y DOTA, pero en, por ejemplo, las Fig. 2 y 3 de Wadas y col., Chem. Rev. 2010, 110, se muestran una gran cantidad de quelantes organizados previamente que podrían ser útiles para la presente invención. Muchos de estos se pueden adherir de manera covalente a dicha estructura polimérica de formas obvias para un experto en la materia. Un ejemplo no limitante específico de una unidad enlazada de manera covalente favorable para la quelación es el quelante bien conocido DOTA, que se puede enlazar de manera covalente a la red de polímero a través de un enlace de amida, tal como se muestra a continuación, en el que R es dicha parte central:



En algunas realizaciones, el DOTA adherido a la red de polímero a través de un enlace de amida se usa como dicha unidad enlazada de manera covalente favorable para la quelación.

5 Cuando dichos grupos quelantes se distribuyen de manera aleatoria en la parte central, los grupos ácidos como el carboxilato, el fosfato, el fosfonato o el sulfonato son útiles.

En algunas realizaciones, dichos grupos quelantes se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en  $-\text{COOR}^1$ ,  $-\text{P}=\text{O}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$  y  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}^1$ , en los que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferior y arilo.

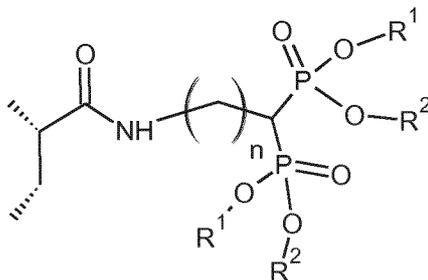
10 En algunas realizaciones, dichos grupos quelantes comprenden grupos bisfosfonato germinal en los que dichos grupos fosfonato germinal de manera independiente entre sí se incorporan como



15 en los que:

$\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilo inferior y arilo y  $>\text{C}$  indica un átomo de carbono que se conecta a dicha estructura polimérica reticulada o ramificada de dicha parte central o forma una parte de dicha estructura polimérica reticulada o ramificada de dicha parte central.

20 Cuando se incorporan dichos grupos quelantes en una estructura de poliacrilato, resulta concebible adherir dichos grupos quelantes al nitrógeno de amida a través de un enlazador corto. Un ejemplo típico de un fragmento estructural de tal material es la estructura de a continuación con  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  tal como se han definido anteriormente en el texto, n de 1-5 y los enlaces discontinuos que indican que el fragmento pertenece a un polímero. También resulta concebible adherir el bisfosfonato directamente al esqueleto de carbono:



30 También se pueden contemplar las estructuras basadas en poliaromáticos como el poliestireno o la polivinilpiridina. Los grupos quelantes, tales como los bisfosfonatos, se adhieren, a continuación, al sistema aromático. También son concebibles las poliamidas como la polivinilpirrolidona.

35 En algunas realizaciones, dichos grupos quelantes comprenden una multitud de grupos fosfonato  $-\text{P}=\text{O}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$  en los que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan de manera independiente de una carga negativa, H, alquilo o arilo. Cuando al menos uno de  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  es H, el ácido fosfónico resultante se ioniza hasta un grado dependiente del pH.

40 En algunas realizaciones de la invención,  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  son de manera independiente una carga negativa, H o metilo.

En algunas realizaciones, dichos grupos fosfonato se incorporan por pares como bisfosfonatos geminales, también denominados 1,1-bisfosfonatos.

45 En el átomo de carbono que separa los grupos bisfosfonato, es decir, el átomo de carbono intermedio, están presentes uno o más enlaces a la estructura polimérica. De interés particular son las estructuras del tipo  $(\text{R}^{20}\text{R}^{21}\text{C}(\text{P}=\text{O}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2))_2)$  en las que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan de manera independiente de H o alquilo o arilo y al menos uno de  $\text{R}^{20}$  y  $\text{R}^{21}$  es un grupo capaz de conectarse a la estructura polimérica del material. En el caso en el que únicamente uno de  $\text{R}^{20}$  y  $\text{R}^{21}$  es tal grupo, el grupo restante se selecciona de H, OH,  $\text{OR}^{22}$ , (siendo  $\text{R}^{22}$  alquilo inferior) o alquilo inferior.

50 En algunas realizaciones de la presente invención,  $\text{R}^{20}$  es  $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ (formando el grupo carbonilo el enlace a la estructura polimérica) y  $\text{R}^{21}$  es H u OH y  $n=1-5$ . En algunas de estas realizaciones  $n=1$ .

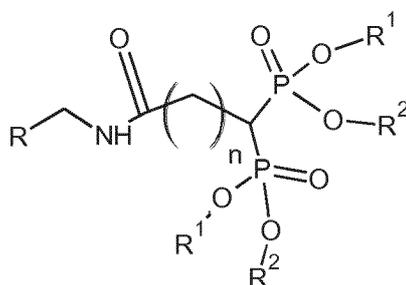
55 En algunas realizaciones de la presente invención,  $\text{R}^{20}$  y  $\text{R}^{21}$  son de manera independiente  $-(\text{CH}_2)_n-\text{SiO}_3$ , en los que  $n=1-5$  y el silano es parte de la estructura polimérica mediante la formación de enlaces de Si-O-Si, tal como se amplía más adelante en el texto.

En algunas realizaciones de la presente invención,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son, ambos,  $-(CH_2)_n-SiO_3$ , en los que  $n=3$  y el silano es parte de dicha estructura polimérica de la manera anterior.

También resulta concebible usar amidas fosfónicas, cloruros o fluoruros en lugar de ésteres o ácidos fosfónicos como componentes o materiales de partida de los compuestos descritos en el presente documento. Los fosfonatos pueden estar presentes en su forma libre o como ésteres o como amidas o cualquier mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones de la invención, los fosfonatos son una mezcla de fosfonatos libres y los ésteres de metilo de dicho fosfonato.

Cuando se incorporan dichos grupos quelantes en una estructura de polietileno, resulta concebible adherir dichos grupos quelantes directamente a la red de hidrocarburo o mediante la introducción primaria de un heteroátomo, tal como nitrógeno de amina primaria o secundaria, a través de un enlazador corto. Un ejemplo típico de un fragmento estructural a partir de tal material, cuando el grupo quelante es un bisfosfonato geminal, es la siguiente estructura con  $R^1$  y  $R^2$  tal como se han definido anteriormente en el texto,  $n$  de 1-5 y  $R$  es la estructura polimérica de dicha polietilenimina:



El fin de la parte periférica es conferir a la nanoestructura en conjunto la propiedad de ser bioinerte, es decir, de no interactuar con un organismo, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Resulta deseable que las nanoestructuras no se degraden a ningún grado sustancial cuando se introduzcan en dicho organismo para evitar la pérdida de partes del material.

Dicha parte periférica de dicha nanoestructura comprende un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en materiales poliméricos sintéticos y materiales de carbohidrato, en la que dicho material polimérico es hidrófilo y bioinerte y en el que dicho material polimérico es, adicionalmente, eléctricamente neutro o zwitteriónico y en el que dicho material polimérico se une de manera covalente a dicha parte central. Dicha parte periférica puede comprender polímeros lineales, ramificados o reticulados, para ello véase la Fig. 5-7.

En algunas realizaciones, dicha parte periférica comprende materiales poliméricos seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en  $A-(O-CH_2CH_2)_nOR^9$ , en el que  $n=2-100$  y  $R^9$  es un H o alquilo inferior y  $A$  es un grupo que se une a o se incorpora en dicha estructura polimérica y dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en:

- OSi( $R^{10}$ )<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en H o hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y  $m=2-5$ ;
- OSi(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $R^{11}$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en un enlace covalente a la estructura polimérica, H e hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y  $m=2-5$ ;
- NR<sup>11</sup>-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $R^{11}$  es tal como anteriormente y  $m=2-5$ ;
- O-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $m=2-5$ ;
- NR<sup>11</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $R^{11}$  es tal como anteriormente y  $m=2-5$ ;
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, en el que  $m=2-5$ ;
- O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que  $m=2-5$ ; y
- SX<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, en el que X es de manera independiente nada u O y  $m=2-5$ .

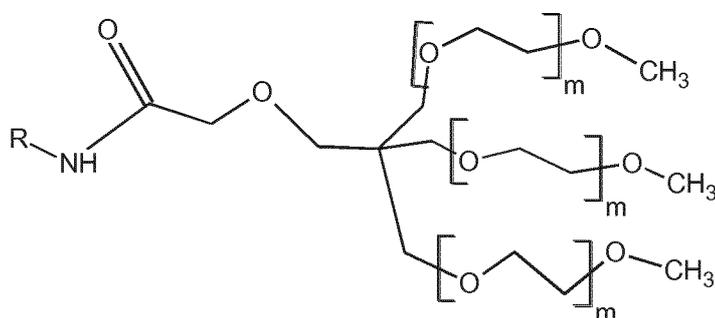
En algunas realizaciones, la parte periférica comprende un polímero adherido de manera covalente lineal, neutro, sintético, bioinerte e hidrófilo.

En algunas realizaciones, la parte periférica comprende un derivado adherido de manera covalente de polietilenglicol.

En algunas realizaciones, la parte periférica comprende un derivado adherido de manera covalente de polietilenglicol terminado en metilo.

En algunas realizaciones, la parte periférica comprende un derivado ramificado adherido de manera covalente de polietilenglicol.

En algunas realizaciones, la parte periférica comprende un derivado ramificado adherido de manera covalente de polietilenglicol, tal como:



5 en el que R es dicha parte central y m es de manera independiente 3-100.

En algunas realizaciones, dicha parte periférica es zwitteriónica, es decir, contiene una multitud de cargas positivas y negativas, en una relación de 1:1, lo que hace que el total sea eléctricamente neutro.

10 En algunas realizaciones, dicha parte periférica comprende poliacrilamida reticulada.

En algunas realizaciones, dicha parte periférica comprende dextrano.

15 El segundo aspecto importante de la presente invención es un proceso para producir dichas nanoestructuras. Una ilustración esquemática de tal proceso se muestra en la Fig. 8. En su sentido más amplio, este implica, en primer lugar, la formación o adquisición de entidades (001 en la Fig. 8) poliméricas de tamaño nanométrico y globulares, que posteriormente terminan comprendiendo dicha parte central de dichas nanoestructuras y, en ningún orden particular, seguida de una etapa (002 en la Fig. 8), que, algunas veces, se puede incluir en la primera etapa (003 en la Fig. 8), cuando dichos monómeros ya llevan grupos quelantes o precursores de dichos grupos quelantes, la introducción de una multitud de grupos quelantes, y, en ningún orden particular, seguida de una etapa (004 en la Fig. 8), en la que el producto de la/s primera/s etapa/s se pone en contacto con los precursores en dicha parte periférica. Opcionalmente, las tres etapas, aunque sean químicamente distintas, se pueden llevar a cabo de manera simultánea en el mismo recipiente de reacción. En una o más instancias del proceso, se incorpora una etapa de purificación o selección de tamaño (005 en la Fig. 8) mediante la ultrafiltración o algún otro método de selección de tamaño. La Etapa (004 en la Fig. 8) se puede realizar, algunas veces, antes de la Etapa (002 en la Fig. 8). Normalmente, resulta beneficioso excluir el aire de los recipientes de reacción usados en el proceso para obtener un producto de buena calidad. La carga del equipo de proceso con gas nitrógeno es una forma útil de excluir el aire.

30 Un glóbulo de polímero de tamaño nanométrico que comprende una multitud de grupos quelantes, tales como bisfosfonatos, se obtiene mediante injerto (002 en la Fig. 8) a un glóbulo de polímero existente (obtenido mediante una Etapa 001 de polimerización en la Fig. 8) o mediante polimerización de una mezcla de polímero que comprende grupos quelantes, tales como bisfosfonatos (003 en la Fig. 8). En función de qué estructura polimérica se desee, se pueden contemplar muchos iniciadores de polimerización diferentes. En cuanto a los monómeros insaturados, como los estirenos y los acrilatos, se prefieren diversos iniciadores de radicales, tales como el benzoilperóxido o el azobisisobutironitrilo, o sus análogos solubles en agua. En cuanto a los monómeros basados en trialcoxi silano de una de las realizaciones preferidas de la presente invención, resulta posible usar una hidrólisis y condensación espontánea para efectuar la polimerización o usar catálisis de base o ácido.

40 A menudo, resulta deseable un disolvente para la Etapa 003 y, aunque se pueden contemplar muchos diferentes por parte de un experto en la materia, resulta deseable evitar los disolventes tóxicos, por lo que se prefieren el agua y los alcoholes inferiores, tales como el propanol, el butanol, el etilen glicol o el 1,3-propanodiol. A menudo, resulta deseable optimizar el rendimiento y la calidad del producto mediante el uso de mezclas de disolventes.

45 En algunas realizaciones del proceso, se usa una mezcla del 5-25 % de agua en un alcohol inferior en la Etapa 003.

En algunas realizaciones del proceso, se usa una mezcla del 5-25 % de agua en etanol, 1- o 2-propanol o 1,2- o 1,3-propanodiol o etilenglicol en la Etapa 003.

50 En algunas realizaciones de la presente invención, se ha hallado que resulta ventajoso usar temperaturas superiores a la temperatura ambiente en la Etapa 003, tales como temperaturas entre 40 y 130 °C o entre 80 y 120 °C o entre 100 y 120 °C. Cuando se usan alcoholes inferiores, resulta necesario trabajar con recipientes resistentes a la presión cerrados para lograr la temperatura de reacción deseada.

55 La duración de la Etapa 003 depende de la estructura polimérica y del modo de iniciación y puede variar de segundos a días. En cuanto a los trialcoxi silanos en una de las realizaciones preferidas de la presente invención, se

ha demostrado que resulta ventajoso usar tiempos de 6 horas a 48 horas o de 12 a 36 horas o tiempos de aproximadamente 24 horas en la Etapa 003.

5 En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la Etapa 003 son una temperatura de 105-115 °C y una duración de 20 a 30 horas.

En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la Etapa 003 son una temperatura de 105-115 °C y una duración de 30 a 60 horas.

10 En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la Etapa 003 son una temperatura de, en primer lugar, 90-100 °C durante 40-50 horas y, después, de 105-115 °C durante otras 20 a 30 horas.

15 La concentración de monómeros en la Etapa 003 depende de qué estructura polimérica se desee y puede variar de una concentración molar a condiciones libres de disolvente. Sin embargo, en cuanto a los trialcóxi silanos en una de las realizaciones preferidas de la presente invención, se ha demostrado que resulta ventajoso trabajar con una concentración de monómero de 10 mM a 500 mM o 20-100 mM y, en particular, de 40-80 mM.

20 En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la Etapa 003 son, en primer lugar, una temperatura de 90-100 °C durante 20 a 50 horas, seguida de 105-125 °C durante 20 a 30 horas y una concentración de monómero de 40-60 mM.

25 En la Etapa 002, que implica el injerto de un reactivo de bisfosfonato a una estructura polimérica, las condiciones son algo diferentes. En especial, los requisitos de la temperatura y la concentración son más leves. Los inventores han hallado que el comienzo con una solución de polietilenimina en agua, opcionalmente, con la mezcla de un codisolvente, a una temperatura compatible con el agua en estado líquido, tal como temperatura ambiente, y su contacto con un bisfosfonato capaz de reaccionar con dicha polietilenimina, tal como ácido 3,3-bis(dimetoxifosforil)propanoico, en presencia de un compuesto capaz de formar un producto intermedio de éster reactivo, tal como sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida, en presencia de un agente de acoplamiento, tal como N-(dimetilaminopropil)-N"-etil carbodiimida, a una temperatura, tal como temperatura ambiente, durante un período de tiempo de 1-48 horas, tal como de 20-24 horas, producen un material con bisfosfonatos injertados a la estructura polimérica.

35 Una etapa (005) de selección de tamaño se realiza sobre la solución de nanoestructuras para retirar las entidades no deseablemente grandes o pequeñas. Los materiales de partida y los residuos de disolvente de la mezcla de reacción también se retiran en esta fase. La ultrafiltración es un método preferido de purificación, en especial, cuando se usa en la forma que normalmente se etiqueta como filtración por flujo tangencial o diafiltración. Se prefiere retirar las nanoestructuras y/o agregados no deseablemente grandes mediante el paso de la solución a través de un filtro con poros bastante grandes, la Etapa 005a. Los valores límite nominales preferidos para tales filtros son de 0,2 μm, 1.000 kDa o 300 kDa. En una Etapa 005b, el material deseado se recoge en un filtro con un tamaño de poro más pequeño. Los tamaños de poro preferidos para la Etapa 005b tienen valores límite nominales en 300 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa o 10 kDa, con la condición de que cuando se use un filtro de 300 kDa en la Etapa 005b, el filtro usado en la Etapa 005a debe tener poros más grandes.

45 La etapa de selección de tamaño (004) puede que no se requiera si el material de partida tiene una distribución de tamaño estrecha.

50 En algunas realizaciones de la invención, se hace pasar una solución obtenida a partir de las Etapas 002 o 003 del proceso, en primer lugar, a través de un filtro de 500 kDa (Etapa 004a) y, posteriormente, se recoge en un filtro de 100 kDa (Etapa 004b).

En algunas realizaciones de la invención, se hace pasar una solución obtenida a partir de las Etapas 002 o 003 del proceso, en primer lugar, a través de un filtro de 300 kDa (Etapa 004a) y, posteriormente, se recoge en un filtro de 100 kDa (Etapa 004b).

55 Resulta ventajoso lavar el material con varias partes de agua después de la Etapa 004b para retirar, adicionalmente, los monómeros sin reaccionar o los residuos de disolvente de la Etapa 001, 002 o 003.

60 También se pueden usar otros métodos de ultrafiltración, tales como filtros de espín o diálisis, aunque estos son menos escalables.

Las partículas del intervalo de tamaño deseado también se pueden seleccionar mediante cromatografía de exclusión por tamaño (también denominada filtración en gel).

65 Opcionalmente, dichas nanoestructuras se pueden purificar en una Etapa 007. La Etapa 007 puede tener varias Subetapas 007a, 007b, etc. de, para una subetapa, en ningún orden particular, 007x.

Un método preferido de una Etapa 007x de purificación es un tratamiento con una cantidad pequeña de sílice para retirar el precursor sin reaccionar de dicha parte periférica.

5 En algunas realizaciones de la invención, la Etapa 007x implica otra diafiltración más que recoja el material en un filtro.

También se pueden añadir Etapas 007x de purificación posteriores para retirar las impurezas lipófilas, tales como las trazas de endotoxinas (residuos de bacterias muertas).

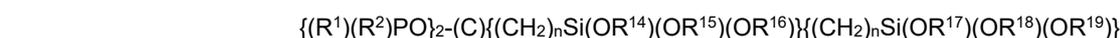
10 En algunas realizaciones del proceso, el producto de la Etapa 006 se somete a tratamiento con carbón vegetal activado.

En algunas realizaciones del proceso, el producto de la Etapa 006 se hace pasar a través de un filtro de polietileno o polipropileno o PVDF.

15 En algunas realizaciones del proceso, el producto de la Etapa 006 se somete a tratamiento con polimixina B inmovilizada.

20 En algunas realizaciones, la nanoestructura globular se puede producir mediante un proceso que comprende las etapas de:

1) formar una parte central mediante una polimerización hidrolítica de un disilano de la estructura



en la que

30  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilo inferiores y arilo y  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $^{18}$  y  $R^{19}$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en alquilo inferiores y arilo;

y  
n=1-5; y

35 2) poner en contacto dicha parte central con un precursor de la parte periférica en condiciones favorables para que dicha parte se una de manera covalente a dicha parte central.

En el tercer aspecto importante de la invención, dicha nanoestructura quela un radionúclido.

40 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura, que es el del primer aspecto de la invención, es entre 8 y 100 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

45 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es de entre 8 y 100 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 100 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para la radioterapia.

50 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 50 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es de entre 8 y 50 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen.

55 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 50 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para la radioterapia.

60 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).

65 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m en su forma tri-catiónica ( $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ ).

5 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para la radioterapia.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

10 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

15 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

20 En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de dicha nanoestructura es entre 8 y 20 nm y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia, tal como lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).

25 En algunas realizaciones, la parte central de dicha nanoestructura del primer aspecto de la invención comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica se deriva de polialquenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliamidas, poliestireno, polidimetilsiloxanos (siliconas), poliorganosilanos, poliaminas, tales como polietilenimina, o carbohidratos, que quelan radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

30 En algunas realizaciones, la parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica se deriva de polialquenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliamidas, poliestireno, polidimetilsiloxanos (siliconas), poliorganosilanos, poliaminas, tales como polietilenimina, o carbohidratos, que quelan radionúclidos para el diagnóstico por imagen.

35 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica se deriva de polialquenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliamidas, poliestireno, polidimetilsiloxanos (siliconas), poliorganosilanos, poliaminas, tales como polietilenimina, o carbohidratos, que quelan radionúclidos para la radioterapia.

40 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).

En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano y dicha nanoestructura quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ ).

45 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano y dicha nanoestructura quela un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

50 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano que quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

55 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano que quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

60 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica en la que dicha estructura polimérica es un poliorganosilano que quela radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia, tales como lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).

En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

65 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que quela un radionúclido para el diagnóstico por imagen.

En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende un polímero ramificado que quelata un radionúclido para la radioterapia.

5 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).

10 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ).

15 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) y un radionúclido quelado para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

20 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ) y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

25 En algunas realizaciones, dicha parte central de dicha nanoestructura comprende una estructura polimérica ramificada que comprende polietilenimina que comprende un radionúclido quelado para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia, tal como lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).

30 En algunas realizaciones, dicha parte central quelata un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia en la que dicha parte periférica comprende materiales poliméricos seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en  $\text{A}-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{OR}^9$ , en el que  $m=2-100$  y  $\text{R}^9$  es un H o alquilo inferiores y A es un grupo unido a o incorporado en dicha estructura polimérica y dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en:

- OSi( $\text{R}^{10}$ ) $_2$ ( $\text{CH}_2$ ) $_o$ -, en el que  $\text{R}^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en H o hidrocarburos C1-C8 y  $o=2-5$ ;
- 35 -OSi( $\text{OR}^{11}$ ) $_2$ ( $\text{CH}_2$ ) $_o$ -, en el que  $\text{R}^{11}$  se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en un enlace covalente a la estructura polimérica, H e hidrocarburos C1-C8 y  $o=2-5$ ;
- NR $^{10}$ -C=O-( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que  $\text{R}^{10}$  es tal como anteriormente y  $m=2-5$ ;
- O-C=O-( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que  $m=2-5$ ;
- NR $^{10}$ -( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que  $\text{R}^{10}$  es tal como anteriormente y  $m=2-5$ ;
- 40 -( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que  $m=2-5$ ;
- O-( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que  $m=2-5$ ; y
- SX $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_m$ -, en el que X es de manera independiente nada u O y  $m=2-5$ .

45 En algunas realizaciones que comprenden una pluralidad de dichas nanoestructuras, el número promedio de radionúclidos quelados para cada una de dichas nanoestructuras es entre 0,1-20.000/nanoestructura, en las que dicho radionúclido es un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

50 En algunas realizaciones que comprenden una pluralidad de dichas nanoestructuras, el peso molecular promedio de dichas nanoestructuras es entre 50.000 y 300.000.000 Da, en las que dichas nanoestructuras quelatan radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia, con la condición de que el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras sea de 8-100 nm.

55 En el cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para la obtención de una composición que comprende nanoestructuras que comprenden radionúclidos, en el que una pluralidad de nanoestructuras de acuerdo con el primer aspecto de la invención se pone en contacto con al menos un radionúclido.

60 En el quinto aspecto importante de la invención, se usa una composición que comprende una pluralidad de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia como agente de diagnóstico por imagen y/o radioterapéutico para procedimientos diagnósticos y/o radioterapéuticos. La composición que comprende una pluralidad de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o terapia se puede usar para diagnosticar, suministrar radioterapia, así como controlar la respuesta a la radioterapia.

65 Dichas composiciones que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia descritas en el presente documento se pueden contemplar para el tratamiento y/o el diagnóstico de cualquier enfermedad, trastorno y/o afección que presente microvasculatura permeable, tal como cáncer y afecciones inflamatorias.

Las composiciones de nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia de acuerdo con la presente invención se pueden usar para someter a tratamiento, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar la aparición de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de, reducir los efectos adversos de una terapia de combinación y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o signos de tal enfermedad, trastorno y/o

5 afección en especies que incluyen seres humanos y/u otros primates; mamíferos, que incluyen mamíferos comercialmente relevantes, tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y/o perros; y/o aves.

Este aspecto de la invención también se refiere a un método para la administración de composiciones que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia de acuerdo con la presente invención a un sujeto que padezca cáncer. Tales métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nanoestructuras de la invención que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia a un sujeto en tales cantidades y durante tal tiempo, tal como sea necesario, para lograr el resultado deseado (es decir, someter a tratamiento, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar la aparición de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de, reducir los efectos adversos de una terapia de combinación y/o reducir la incidencia de uno o más

10 síntomas o signos de cáncer).

En algunas realizaciones, dicha composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia se puede usar para diagnosticar y/o someter a tratamiento tumores de tejidos blandos.

20 En algunas realizaciones, dicha composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia se puede usar para diagnosticar y/o someter a tratamiento una enfermedad metastásica.

En algunas realizaciones, la administración de una composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen se usa para diagnosticar una enfermedad y, posteriormente, la administración de dicha composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para la radioterapia, se usa para someter a tratamiento tumores de tejidos blandos.

25 En algunas realizaciones, la administración de una composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para el diagnóstico por imagen se usa para diagnosticar una enfermedad y, posteriormente, la administración de dicha composición de dichas nanoestructuras que comprenden un radionúclido para la radioterapia, se usa para someter a tratamiento tumores de tejidos blandos.

El uso *in vivo* de las nanoestructuras de la presente invención requiere que las mismas se formulen en una composición de forma farmacológicamente aceptable de acuerdo con la mejor práctica bien conocida por parte de aquellos expertos en la materia. De acuerdo con la presente invención, una composición que comprende las nanoestructuras se puede administrar a un sujeto que lo necesito de una manera que garantice el suministro de las nanoestructuras a los tejidos que comprenden una microvasculatura permeable. Tal administración puede garantizar que las nanoestructuras se pongan en circulación en la sangre o la linfa. El modo de administración preferido es, por tanto, parenteral y, de manera específica, inyección intravenosa, sin embargo, se contemplan otras vías de administración, tales como vía oral, transdérmica, transmucosa, intraperitoneal, intracraneal, intraocular, epidural, intratecal, intranasal, tópica, rectal, vaginal, pulmonar.

30 El uso *in vivo* de las nanoestructuras de la presente invención requiere que las mismas se formulen en una composición de forma farmacológicamente aceptable de acuerdo con la mejor práctica bien conocida por parte de aquellos expertos en la materia. De acuerdo con la presente invención, una composición que comprende las nanoestructuras se puede administrar a un sujeto que lo necesito de una manera que garantice el suministro de las nanoestructuras a los tejidos que comprenden una microvasculatura permeable. Tal administración puede garantizar que las nanoestructuras se pongan en circulación en la sangre o la linfa. El modo de administración preferido es, por tanto, parenteral y, de manera específica, inyección intravenosa, sin embargo, se contemplan otras vías de administración, tales como vía oral, transdérmica, transmucosa, intraperitoneal, intracraneal, intraocular, epidural, intratecal, intranasal, tópica, rectal, vaginal, pulmonar.

La administración parenteral requiere a menudo una formulación líquida. El agua es un disolvente preferido para llevar las nanoestructuras de la presente invención a una solución, pero se pueden añadir uno o más codisolventes en el 0,1 -10 % para mejorar la estabilidad en solución. Los codisolventes aceptables son los alcoholes, como el etanol o el glicerol, los polímeros biocompatibles, como el polietilenglicol o el alcohol de polivinilo, el sulfóxido de dimetilo o la pirrolidiona de N-metilo. También puede resultar ventajoso añadir uno o más osmoreguladores, como el manitol, el sorbitol, la lactosa, la glucosa u otros azúcares o alcoholes de azúcar. Resulta deseable que la formulación sea isoosmótica con los fluidos corporales. Preferentemente, la solución para su uso intravenoso tiene una osmolalidad de 270-2.000 mOsm o 280-1.000 mOsm o 280-500 mOsm o, en particular, de 280-300 mOsm. Muchos de dichos aditivos también pueden cumplir la función de crioprotectores, lo que potencia la eficacia de la reconstitución después de la liofilización. También resulta ventajoso añadir electrolitos para disminuir los efectos fisiológicos de la solución inyectada. Los electrolitos preferidos podrían ser una combinación de sales no tóxicas de sodio, calcio o y/o magnesio. La regulación del pH de la solución inyectable es preferible y se puede contemplar cualquier tampón adecuado para la inyección, pero el preferido es Tris-HCl.

40 La administración parenteral requiere a menudo una formulación líquida. El agua es un disolvente preferido para llevar las nanoestructuras de la presente invención a una solución, pero se pueden añadir uno o más codisolventes en el 0,1 -10 % para mejorar la estabilidad en solución. Los codisolventes aceptables son los alcoholes, como el etanol o el glicerol, los polímeros biocompatibles, como el polietilenglicol o el alcohol de polivinilo, el sulfóxido de dimetilo o la pirrolidiona de N-metilo. También puede resultar ventajoso añadir uno o más osmoreguladores, como el manitol, el sorbitol, la lactosa, la glucosa u otros azúcares o alcoholes de azúcar. Resulta deseable que la formulación sea isoosmótica con los fluidos corporales. Preferentemente, la solución para su uso intravenoso tiene una osmolalidad de 270-2.000 mOsm o 280-1.000 mOsm o 280-500 mOsm o, en particular, de 280-300 mOsm. Muchos de dichos aditivos también pueden cumplir la función de crioprotectores, lo que potencia la eficacia de la reconstitución después de la liofilización. También resulta ventajoso añadir electrolitos para disminuir los efectos fisiológicos de la solución inyectada. Los electrolitos preferidos podrían ser una combinación de sales no tóxicas de sodio, calcio o y/o magnesio. La regulación del pH de la solución inyectable es preferible y se puede contemplar cualquier tampón adecuado para la inyección, pero el preferido es Tris-HCl.

Una formulación administrable por vía rectal o una formulación que se administra por vía rectal puede ser esencialmente isoosmótica con fluidos biológicos, típicamente de 290 mOsm. El potencial osmótico se regula mediante la adición de osmoreguladores de moléculas pequeñas, tales como cloruro de sodio o manitol. La formulación es de un volumen suficiente como para llenar la parte del colon de interés y puede ser un líquido de flujo libre o puede tener aditivos de modificación de la viscosidad como el polietilén glicol (PEG) de alto peso molecular para una manipulación mejorada. Se puede formular como espuma o preparación espumable para lograr un gran volumen sin requerir un gran volumen de líquido.

55 Una formulación administrable por vía rectal o una formulación que se administra por vía rectal puede ser esencialmente isoosmótica con fluidos biológicos, típicamente de 290 mOsm. El potencial osmótico se regula mediante la adición de osmoreguladores de moléculas pequeñas, tales como cloruro de sodio o manitol. La formulación es de un volumen suficiente como para llenar la parte del colon de interés y puede ser un líquido de flujo libre o puede tener aditivos de modificación de la viscosidad como el polietilén glicol (PEG) de alto peso molecular para una manipulación mejorada. Se puede formular como espuma o preparación espumable para lograr un gran volumen sin requerir un gran volumen de líquido.

En algunas realizaciones, la composición se formula para su inyección parenteral.

En algunas realizaciones, la composición se formula para su inyección intravenosa.

60 En algunas realizaciones, la composición se formula para su inyección intravenosa.

En algunas realizaciones, la composición se formula para su administración rectal en forma de líquido, tal como un enema de retención.

5 Se apreciará que la dosificación exacta de la nanoestructura o los componentes de la misma, tales como un radionúclido, se puede determinar por parte de un médico en vista del paciente a someter a tratamiento. En general, la dosificación y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz del conjugado de la invención al paciente que se somete a tratamiento. Tal como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Tal como apreciarán aquellos expertos habituales en esta materia, la cantidad eficaz puede variar en función de factores, tales como el criterio de valoración biológico deseado, el radionúclido que se suministra, el tejido diana, la vía de administración, etc. Los factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad; la edad, el peso y el género del paciente que se somete a tratamiento; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; las combinaciones de radionúclidos; y la tolerancia/respuesta a la radioterapia.

15 En cualquier composición, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente mediante cálculo, en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para lograr el intervalo de concentración y la vía de administración deseables. Tal información se puede usar después para determinar las dosis y las vías de administración útiles en los seres humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las composiciones se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 y LD50. La relación de dosis de los efectos tóxicos respecto a los terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación, LD50/ED50.

25 Se podría contemplar cualquier radionúclido para cualquier fin de diagnóstico por imagen; sin embargo, los radionúclidos que cumplen los criterios de emisión de un tipo adecuado de radiación con semividas adecuadas especialmente aptos para aplicaciones de diagnóstico por imagen son los preferidos en la presente invención. Los radioisótopos ideales para las aplicaciones de diagnóstico son aquellos con semivida relativamente corta y aquellos con radiación de alta penetración que se detectan mediante técnicas de diagnóstico por imagen, tales como PET y/o SPECT. La semivida del radionúclido debe permitir la acumulación en el tejido diana en el paciente, al tiempo que permite el aclaramiento a través de los órganos no diana. El diagnóstico por imagen incluye el diagnóstico por imagen para el diagnóstico, el control de los efectos del tratamiento o el control de la localización y la dosis de las nanoestructuras usadas para la radioterapia. La incorporación de un radioisótopo para el diagnóstico por imagen en una nanoestructura tiene la ventaja de permitir el seguimiento *in vivo* de las nanoestructuras y la dosimetría en un sujeto. Por ejemplo, se pueden estudiar la biodistribución y/o la eliminación de las nanoestructuras. Un mejor entendimiento de la biodistribución o la eliminación de las nanoestructuras se puede usar para alterar el tratamiento del paciente. Por ejemplo, es posible que sea necesario usar más o menos nanoestructuras en el tratamiento del sujeto. Si la acumulación de las nanoestructuras en el/los tumor/es es muy buena, es posible que se necesiten menos de dichas nanoestructuras que comprenden dichos radionúclidos. Si la acumulación en un sujeto particular es deficiente, es posible que se necesiten más nanoestructuras o el médico que lo atiende puede recurrir a un tratamiento diferente por completo.

En algunas realizaciones, una composición de nanoestructuras que comprenden radionúclidos para el diagnóstico por imagen se usa para el diagnóstico por imagen de un sujeto.

45 En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para el diagnóstico por imagen en la composición de dichas nanoestructuras comprende tecnecio-99m en una forma catiónica trivalente ( $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ ) y se usa para el diagnóstico por imagen de un sujeto.

50 En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para el diagnóstico por imagen en la composición de dichas nanoestructuras comprende radionúclidos para el diagnóstico por imagen de PET y se usa para el diagnóstico por imagen de un sujeto.

55 En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para el diagnóstico por imagen en una composición de dichas nanoestructuras comprende galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) y se usa para el diagnóstico por imagen de un sujeto.

En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para el diagnóstico por imagen en la composición de dichas nanoestructuras comprende radionúclidos para el diagnóstico por imagen de SPECT y se usa para el diagnóstico por imagen de un sujeto.

60 En algunas realizaciones, la técnica de diagnóstico por imagen usada es la tomografía de emisión de positrones (PET).

En algunas realizaciones, la técnica de diagnóstico por imagen usada es la tomografía computerizada de emisión de fotones individuales (SPECT).

65

- 5 Se podría usar cualquier radionúclido para la radioterapia; sin embargo, los radionúclidos que cumplen los criterios de emisión de un tipo adecuado de radiación con semividas adecuadas especialmente aptos para aplicaciones de radioterapia son los preferidos en la presente invención. Los radionúclidos ideales para aplicaciones terapéuticas son aquellos con una radiación de penetración baja, tales como los emisores  $\beta$  y  $\alpha$ . Cuando el radioisótopo de emisión en forma de producto radiofarmacéutico alcanza el sitio diana, la energía emitida se deposita únicamente en el sitio diana y los tejidos normales cercanos se irradian mínimamente. La energía de las partículas emitidas desde los diferentes radioisótopos y sus intervalos en los tejidos variará, así como su semivida, y el radioisótopo más adecuado será diferente en función de la aplicación, la enfermedad y la accesibilidad del tejido de la enfermedad.
- 10 En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprende radionúclidos para la radioterapia y se usa para someter a tratamiento un sujeto.
- 15 En algunas realizaciones de la invención, el radionúclido para la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprende itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y se usa para someter a tratamiento un sujeto.
- 20 Se pueden contemplar muchos radionúclidos para fines terapéuticos y de diagnóstico por imagen en combinación; sin embargo, los radionúclidos que cumplen los criterios de emisión de un tipo adecuado de radiación con semividas adecuadas son especialmente aptos para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico por imagen en combinación de la presente invención. Los radionúclidos ideales para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico por imagen son aquellos con una radiación de penetración baja, tales como los emisores  $\beta$  y  $\alpha$ , en combinación con los radionúclidos con una radiación de penetración alta que se detectan mediante técnicas de diagnóstico por imagen, tales como PET y/o SPECT. Los radionúclidos que emiten una radiación de penetración tanto alta como baja también se pueden contemplar. La semivida del/de los radionúclido/s debe permitir la acumulación en el tejido diana en el paciente, al tiempo que permite el aclaramiento a través de los órganos no diana.
- 25 En algunas realizaciones, una composición de nanoestructuras que comprenden radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la terapia se usa para el diagnóstico por imagen y/o la terapia de un sujeto.
- 30 En algunas realizaciones, una composición de nanoestructuras que comprenden isótopos no radioactivos de dichos radionúclidos, así como radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la terapia, se usa para el diagnóstico por imagen y/o la terapia de un sujeto.
- 35 En algunas realizaciones, los radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprenden radionúclidos para el diagnóstico por imagen de PET y la radioterapia y se usan para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 40 En algunas realizaciones, los radionúclidos para el diagnóstico por imagen de PET y la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprenden galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y se usan para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 45 En algunas realizaciones, los radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprenden tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ) e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y se usan para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 50 En algunas realizaciones, los radionúclidos para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia en la composición de dichas nanoestructuras comprenden lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) y se usan para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 55 De acuerdo con el sexto aspecto de la invención, se proporciona una pluralidad de dichas nanoestructuras en un kit. Los kits incluyen típicamente instrucciones para el uso de las partículas de la invención. Las instrucciones pueden comprender, por ejemplo, protocolos y/o describir condiciones para la producción de las nanoestructuras de la invención y la administración de las estructuras de la invención a un sujeto que lo necesite, etc. Los kits incluirán, en general, uno o más recipientes o envases para que algunos o todos los componentes individuales y reactivos puedan contenerse por separado. Los kits pueden incluir también un medio para encerrar los envases individuales en un confinamiento relativamente cercano para la venta comercial, por ejemplo, una caja de plástico. Un identificador, tal como un código de barras, puede estar presente en o sobre el kit o en uno o más de los recipientes o envases incluidos en el kit. Se puede usar un identificador para identificar de manera única el kit para fines de control de calidad o control de inventario.
- 60 En algunas realizaciones del sexto aspecto importante de la invención, la presente invención se refiere a un kit que comprende:
- 65 - a. una pluralidad de nanoestructuras; y

- b. un tampón acuoso con un pH de 6-7,5 y una osmolalidad de 500-2.000 mOsm/kg, que comprende uno o más reguladores del pH y
- c. una composición que contiene un radionúclido en forma catiónica.

5 En algunas realizaciones de dicho kit, dicho kit es para la preparación de nanoestructuras que comprenden radionúclidos y dichos radionúclidos se proporcionan por separado del kit. Por lo tanto, dicho kit comprende:

- a. una pluralidad de nanoestructuras y
- b. un tampón acuoso con un pH de 6-7,5 y una osmolalidad de 500-2.000 mOsm/kg, que comprende uno o más reguladores del pH.

10 En algunas realizaciones, la composición que contiene el radionúclido se encuentra en almacenamiento o se suministra por parte del fabricante en función de las características del radionúclido particular.

15 Si el radionúclido es, por ejemplo, el emisor de positrones  $^{64}\text{Cu}$ , dicho radionúclido se suministra directamente desde una instalación de ciclotrón al lugar del tratamiento o el diagnóstico inmediatamente antes de su uso, en forma de sal (liofilizada) o solución acuosa. Antes de la administración de las nanoestructuras que contienen radionúclidos, las partes a, b y c del kit se mezclan y se somete a ensayo la eficacia del enlazado, preferentemente usando el procedimiento de ensayo sencillo suministrado con el kit. Después de la administración, al paciente se le puede practicar una exploración de PET o SPECT. La visualización óptima se puede lograr 1-24 horas después de la administración.

25 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito en el presente documento, el kit comprende un radionúclido para la radioterapia.

25 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit de partes comprende un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

30 En algunas realizaciones de la invención, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen.

30 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ).

35 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET.

35 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).

40 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT.

40 En algunas realizaciones del kit desvelado, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ).

45 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

50 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET y un radionúclido para la radioterapia.

55 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET, tal como galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

55 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT y un radionúclido para la radioterapia.

60 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT, tal como tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ) y un radionúclido para la radioterapia, tal como itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

65 En algunas realizaciones del kit desvelado descrito anteriormente, el kit comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen y la radioterapia, tal como lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).

**Ejemplos**

Ejemplo 1a:

5 *Polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (Comp. 1) para producir partes centrales Xa*

10 El Comp. 1 (640,8 mg, 1 mmol, sintetizado tal como se describe en el Ejemplo 1, documento EP2572736 A1) se disolvió en 20 ml de etilen glicol al 80 % acuoso en un matraz de fondo redondo de tres bocas. La mezcla de reacción se desgasificó mediante la aplicación de vacío al matraz de reacción y, posteriormente, la carga con gas nitrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 114 °C. Después de dejar que la solución transparente se enfriara a temperatura ambiente, esta se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 µm (Pall Corporation). Ejemplo 1a1. Tiempo de retención de GPC: 14,16 min

- 15
- la solución de 0,5 mg/ml de albúmina (de clara de huevo de pollo) dio como resultado un tamaño: DLS= 7,0 nm y un tiempo de retención de pico de GPC = 12,52 min.
  - Tiempo de retención de GPC, Superose 12 10/300 GL, NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM, pH=7,4, flujo de 1 ml/min.

20 *Ejemplo 1b: Polimerización lenta del Comp. 1 para producir partes centrales Xb*

25 Se mezclaron 20 ml de partes centrales Xa con 32 ml de agua MilliQ en un matraz de fondo redondo de tres bocas. La mezcla de reacción se desgasificó mediante la aplicación de vacío al matraz de reacción y, posteriormente, la carga con gas nitrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 114 °C. El Comp. 1 (5,126 g, 8 mol) se disolvió en 128 ml de etilen glicol y se inyectó en el matraz de reacción usando una bomba de jeringa hasta una concentración final de fósforo 100 mM. Los ajustes de la inyección de bomba fueron 200 µl/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 50 y la jeringa de inyección usada fue de 50 ml. Se conectó un temporizador a la bomba, de tal manera que solo inyectara la solución 15 min por hora. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 49 h a una temperatura establecida de 122 °C. La temperatura real en el matraz de reacción fue de 100 °C (cuando se añadieron 0 ml de la solución del Comp. 1), de 103 °C (después de añadirse 50 ml de la solución del Comp. 1), de 106 °C (después de añadirse 100 ml de la solución del Comp. 1), de 112 °C (después de añadirse toda la solución del Comp. 1). Después de dejar que la solución transparente se enfriara a temperatura ambiente, esta se filtró a través de un filtro de microfibras de vidrio Whatman (50 mm de diámetro, de Sigma-Aldrich) usando una bomba Watson Marlow a una velocidad de 5,0.

35 Ejemplo 1b1. Tiempo de retención de GPC: 14,02 min

Ejemplo 1c: Polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (Comp. 1) para producir partes centrales Xc

40 El Comp. 1 (48,36 g, 75 mmol, sintetizado tal como se describe en el Ejemplo 1, documento EP2572736 A1) se disolvió en 800 ml de etilen glicol y, a continuación, se diluyó con 200 ml de agua MilliQ en un reactor de 2 l encamisado equipado con un controlador de temperatura (Huber ministat 240) para la circulación de aceite. La mezcla de reacción se desgasificó mediante la aplicación de vacío al matraz de reacción y, posteriormente, la carga con gas nitrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 45 33 h a 120 °C. Después de dejar que la solución transparente se enfriara a temperatura ambiente, esta se diluyó hasta 2 l con agua MilliQ. El pH se ajustó a 7,4 con base Trizma 1 M y la solución se filtró a través de un filtro de flujo rápido estéril de 0,2 µm (Nalgene).

50 Ejemplo 1c1. Tiempo de retención de GPC: 10,28 min

Diámetro hidrodinámico de DLS: 15,3 nm

- 55
- la solución de 0,5 mg/ml de albúmina (de clara de huevo de pollo) dio como resultado un tamaño: DLS= 7,0 nm y un tiempo de retención de pico de GPC = 12,52 min.

Tiempo de retención de GPC, Superose 12 10/300 GL, NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH=7,4, flujo de 1 ml/min.

Ejemplo 2: Adición de parte periférica de poli(etilen óxido)-silanos a partes centrales X.

60 Procedimiento general: las partes centrales X en etilen glicol al 80 % acuoso (20 ml, P 100 mM) se colocaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas y la solución se desgasificó mediante tres ciclos de nitrógeno al vacío. Posteriormente, la solución se agitó y se calentó a 114 °C. A continuación, se añadió mediante una bomba de jeringa una solución del precursor de trialcóxido silano-PEG de la parte periférica, tal como se especifica más adelante en los Ejemplos 2a-e individuales. Los ajustes de la inyección de bomba fueron 150 µl/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 50 y la jeringa de inyección usada fue de 5 ml. La mezcla de reacción se agitó y calentó durante 6 h a 114 °C.

Ejemplo 2a: Derivación de la parte periférica a partir de 2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano, 6-9 unidades de EG

5 Una solución que consiste en 2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano (6-9 unidades de EG al 90 %, 508 µl, 1 mmol, 656 mM) en 1.016 µl de etilen glicol al 100 % se inyectó con la bomba de jeringa, hasta una concentración final de 46,4 mM en la mezcla de reacción.

Ejemplo 2a1. Tiempo de retención de GPC (producto): 14,27 min

10 Ejemplo 2b: Derivación de la parte periférica a partir de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 9-12 unidades de EG al 90 %

15 Una solución de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano (9-12 unidades de EG al 90 %, 616 µl, 1 mmol, 541 mM) en 1.232 µl de etilen glicol al 100 % se inyectó con la bomba de jeringa, hasta una concentración final de 45,8 mM en la mezcla de reacción.

Ejemplo 2b1. Tiempo de retención de GPC (producto): 14,37 min

20 Ejemplo 2b2. Tiempo de retención de GPC (producto): 14,65 min

2c. Ejemplo profético: Derivación de la parte periférica a partir de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 16 unidades de EG.

25 Una solución de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 16 unidades de EG (1 mmol, 38 mM) disueltas en una mezcla de 26 ml de etilen glicol y 1,4 dioxano (11:15), se inyectó con la bomba de jeringa hasta una concentración final de 21,7 mM en la mezcla de reacción. En este caso, la mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 24 h a 114 °C.

30 Ejemplo 2d: Derivación de la parte periférica a partir de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 44 unidades de EG.

Una solución de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 44 unidades de EG (2,133 g, 1 mmol, 38 mM) disueltas en una mezcla de 26 ml de etilen glicol y 1,4 dioxano (11:15), se inyectó con la bomba de jeringa hasta una concentración final de 21,7 mM en la mezcla de reacción. En este caso, la mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 24 h a 114 °C.

35 Tiempo de retención de GPC (producto): 13,05 min

Ejemplo 2e: Derivación de la parte periférica a partir de metoxi(polietileno)propiltrióxosilano, 44 unidades de EG.

40 Una solución de metoxi(polietileno)propiltrióxosilano, 44 unidades de EG (2,175 g, 1 mmol, 38 mM) disueltas en una mezcla de 26 ml de etilen glicol: 1,4 dioxano (11:15), se inyectó con una bomba de jeringa, hasta una concentración final de 21,7 mM en la mezcla de reacción. Los ajustes de la inyección de bomba fueron 150 µl/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 50 y la jeringa de inyección usada fue de 50 ml. En este caso, la mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 24 h a 114 °C.

45 Tiempo de retención de GPC (producto): 13,16 min

2f. Ejemplo profético: Derivación de la parte periférica a partir de una combinación de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 44 unidades de EG y 2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano; 6-9 unidades de EG

50 Las partes centrales X en etilen glicol al 80 % acuoso (20 ml, P 100 mM) se colocaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas y la solución se desgasificó mediante la aplicación de vacío al matraz de reacción y, posteriormente, la carga con gas nitrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, la solución se agitó y se calentó a una temperatura de 114 °C. A continuación, una solución de metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 44 unidades de EG (2,133 g, 1 mmol, 38 mM) disueltas en una mezcla de 26 ml de etilen glicol: 1,4 dioxano (11:15), se inyectó con una bomba de jeringa, hasta una concentración final de 21,7 mM en la mezcla de reacción. Los ajustes de la inyección de bomba deben ser 150 µl/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 50 y la jeringa de inyección usada fue de 50 ml. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 24 h a 114 °C. A continuación, una solución de 2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano (6-9 unidades de EG al 90 %, 254 µl, 0,5 mmol, 656 mM) en 508 µl de etilen glicol al 100 % se inyectó con una bomba de jeringa, hasta una concentración final de 10,7 mM en la mezcla de reacción. Los ajustes de la inyección de bomba deben ser 150 µl/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 50 y la jeringa de inyección usada fue de 5 ml. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 6 h a 114 °C.

55

60

Ejemplo 3: Tratamiento en gel de sílice de nanoestructuras para retirar los monómeros de la parte periférica que se adhieren, pero no se enlazan de manera covalente, a las nanoestructuras.

Las nanoestructuras del Ejemplo 2b se colocaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas y la solución se desgasificó mediante tres ciclos de nitrógeno al vacío. Posteriormente, la solución se agitó y se calentó a una temperatura de 114 °C. El flujo de gas nitrógeno se aumentó para crear una ligera presión hacia afuera y se añadieron 250 mg de gel de sílice (tamaño de poro de 60 Å, tamaño de partícula de 40-63 µm, de Sigma Aldrich) al matraz de fondo redondo de tres bocas. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 1 h a 114 °C. Después de dejar que la solución transparente se enfriara a temperatura ambiente, esta se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 µm (Pall Corporation).

Ciclo 1: 0,37 mmol del Comp. 1. 1,79 mmol de PEG9-12. Relación de Si/P esperada de ICP 3,39. Relación de Si/P final de ICP 1,71, lo que indicaba que se retiró el 70 % del PEG añadido. Se aclaró el 336 % en moles de PEG. Permaneció el 142 % en moles de PEG.

Ciclo 2: 1,12 mmol del Comp. 1. 1,79 mmol de PEG9-12. Relación de Si/P esperada de ICP 1,80. Relación de Si/P final de ICP 1,45, lo que indicaba que se retiró el 44 % del PEG añadido. Se aclaró el 70 % en moles de PEG. Permaneció el 90 % en moles de PEG.

Ejemplo 4: Ultrafiltración de las nanoestructuras sintetizadas de acuerdo con el Ejemplo 2

Una solución de nanoestructuras del Ejemplo 2 se diluyó con H<sub>2</sub>O MilliQ (20 ml). El pH se ajustó de pH 2 a pH 7,0-7,5 usando una base Tris 1 M. La solución se transfirió a filtros de espín de 300 kDa (Vivaspin®20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 50 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min para retirar los monómeros de PEG-silano libres y los oligómeros pequeños reticulados de PEG-silano que no se habían adherido a las nanoestructuras. Se llevó a cabo la adición repetida del agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después de cada adición fueron de 15 min, 10 min, 5 min, 5 min y 5 min, respectivamente.

Ciclo 1: 1,12 mmol del Comp. 1. 1,80 mmol de PEG9-12. Relación de Si/P esperada de ICP 1,806. Relación de Si/P final de ICP 1,646, lo que indicaba que se retiró el 20 % del PEG añadido. Se aclaró el 32 % en moles de PEG. Permaneció el 129 % en moles de PEG. Rendimiento después del lavado (de ICP): P: 20,7 %. Tiempo de retención de GPC (producto): 12,82 min

Ciclo 2: 1,12 mmol del Comp. 1. 1,80 mmol de PEG9-12. Relación de Si/P esperada de ICP 1,806. Relación de Si/P final de ICP 1,634, lo que indicaba que se retiró el 21 % del PEG añadido. Se aclaró el 34 % en moles de PEG. Permaneció el 127 % en moles de PEG. Rendimiento después del lavado (de ICP): P: 27,5 %. Tiempo de retención de GPC (producto): 13,20 min

Ejemplo 4b. Ultrafiltración y diafiltración de soluciones que contienen nanoestructuras

Se diluyó 1 l de las nanoestructuras sintetizadas de acuerdo con el Ejemplo 1c con 5 l de agua MilliQ. La solución que contenía las nanoestructuras se filtró mediante filtración de flujo tangencial a través de un cartucho Centramate de la serie T (Pall) de 300 kDa y se recogió en un cartucho Centramate de la serie T (Pall) de 100 kDa.

4b1: 75 mmol del Comp. 1. Rendimiento después de la filtración (de ICP): P: 29 %. Tiempo de retención de GPC (producto): 10,32 min  
Diámetro hidrodinámico de DLS: 12,7 nm

Ejemplo 5: Carga de itrio-89 de las nanoestructuras y purificación mediante ultrafiltración.

Se disolvió el hexahidrato de cloruro de itrio (521,8 mg, 1,72 mmol) en 10 ml de agua MilliQ hasta una concentración de 172 mM. Se agitó una solución de 10 ml de nanoestructuras ultrafiltradas de acuerdo con el Ejemplo 4 y se añadieron 600 µl de solución de hexahidrato de cloruro de itrio 172 mM en 100 µl de alícuotas en agitación. La solución se dejó mezclar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, la solución se transfirió a filtros de espín de 300 kDa (Vivaspin®20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 100 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm a 25 °C durante 30 min para retirar cualquier ion de itrio libre. Se añadió agua MilliQ y la filtración del retenido recogido se llevó a cabo a 3.500 rpm y 25 °C durante 5 min. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 5 ml.

1,12 mmol del Comp. 1. 1,80 mmol de PEG9-12. 0,114 mmol de Y. Rendimiento después del lavado (ICP): P: 46,9 %, Y: 45,9 %. Rendimiento de P total después del lavado en el Ejemplo 4 y 5: 12,9 %.

Picos de GPC después de la adición de Y. Tiempo de retención de GPC: 10,58 min (producto), 18,54 min (sales)

Picos de GPC después de la ultrafiltración. Tiempo de retención de GPC: 10,76 min (producto). Se redujo la altura de pico en 18,54 min, lo que indicaba que se retiró el 99 % de los iones de itrio libres.

Ejemplo 6: Carga de itrio-89 de las nanoestructuras en presencia de cloruro de calcio y purificación mediante ultrafiltración.

Se disolvió el hexahidrato de cloruro de itrio (521,8 mg, 1,72 mmol) en 10 ml de agua MilliQ hasta una concentración de 172 mM. Se disolvió el cloruro de calcio (190,9 mg, 1,72 mmol) en 10 ml de agua MilliQ hasta una concentración de 172 mM. Se añadió una solución de 116  $\mu$ l (19,7  $\mu$ mol de Ca) de cloruro de calcio 172 mM a una solución de 10 ml de nanoestructuras ultrafiltradas de acuerdo con el Ejemplo 4 y la mezcla se agitó y se calentó a 56 °C. Se añadió una solución de 175  $\mu$ l (30,1  $\mu$ mol) de hexahidrato de cloruro de itrio 172 mM en agitación. La solución se dejó mezclar a 56 °C durante 1 h. Después de que se dejara enfriar la solución transparente a temperatura ambiente, esta se transfirió a filtros de espín de 300 kDa (Vivaspin@20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm a 25 °C durante 30 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 100 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min para retirar cualquier ion de itrio libre. Se añadió agua MilliQ y la filtración del retenido recogido se llevó a cabo a 3.500 rpm y 25 °C durante 5 min. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 5 ml.

Rendimiento (en comparación con los materiales de partida añadidos) después de la ultrafiltración (de ICP): P: 5,8 %. Si: 6,2 %. Y: 23,9 %.

Picos de GPC después de la adición de Y. Tiempo de retención de GPC: 11,00 min (producto), 18,68 min (sales)

Picos de GPC después de la ultrafiltración. Tiempo de retención de GPC: 10,98 min (producto), 18,57 min (sales). Se redujo la altura de pico en 18,57 min, lo que indicaba que se retiró el 96 % de los iones de itrio libres.

Ejemplo 7: Carga de otros iones de metal en la nanoestructura X.

Ejemplo 7a: Carga de lutecio en la nanoestructura X.

Se diluyó una solución de nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo 2a (18 ml, 1,22 mmol de P) con 18 ml de agua MilliQ. Se disolvió el hexahidrato de cloruro de lutecio (669,8 mg, 1,72 mmol) en 10 ml de etilen glicol al 40 % acuoso hasta una concentración de 172 mM. Se añadió una solución de cloruro de lutecio (568  $\mu$ l, 97,7  $\mu$ mol) a las nanoestructuras Xb y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. pH=1,93. Se ajustó el pH a 7,31 con una base Tris 1 M. La solución transparente se transfirió a filtros de espín de 300 kDa (Vivaspin@20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm a 25 °C durante 30 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 100 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min para retirar cualquier ion de lutecio libre. Se llevó a cabo la adición repetida del agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después de cada adición fueron de 5 min, 5 min, 3 min, 3 min y 3 min, respectivamente. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 6 ml.

Composición (ICP, relación en moles): P/Lu=7,04, P/Si=1,53, Si/Lu=10,79. Rendimiento (%): P=17,1, Lu=29,6. Tiempo de retención de GPC: 11,42 min (producto), 18,69 min (sales).

Ejemplo 7b: Carga de uranio en la nanoestructura X.

Se diluyó una solución de nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo 2b (72 ml, 5,53 mmol de P) con 72 ml de agua MilliQ (pH= 2,32). Se agitaron 6 ml de esta solución con el 2 % en peso de acetato de uranilo (21,8  $\mu$ mol) a temperatura ambiente durante 18 h. La solución se diluyó con 6 ml de agua MilliQ. La solución transparente se transfirió a filtros de espín de 300 kDa (Vivaspin@20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm a 25 °C durante 30 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 50 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min para retirar cualquier ion de uranio libre. Se llevó a cabo la adición repetida del agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después de cada adición fueron de 15 min, 10 min, 5 min, 5 min y 5 min, respectivamente. El volumen final del retenido recogido fue de 7 ml. Tiempo de retención de GPC: 13,11 min (producto)

Ejemplo 7c: Carga de bario en la nanoestructura X.

Se ajustó el pH de una solución de nanoestructuras Xa de acuerdo con el Ejemplo 2a (20 ml, 2 mmol de P) a 5,15 con una base Tris 1 M. La solución se colocó en un matraz de reacción y se desgasificó mediante la aplicación de vacío al matraz de reacción y, posteriormente, la carga con gas nitrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces. Se disolvió el nitrato de bario (38,4 mg, 146,9  $\mu$ mol) en 0,847 ml de etilen glicol al 40 % acuoso hasta una concentración de 173 mM. Se añadió el nitrato de bario (847  $\mu$ l, 146,9  $\mu$ mol) a las nanoestructuras Xa y se agitó durante 112 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se calentó a 100 °C y se inyectó una solución del reticulador de tetraetilortosilicato (669  $\mu$ l, 3,0 mmol) en 1.831  $\mu$ l de una mezcla de etilen glicol:etanol al 99,5 % (4 mol:5 mol) con una bomba de jeringa. Se conectó un temporizador a la bomba, de tal manera que solo inyectara la solución 15 min por 2 horas. Los ajustes de la inyección de bomba fueron 150  $\mu$ l/min, un tamaño de jeringa seleccionado de 100 y la jeringa de inyección usada fue de 2 ml. La mezcla de reacción se agitó y se calentó durante 48 h a 100 °C, seguido de 24 h a 114 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la solución transparente se diluyó con 25 ml de agua MilliQ. pH=3,44. El pH se ajustó a 7,06 con una base Tris 1 M. La solución se transfirió a

5 filtros de espín de 100 kDa (Millipore) y se centrifugó a 3.500 rpm a 25 °C durante 60 min. Los permeados recogidos se transfirieron a filtros de espín de 10 kDa (Millipore) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min para retirar cualquier ion de bario libre. Se llevó a cabo la adición repetida del agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después de cada adición fueron de 30 min, 30 min, 15 min, 15 min y 15 min, respectivamente. El volumen final del retenido recogido fue de 17 ml.

Composición (ICP, relación en moles): Si/P= 1,42, P/Ba=10,67, Si/Ba=15,12.

Tiempo de retención de GPC: 14,26 min (producto)

10 Ejemplo 7d: Carga de galio en la parte central Xc.

15 Se diluyó una solución de nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo 1c (5 ml, 0,324 mmol de P) con agua MilliQ hasta P 64,74 mM. El patrón de galio (1.000 mg/l, Fluka) se disolvió en agua MilliQ hasta una concentración de 3,2 mM. Se añadió una solución de galio (920 µl, 13,2 µmol) a las partes centrales Xc y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 7,4 con una base Tris 1 M. La solución transparente se transfirió a filtros de espín de 10 kDa (Vivaspin®20, Sartorius) y se centrifugó a 3.500 rpm y 25 °C durante 15 min. Se añadió agua MilliQ al retenido y se llevó a cabo la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después fue de 15 min. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 3 ml.

Composición (ICP, relación en moles): P/Ga=27,47, P/Si=0,926, Si/Ga=29,67. Rendimiento (%): P=100 %, Ga=80 %.

20 Tiempo de retención de GPC: 10,23 min (producto), 19,17 min (sales).

Ejemplo 8a: Medición de estabilidad en las nanoestructuras que contienen itrio-89

25 Se diluyeron las nanoestructuras que contenían itrio con agua MilliQ hasta una concentración de itrio 1 mM. Se mezclaron 150 µl de solución de nanoestructura con 150 µl de EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 h. Se retiraron 100 µl de la mezcla y se marcaron con XXX-pre. Los 200 µl de solución restantes se colocaron en un filtro de espín de 10 kDa Amicon de 0,5 ml y se centrifugaron durante 10 min a 13,4 krpm. Se retiraron 100 µl del permeado y se marcaron con XXX-pos. Las concentraciones de itrio en las muestras xxx-pre y xxx-pos se determinaron mediante AES de ICP. La estabilidad del itrio se calculó usando la ecuación siguiente, en la que la estabilidad calculada se refiere al % de itrio restante en las nanoestructuras después del tratamiento con EDTA.

$$Estabilidad\ de\ itrio\ (\%) = 100 - \left( \frac{[Y]_{xxx-pos}}{[Y]_{xxx-pre}} \times 100 \right)$$

35 Nanoestructuras de acuerdo con Xb-2a. Estabilidad de itrio del 94,6 %.

Nanoestructuras de acuerdo con Xc. Estabilidad de itrio del 98,85±0,75 %.

Ejemplo 8b: Medición de estabilidad en las nanoestructuras que contienen galio

40 El procedimiento para la medición de la estabilidad fue el mismo que en el Ejemplo 8a. Nanoestructuras de acuerdo con Xc. Estabilidad de galio del 91,9±2,8 %.

Ejemplo 9: Caracterización de las nanoestructuras de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 4, 5, 7.

45 Tabla 2.

ID de nanoestructura	Parte central (P mM)	Parte periférica (mol de PEG/mol de Comp. 1·100 %)	Ion quelado	pH	Osmolalidad (mOs/kg)	Diámetro hidrodinámico (nm)
Xb-2a-1	10,8	92	Y 2 mM	7,7	315	14
Xb-2a-2	18,6	90	Y 2 mM	7,37	328	14
Xb-2a-3	14	106	Lu 2 mM	7,3	449	9
Xb-2b-1	16,6	116	Y 2 mM	7,6	341	20
Xb-2b-2	17,4	52	Y 2 mM	7,37	321	17
Xb-2b-3	10,6	90	Y 2 mM	7,44	346	21
Xb-2b-4	10	130	ninguno	7,3	477	8
Xb-1	18,2	0	Y 2 mM	7,5	445	22
Xb-2e-1	22,4	100	Y 4 mM	7,36	320	22
Xc	55,4	0	Y 2,4 mM	7,29	NA	12,0
Xc	118,3	0	Ga 4,3 mM	7,43	NA	12,8

Comentarios

- la solución de 0,5 mg/ml de albúmina (de clara de huevo de pollo) dio como resultado un tamaño: DLS= 7,0 nm (albúmina en NaCl 150 mM, diámetro hidrodinámico obtenido a partir del psd en volumen) y un tiempo de retención

ID de nanoestructura	Parte central (P mM)	Parte periférica (mol de PEG/mol de Comp. 1·100 %)	Ion quelado	pH	Osmolalidad (mOs/kg)	Diámetro hidrodinámico (nm)
de pico de GPC = 12,52 min. El diámetro hidrodinámico de las nanoestructuras se obtuvo a partir de los tiempos de retención de GPC calibrados de acuerdo con los patrones de proteína. • el % en moles de PEG se tomó a partir de la relación de Si/P de ICP (% en moles de PEG = (Si/P relación-1) 2·100 %)						

Ejemplo 10: Viscosidad

5 Una solución de nanoestructuras Xb con una parte periférica de acuerdo con el Ejemplo 2b se cargaron con itrio 5,9 mM, con una carga de 10 de P/Y. La viscosidad se midió en un viscosímetro capilar. La viscosidad medida de las nanoestructuras cargadas con itrio fue de 1,603±0,070 mPa.s.

Ejemplo 11: Prueba de la reticulación del Comp. 1 para formar nanoestructuras puras y de la modificación química de la parte periférica de PEG-silano tras el calentamiento.

10

Ejemplo 11a: La FTIR indica la modificación química del Comp. 1 tras el calentamiento

15

El Comp. 1 en etilen glicol acuoso al 80 % se calentó a 114 °C durante 20 h, tal como en el Ejemplo 1a, y se analizó en varios momentos puntuales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. Los picos de FTIR se normalizaron para proporcionar una altura de pico igual a la del pico en 898 cm<sup>-1</sup> (vibraciones esqueléticas de hidrocarburos C-C). Los números de onda de pico relevantes para los grupos siloxano fueron 1.101 cm<sup>-1</sup> (Si-OEt), 1.070 cm<sup>-1</sup> (Si-OEt), 954 cm<sup>-1</sup> (Si-OEt) y 835 cm<sup>-1</sup> (Si-OH). Se observó una disminución en la intensidad de pico de todos estos picos con el paso del tiempo, lo que indicaba que el número de grupos etoxisilano y el número de grupos hidroxilsilano disminuía, que era consistente con la reticulación del Comp. 1 para formar una red polimérica reticulada. Tras completar la reticulación, permaneció el 25-35 % de los grupos etoxisilano sin reaccionar, así como una pequeña fracción de hidroxisilanos, que correspondía a un grado de reticulación del 390-450 %. Para ello, véase la Fig. 9.

20

25

Los números de onda de pico relevantes para los grupos fosfonato fueron 1.246 cm<sup>-1</sup> (R-P=O(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> P-O en vibración), 1.023 cm<sup>-1</sup> (P-OMe), 1.013 cm<sup>-1</sup> (P-OH), 791 cm<sup>-1</sup> (P-OMe) y 757 cm<sup>-1</sup> (P-OMe). Se observó una disminución en la intensidad de pico de todos estos picos con el paso del tiempo, lo que indicaba que disminuía el número de grupos metoxifosfonato. El pico en 1.013 cm<sup>-1</sup> se superpuso con los picos de silano y, por tanto, indicó la presencia de grupos hidroxifosfonato, pero no fue posible cuantificar estos. Tras completar la reticulación, permaneció el 10-50 % de los grupos metoxifosfonato sin reaccionar. Para ello, véase la Fig. 10.

30

Ejemplo 11b: La FTIR indica la modificación química del monómero de PEG-silano tras el calentamiento.

35

Los espectros de FTIR de los monómeros de PEG-silano 2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano; 6-9 unidades de EG al 90 % (PEG6-9), y metoxi(polietileno)propiltrimetoxisilano; 9-12 unidades de EG al 90 % (PEG9-12), se compararon con los espectros de FTIR de los monómeros de PEG-silano en etilen glicol al 80 % acuoso calentados a 114 °C durante 7 h. Los espectros de FTIR mostraron que, químicamente, las sustancias diferían en picos en los números de onda 1.093 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si), 1.083 cm<sup>-1</sup> (Si-O-CH<sub>3</sub>), 1.040 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si) y 848 cm<sup>-1</sup> (Si-OH). Cuando se calentaron los monómeros de PEG-silano, los picos aparecieron en 1.093 cm<sup>-1</sup> y 1.040 cm<sup>-1</sup>, lo que indicaba la presencia de grupos siloxano Si-O-Si de cadena abierta. La aparición del pico en 848 cm<sup>-1</sup> en los monómeros de PEG-silano calentados indicaba la presencia de grupos Si-OH, mientras que la desaparición del pico en 1.083 cm<sup>-1</sup>, después del calentamiento, indicaba la pérdida de grupos Si-OCH<sub>3</sub> metoxisilano en el monómero de PEG-silano. Esta desaparición de los grupos Si-OCH<sub>3</sub> metoxisilano y la aparición de los grupos Si-O-Si es lo que se esperaba a partir de un PEG-silano que forma un enlace covalente a la parte central. Para ello, véanse las Fig. 11 y Fig. 12

40

45

Ejemplo 12: Diagnóstico por imagen de TEM de las nanoestructuras X cargadas con uranio

50

Las nanoestructuras se diluyeron 30 veces con agua MilliQ y se aplicaron 3 µl de muestra en una rejilla de cobre de malla de carbono 400 que se ha sometido a descarga luminiscente. Las muestras se tiñeron negativamente con UAR-EMS. Posteriormente, las rejillas se lavaron con agua ultrapura y se sometieron a diagnóstico por imagen usando un microscopio electrónico FEI Tecnai 10 ejecutado a un voltaje de aceleración de 100 keV. Se adquirieron imágenes usando una cámara 2kx2k Veleta CCD (Olympus Soft Imaging System). Se observaron varias nanoestructuras globulares con un diámetro mayor de 8 nm. Las nanoestructuras contenían una parte central (núcleo de color oscuro) y una parte periférica (anillo de color blanco). Para ello, véase la Fig. 13.

55

Ejemplo 13: *In vivo*: Estudio farmacocinético en un modelo de ratón.

Las soluciones de nanoestructura X se administraron por vía intravenosa\* a 20 µmol de Y/kg o 20 µmol de Lu/kg y 10 ml/kg durante 5 s a ratones (N=2/objeto de ensayo). Después de la administración, los animales se sometieron a extracción de muestras de sangre. Tras la terminación del experimento, se recogieron los riñones y los hígados. Las

soluciones de nanoestructura inyectadas, las muestras de plasma y las muestras de tejidos digeridos se analizaron mediante AES de ICP para determinar el contenido de itrio o lutecio y silicio.

Tabla 3.

ID de sustancia	Parte periférica (mol de PEG/mol de Comp. 1·100 %)	Ion quelado	Tiempo después de la inyección (h)	% de dosis de iones inyectada en plasma	% de dosis de Si inyectada en plasma	% de dosis de iones inyectada en hígado	% de dosis de Si inyectada en hígado
Xb-2a-1	92	Y	1	44,2±11,2	61,4±16,0		
			6	7,5±1,4	11,9±2,3	45,3±10,0	30,9±8,5
Xb-2a-2	90	Y	1	46,1±2,3	83,9±7,4		
			6	20,4±3,0	31,3±4,8	28,0±2,0	21,9±2,5
Xb-2a-3	106	Lu	1	170,2±1,6	110,2±15,5		
			6	60,3±8,4	39,8±4,8	23,3±1,2	14,0±2,7
Xb-2b-1	116	Y	1	43,6±4,9	69,2±7,0		
			6	23,4±0,6	33,0±0,5	15,7±0,9	9,2±1,2
Xb-2b-2	52	Y	1	55,4±3,7	94,9±7,8		
			6	22,9±0,0	35,6±0,6	36,6±6,2	30,2±5,5
Xb-2b-3	90	Y	1	110,7±18,5	75,3±12,0		
			6	53,1±6,7	36,5±3,7	20,2±3,6	6,6±1,6
Xb-2b-4	130	ninguno	1		58,0±0,0		
			6		25,1±1,0		2,5±0,1
Xb-1	0	Y	1	8,9±0,6	4,7±1,0		
			6	1,5±0,1	1,4±2,0	88,2±12,1	77,1±6,0

\*Las soluciones se formularon para que fueran neutras (pH 7,4), equilibradas con electrolitos (1,4 eq. de CaCl<sub>2</sub> añadidos/eq. de Y) e isoosmóticas (manitol añadido) con la sangre.  
\*\*el % de dosis inyectada excedió el 100 % debido a la inseguridad experimental

5 El ejemplo de control negativo, que contenía las nanoestructuras que carecen de una parte periférica, mostró la importancia de la parte periférica para la obtención de un tiempo de circulación largo en la sangre.

Tabla 4.

ID de sustancia	Parte periférica (mol de PEG/mol de Comp. 1·100 %)	Ion quelado	Tiempo después de la inyección (h)	% de dosis de iones inyectada en riñones	% de dosis de Si inyectada en riñones
Xb-2a-3	106	Lu	6	1,6±0,2	0,4±0,5
Xb-2b-3	90	Y	6	1,6±0,1	0,7±0,3
Xb-2b-1	116	Y	6	1,7±0,1	2,0±1,9
Xb-2b-4	130	ninguno	6		0,0±0,0

\*Las soluciones se formularon para que fueran neutras (pH 7,4), equilibradas con electrolitos (1,4 eq. de CaCl<sub>2</sub> añadidos/eq. de Y) e isoosmóticas (manitol añadido) con la sangre.

10 Únicamente una pequeña fracción de las nanoestructuras X se distribuyó a los riñones.

Ejemplo 14: Estudio de excreción en un modelo de rata

15 Se investigó el patrón de excreción de las soluciones de nanoestructura X después de la inyección intravenosa en ratas. La solución de nanoestructura se administró por vía intravenosa a 10 µmol de Y/kg y 3,3 ml/kg durante 20 s. A continuación, se pusieron las ratas en cajas metabólicas separadas durante 24 h (N=3) o 72 h (N=3). Se usaron dos animales como animales de control y no se administraron. Se recogieron la orina y las heces cada 24 h a lo largo del estudio. Después de terminar la extracción de muestras de orina y heces, se recogieron la orina restante en la vejiga  
20 y las heces restantes en el colon y el intestino. La solución de nanoestructura inyectada se analizó mediante AES de ICP para determinar el contenido de itrio, silicio y fósforo. Las muestras de orina y de heces se analizaron mediante AES de ICP para determinar el contenido de itrio y silicio.

Tabla 5.

ID de sustancia	Parte periférica (mol de PEG/mol de Comp. 1·100 %)	Ion quelado	Tiempo después de la inyección (h)	% de dosis de Y inyectada en heces	% de dosis de Y inyectada en orina
Xb-2b-3	86	Y	24	3,3±2,0	1,3±0,6
			72	12,9±3,7	2,2±1,0

Las nanoestructuras X se excretaron principalmente a través de las heces, con una excreción mínima a través de la orina.

5 15. Ejemplo profético. Carga radiactiva de nanoestructuras con actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) o zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ).

10 Se prepararon 20 ml de nanoestructuras Xb vacías (material de partida 2 mmol de P) con parte periférica de acuerdo con el Ejemplo 2b, se ultrafiltraron de acuerdo con el Ejemplo 5 entre 300 kDa y 50 kDa y se ajustó su pH a 7,0-7,5 con una base Tris 1 M. Se diluyeron las soluciones de nanoestructura hasta P 20 mM. Se preparó una solución de itrio-90 catiónico 0,4  $\mu\text{M}$  en agua mediante la disolución de 143,8 ng de itrio-90 en 4 ml de agua MilliQ. Se preparó una solución de lutecio-177 catiónico 0,4  $\mu\text{M}$  en agua mediante la disolución de 283,2 ng de lutecio-177 en 4 ml de agua MilliQ (o actinio-225 catiónico 0,4  $\mu\text{M}$  ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ) o zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ )).

15 Se prepararon las Soluciones 1 y 2 mixtas de nanoestructura + radionúclido mediante el mezclado de 4 ml de nanoestructuras vacías (P 20 mM) con 4 ml de solución de radionúclido (0,4  $\mu\text{M}$ ) a temperatura ambiente o a 50 °C, respectivamente, durante 1 h usando una barra de agitación magnética. Por tanto, las soluciones mixtas contendrán P 10 mM y radionúclido 0,2  $\mu\text{M}$  (50.000 de P/radionúclido).

20 Se filtró cada solución de la siguiente manera: después de 1 h, se filtraron las nanoestructuras con un filtro de espín de 300 kDa (Vivaspin®20, Sartorius) y se centrifugaron a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min. Se transfirió el permeado a un filtro de espín de 10 kDa (Millipore) y se centrifugó a 3.500 rpm y 25 °C durante 30 min. Se llevó a cabo la adición repetida de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. Los tiempos de centrifugación después de cada adición fueron de 10 min, 10 min y 10 min, respectivamente. Se diluyó el retenido restante con agua MilliQ hasta 4 ml.

25 16. Ejemplo profético. Medición de la estabilidad en las nanoestructuras que contienen actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) o zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ).

30 En cada solución de nanoestructura X/radionúclido de acuerdo con el Ejemplo 15, se mezclaron 250  $\mu\text{l}$  de solución con 250  $\mu\text{l}$  de agua MilliQ o plasma de sangre de rata y se incubaron durante 6 h o 24 h a temperatura ambiente (4 muestras por solución del Ejemplo 15). Después de la incubación, se retiraron 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla para cada muestra y se marcaron con xxx-pre. Se colocaron 200  $\mu\text{l}$  de solución en un filtro de espín de 10 kDa Amicon de 0,5 ml y se centrifugaron durante 10 min a 13,4 krpm. Se retiraron 100  $\mu\text{l}$  del permeado y se marcaron con xxx-pos. Se midieron la radiación  $\alpha$ , la radiación  $\beta$  o la radiación  $\gamma$  en xxx-pre y xxx-pos. Se calculó la estabilidad de radionúclido (% del radionúclido que quedaba en las nanoestructuras después de la filtración) usando la ecuación siguiente.

$$\text{Estabilidad de radionúclido (\%)} = 100 - \left( \frac{[\text{Radionúclido}]_{\text{xxx-pos}}}{[\text{Radionúclido}]_{\text{xxx-pre}}} \times 100 \right)$$

35 17. Ejemplo profético. Tratamiento de tumores sólidos usando nanoestructuras cargadas con  $^{90}\text{Y}$

40 La terapia con radionúclidos se realiza en instalaciones capaces de cumplir con las normas para el tratamiento con fuentes radiactivas no selladas y con licencia de acuerdo con las regulaciones nacionales. El personal implicado en los procedimientos de preparación y administración debe tener la cualificación requerida y la autorización adecuada para el uso de radionúclidos. Todo el equipo desechable usado para la preparación y administración de radionúclidos debe eliminarse como desecho radiactivo y el radionúclido restante se devuelve a un receptor autorizado de desintegración radiactiva.

Preparación de nanoestructuras radiocargadas: el personal que prepara las nanoestructuras debe llevar guantes de plástico, batas impermeables desechables y protección para los ojos. Los procedimientos preparatorios se realizan usando plexiglás de al menos 1 cm de espesor o los protectores de plexiglás cargados con plomo que usan fórceps y pinzas como herramientas de agarre. Las nanoestructuras se suministran en forma de kit que contiene los componentes no radiactivos requeridos para la generación de una dosis individual de nanoestructuras cargadas con  $^{90}\text{Y}$ , así como en forma de solución de tampón formulada en una botella y un recipiente de reacción vacío. El componente radiactivo, de calidad farmacéutica libre de vehículo  $^{90}\text{Y}$ , se obtiene por separado tras el pedido del fabricante. El  $^{90}\text{Y}$  libre de vehículo se añade a las nanoestructuras y el tampón en el recipiente de reacción vacío proporcionado de acuerdo con las instrucciones detalladas proporcionadas con el kit. Las técnicas asépticas se usan en todas las fases de preparación. Tras la carga, las nanoestructuras se almacenan a 2-8 °C y se administran en 8 horas.

Administración: antes de la administración de las nanoestructuras radiocargadas, se mide la actividad de la solución para administración. Las nanoestructuras cargadas con  $^{90}\text{Y}$  se administran en forma de infusión intravenosa ya sea directamente a través de una línea de válvula de tres vías o usando un sistema de infusión remoto con protección. Se usa un filtro de línea. Después de la infusión, la línea lava con al menos 10 ml de solución de cloruro de sodio (0,9 %), a fin de garantizar la administración de la dosis completa del agente radiofarmacéutico. Se da de alta al paciente después de completar la infusión y un período adecuado de observación de los efectos secundarios (20-30 minutos). Debido a la semivida corta del radionúclido inyectado, se puede dar el alta al paciente poco después de la administración sin que represente un riesgo significativo para aquellos que lo rodean.

18. Ejemplo profético. Diagnóstico por imagen de tumores sólidos usando nanoestructuras cargadas con  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$

La preparación y la administración de nanoestructuras cargadas con  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$  suministradas en forma de kit para el diagnóstico por imagen de rayos gamma se realiza de una manera aséptica similar a la preparación y la administración de nanoestructuras cargadas con  $^{90}\text{Y}$  para la radioterapia. Sin embargo, determinadas precauciones y regulaciones se adaptan a las guías de seguridad del paciente y del personal cuando se manipulan radionúclidos de emisión de rayos gamma. Las nanoestructuras cargadas con  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$  se inyectan en forma de infusión de catéter venoso, seguida de un lavado con solución salina normal. El diagnóstico por imagen se realiza después de 1-12 horas tras la inyección.

Ejemplo 19: Experimento *in vivo*, localización de Y en tumor.

Las nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo Xb-2b se administraron por vía intravenosa a 10  $\mu\text{mol}$  de Y/kg\* y 2,5 ml/kg a ratones (N=3) que se habían inoculado previamente con la línea celular tumoral inmortalizada PC-3. Los tumores fueron de aproximadamente 7 mm de diámetro. Después de 24 h, se sacrificaron los animales y se recogieron los tumores. Los objetos de ensayo de inyección se analizaron mediante AES de ICP para determinar el contenido de itrio, silicio y fósforo. Las muestras de tumores digeridos se analizaron mediante AES de ICP para determinar el contenido de itrio y silicio. Se halló una fracción del 0,8 % de la dosis inyectada de Y en el tumor después de 24 h.

\*Las soluciones se formularon para que fueran neutras (pH 7,4), equilibradas con electrolitos (1,4 eq. de  $\text{CaCl}_2$  añadidos/eq. de Y) e isoosmóticas (manitol añadido) con la sangre.

20. Ejemplo profético. Preparación de una nanoestructura con una parte central ramificada basada en polietiliminina, con DOTA como grupo quelante y poli(etilen glicol) como parte periférica.

El m-PEG-COOH (Pm en promedio de 5.000 g/mol, aproximadamente 100 unidades monoméricas, 100 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) se disuelve en agua (2 ml), tras lo que se añaden sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida (Pm de 217 g/mol, 10 mg, 46  $\mu\text{mol}$ ) y clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Pm de 192 g/mol, 10 mg, 52  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla de reacción se deja agitar durante 2 días. A continuación, se añade polietiliminina a esta solución (50 % en peso en agua, con un Pm de 300.000, un diámetro hidrodinámico medido en 34 nm a pH 7, que corresponde a un "área superficial" de 3.631  $\text{nm}^2$  en una nanoestructura, por lo que se requiere para una cobertura de 1 PEG/ $\text{nm}^2$ , 5 nmol (=1,5 mg) de PEI). La mezcla de reacción se deja agitar durante 2 días. Se añade sal de DOTA-mono-NHS-tris(t-Bu éster)HPF<sub>6</sub> (Macrocyclics, EE.UU., con un Pm de 815, 0,8 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se agita durante otros 2 días. Se mide el potencial zeta del material y, si se desea, se añaden pequeñas cantidades de anhídrido succínico hasta que el potencial zeta sea cercano a cero.

Ejemplo 21: Enlazado de  $^{90}\text{Y}$  radiactivo a las nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo 2a.

El itrio-90 se suministró como 150  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa y, a fin de alcanzar niveles aceptables de radiactividad, esta solución se diluyó con 400 ml de itrio-89 0,4  $\mu\text{M}$  en agua. Se creyó que esta solución no interfería con el resultado experimental. De esta solución, se mezclaron 4 ml de solución con 4 ml de una solución de nanoestructuras de acuerdo con el Ejemplo 2b, en una concentración de fósforo 20 mM. Esto se realizó dos veces, una mezcla se agitó, como consecuencia, a temperatura ambiente (t.a.) durante 1 hora (Solución 1) y la otra a 50 °C durante 1 hora (Solución 2). En ambas soluciones, se midió la radiación beta. Para ello, se tomó una alícuota de

100 µl y se diluyó a 20 ml para conseguir niveles adecuados de radiación para mediciones fiables. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. La radiación beta de las soluciones mixtas

Solución	Actividad
Solución 1	3,19 x 10 <sup>5</sup> cpm
Solución 2	3,32 x 10 <sup>5</sup> cpm

Ambas soluciones se filtraron usando filtros de espín de 10 kDa de 15 ml. Debido a las limitaciones prácticas, las soluciones se filtraron a 1.000 g durante 1 hora, el permeado se retiró y el retenido se diluyó a 15 ml y se realizó otra filtración. La filtración también se llevó a cabo a 1.000 g y se consideró que estaba completa después de 20 minutos. Esta última etapa de lavado y filtración se repitió tres veces. Después de la filtración, la solución restante se diluyó a 4 ml y se tomó de nuevo una alícuota de 100 µl, se diluyó a 20 ml y se midió la radiación beta. Las actividades medidas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. La radiación beta después de la filtración

Solución	Actividad	Actividad corregida
Solución 1	5,05 x 10 <sup>5</sup> cpm	2,59 x 10 <sup>5</sup> cpm
Solución 2	5,99 x 10 <sup>5</sup> cpm	3,04 x 10 <sup>5</sup> cpm

Las soluciones estaban dos veces más concentradas que las de la Tabla 6, por lo que, para comparar, la actividad se dividió en dos. La medición de la Solución 1 se realizó 128 minutos más tarde que la de la Tabla 6, por lo que, con la rápida desintegración del itrio-90, el número debe corregirse a 2,59 x 10<sup>5</sup> cpm. Esto es el 81,2 % de la solución original. La medición de la Solución 2 se realizó 88 minutos más tarde que la de la original de la Tabla 1 y la actividad corregida, en este caso, es de 3,04 x 10<sup>5</sup> cpm. Esto es el 91,3 % de la solución original. También se midió una muestra para ensayo en blanco, que era de 55,1 cpm y, por lo tanto, se consideró insignificante.

Al día siguiente, se prepararon 8 mezclas mediante la adición de 250 µl de Solución 1 o 2 a 250 µl de agua o plasma humano. A continuación, se incubaron estas mezclas durante 6 h o 24 h y se marcaron tal como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Diferentes soluciones preparadas de itrio-90 y nanopartículas

N.º de solución	Temp. de mezclado	Disolvente	Incubación (h)
1a	t.a.	agua	6
1b	t.a.	agua	24
1c	t.a.	plasma humano	6
1d	t.a.	plasma humano	24
2a	50 °C	agua	6
2b	50 °C	agua	24
2c	50 °C	plasma humano	6
2d	50 °C	plasma humano	24

Después de la incubación, se retiraron 100 µl y se diluyeron a 20 ml para conseguir una muestra para la medición de la filtración previa. Se filtraron 300 µl de la mezcla a través de un filtro de espín de 10 kDa Amicon de 0,5 ml. Se tomaron también 100 µl del filtrado y se diluyeron a 20 ml para conseguir una muestra de la filtración posterior. Se midieron todas las muestras y los resultados se muestran en la Tabla 9. La estabilidad de radioisótopo de cada solución se podría calcular después y también se proporciona.

Tabla 9. Mediciones de radiación antes y después de la filtración y posterior estabilidad

N.º de solución	Actividad de filtración previa (cpm)	Actividad de filtración posterior (cpm)	Muestra para ensayo en blanco de filtración posterior (cpm)	Estabilidad de radioisótopo (%)
1a	1,06 x 10 <sup>5</sup>	87,3	22,2	>99,9
1b	1,47 x 10 <sup>5</sup>	97,4	42,3	>99,9
1c	1,42 x 10 <sup>5</sup>	60,7	5,6	>99,9
1d	1,38 x 10 <sup>5</sup>	63,3	8,2	>99,9
2a	1,72 x 10 <sup>5</sup>	804	749	99,6

N.º de solución	Actividad de filtración previa (cpm)	Actividad de filtración posterior (cpm)	Muestra para ensayo en blanco de filtración posterior (cpm)	Estabilidad de radioisótopo (%)
2b	1,69 x 10 <sup>5</sup>	90,3	35,2	>99,9
2c	1,57 x 10 <sup>5</sup>	57,1	2,0	>99,9
2d	1,55 x 10 <sup>5</sup>	60,0	4,9	>99,9

Tal como se muestra en la Tabla 9, la diferencia entre las muestras de la filtración posterior y previa es, de manera notable, grande. La estabilidad de radioisótopo calculada es cercana al 100 % en casi todos los casos. Las muestras de la filtración previa y posterior se midieron en una hora entre sí y no se ajustaron en cuanto a la desintegración. Únicamente para la Solución 2a, se midió alguna actividad significativa en la muestra de la filtración posterior; no hay explicación para esta anomalía y esto parece un error de medición. Sin embargo, incluso esta excepción proporciona una estabilidad de radioisótopo del 99,6 %.

El radioisótopo itrio-90 se obtuvo como cloruro de itrio (III) en HCl 0,05 M a través de Perkin Elmer. La actividad específica fue de 500 Ci/mg. El cloruro de itrio (III) en estado frío se adquirió a través de Sigma Aldrich. La radiación beta se cuantificó usando un contador de centelleo de líquidos Beckman LS 6500. Las muestras se sometieron a ciclos durante 20 minutos y se proporcionó un valor promedio de dos ciclos.

#### Realizaciones específicas

1. Una nanoestructura globular que tiene un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de 8-100 nm que comprende una parte central y una parte periférica y en la que dicha parte central tiene un diámetro calculado ( $D_c$ ) de 6-90 nm y dicha parte periférica tiene un espesor estimado ( $T_p$ ), de tal manera que  $D_h = D_c + 2T_p$  o  $T_p = (D_h - D_c)/2$ , en la que dicha parte central comprende:

(i) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que al menos el 30 % en número de los residuos monoméricos se han reticulado formando de este modo la estructura polimérica reticulada y/o

(ii) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que la cantidad de puntos de ramificación es al menos el 30 % de la cantidad de residuos monoméricos

en la que dicha parte central comprende grupos quelantes de los que al menos 4 permiten la quelación de al menos un catión con carga múltiple, en la que dichos grupos quelantes se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en  $-COOR^1$ ,

$-P=O(OR^1)(OR^2)$  y  $-S(=O)_2OR^1$ , en los que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo inferiores y arilo,

y en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético adherido de manera covalente a la parte central, en la que el material polimérico sintético es hidrófilo y bioinerte y eléctricamente neutro o zwitteriónico.

2. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 1, en la que

(i) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que al menos el 50 % en número de los residuos monoméricos se han reticulado formando de este modo la estructura polimérica reticulada y/o

(ii) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que la cantidad de puntos de ramificación es al menos el 50 % de la cantidad de residuos monoméricos.

3. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 1 o 2, en la que  $R^1$  y  $R^2$  son de manera independiente una carga negativa, H o metilo.

4. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-3, que tiene un diámetro hidrodinámico de 8-50  $\mu m$ .

5. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-4, que tiene un diámetro hidrodinámico de 8-20  $\mu m$ .

6. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-5, en la que el diámetro hidrodinámico,  $D_h$ , es de 8-20 nm, el diámetro estimado de la parte central,  $D_c$ , es de 6-15 nm y el espesor de la parte periférica es de 1-2,5 nm.

7. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-6, en la que dichos grupos quelantes comprenden grupos bisfosfonato geminal.

8. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en la que dichos grupos quelantes comprenden grupos bisfosfonato germinal que, de manera independiente entre sí, se incorporan como



en los que:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo y >C indica un átomo de carbono que se conecta a o forma parte de dicha estructura polimérica reticulada o ramificada.

9. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en la que dichos grupos quelantes comprenden una multitud de grupos fosfonato -P=O(OR<sup>1</sup>)(OR<sup>2</sup>) en los que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan de manera independiente de una carga negativa, H, alquilo o arilo, con la condición de que cuando al menos uno de R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> sea H, el ácido fosfónico resultante se ionice hasta un grado dependiente del pH.

10. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-9, que comprende fosfonatos, en la que los fosfonatos son una mezcla de fosfonatos libres y los ésteres de metilo de dicho fosfonato.

11. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-10, en la que la estructura polimérica reticulada se deriva de polietileno.

12. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-10, en la que la estructura polimérica reticulada se deriva de poliestireno.

13. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-10, en la que la estructura polimérica reticulada se deriva de ácido poliacrílico.

14. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-10, en la que la estructura polimérica reticulada se deriva de una red de hidrocarburos.

15. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 14, en la que la red de hidrocarburos comprende polietileno reticulado.

16. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 14, en la que la red de hidrocarburos comprende poliestireno reticulado.

17. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, en la que dicha parte central comprende un homopolímero en el que hay 6 grupos con potencial para la reticulación en el monómero que corresponde al 600 % del reticulador añadido y 2-5 de los mismos, en realidad, forman reticulaciones que corresponden al 200-500 % de la reticulación lograda.

18. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, en la que el porcentaje de reticulador añadido es del 30-100 %.

19. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16 o 17, en la que el grado de reticulación lograda es del 30-100 %.

20. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, en la que el grado de ramificación lograda es del 30-100 %.

21. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, en la que el grado de reticulación lograda es del 200-400 %.

22. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, en la que el % de reticulador añadido es del 500-600 %.

22. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-21, en la que la estructura polimérica se ha formado mediante la polimerización por condensación de trialcoxiorganosilanos R<sup>12</sup>-Si(OR<sup>13</sup>)<sub>3</sub>, en los que R<sup>12</sup> es H o un residuo orgánico y R<sup>13</sup> de manera independiente es un alquilo inferior o arilo.

23. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 22, en la que hay dos grupos alcóxisilano presentes en el monómero.

24. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 23, en la que dichos alcóxisilanos se separan en 1-10 átomos de carbono.

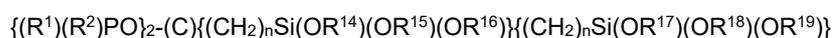
25. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 23 o 24, en la que dichos alcóxisilanos se separan en 3-9 átomos de carbono.

26. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 23-25, en la que dichos alcóxisilanos se separan en 7 átomos de carbono.

27. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 23-26, en la que los dos grupos fosfonato son parte del grupo R<sup>12</sup>.

28. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 23-27, en la que dichos dos alcóxisilanos se separan en 7 átomos de carbono y los dos grupos fosfonato son parte del grupo R<sup>12</sup>.

29. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 23-28, en la que los monómeros que forman la estructura polimérica tienen la estructura genérica:



en la que

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo y R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup> y R<sup>19</sup> se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en alquilos inferiores y arilo; y n = 1-5.

30. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-29, en la que dichos residuos monoméricos incluyen residuos monoméricos que tienen la estructura



en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilos inferiores y un enlace a la red polimérica y  $n=1-5$

de tal manera que la estructura polimérica se ha formado por medio de enlaces de -O-Si, en los que el átomo de silicio es un átomo de silicio en la estructura anterior.

31. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 30, en la que  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  son todos un grupo etilo.

32. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29-31, en la que  $n=3$ .

33. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-32, en la que los residuos monoméricos que forman la estructura polimérica ramificada se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en polietilenimina, polietilenimina modificada, poliol hiperramificado y triazina hiperramificada.

34. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 33, en la que los residuos monoméricos que forman la estructura polimérica ramificada son polietilenimina.

35. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 35, en la que la polietilenimina tiene un grado de ramificación del 40-60 %.

36. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 34 o 35, en la que la polietilenimina se compone de grupos quelantes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en  $-COOR^1$ ,  $-P=O(OR^1)(OR^2)$  y  $-S(=O)_2OR^1$ , en los que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo.

37. Una nanoestructura globular de acuerdo con las realizaciones 34-36, en la que una cantidad de grupos negativamente cargados, tales como carboxilatos, se puede introducir para hacer que la nanoestructura entera sea neutra a un pH fisiológico.

38. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-37, en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético eléctricamente neutro.

39. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-38, en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético seleccionado del grupo que consiste en  $A-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$ , en el que  $m=2-100$ ,  $R^9$  es un H o alquilos inferiores y A, m y  $R^9$  es un grupo que se une a dicha estructura polimérica, en el que A se selecciona del grupo que consiste en:

-OSiR<sup>10</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>- en el que R<sup>10</sup> se selecciona del grupo que consiste en H o hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y o=2-5; -OSi(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que R<sup>11</sup> se selecciona del grupo que consiste en un enlace covalente a la estructura polimérica, H e hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y o=2-5;

-NR<sup>10</sup>-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que R<sup>10</sup> es tal como anteriormente y n=1-5;

-O-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que n=2-5;

-NR<sup>10</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que R<sup>10</sup> es tal como anteriormente y o=2-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que o=2-5;

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que o=2-5; y

-SX<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que X es de manera independiente nada u O y n=1-5.

40. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 39, en la que hay 0,5-2 grupos A-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sup>9</sup> adheridos por nm<sup>2</sup> de la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

41. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 39 o 40, en la que hay 0,5-2 μmol de dichos grupos A-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sup>9</sup> adheridos por m<sup>2</sup> de la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

42. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 39-41, en la que A-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sup>9</sup> se une de manera covalente a la parte central.

43. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-37, en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético zwitteriónico.

45. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-43, en la que los grupos quelantes comprenden DOTA adherido a la estructura polimérica a través de un enlace de amida.

46. Una nanoestructura globular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-22 y 30, en la que dichos residuos monoméricos incluyen residuos monoméricos que tienen la estructura  $(R^{20})(R^{21})C(P=O(OR^1)(OR^2))_2$ , en la que:

$R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo;  $R^{20}$  es  $-(CH_2)_nCO-$  (con el grupo carbonilo que forma el enlace a la estructura polimérica);

$R^{21}$  es H u OH; y

$n=1-5$ .

47. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 46, en la que  $n=1$ .

48. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 46 o 47, en la que R<sup>20</sup> y R<sup>21</sup> son de manera independiente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SiO<sub>3</sub>, en la que n=1-5 y el silano es parte de dicha estructura polimérica mediante la formación de enlaces de Si-O-Si.

49. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 48, en la que R<sup>20</sup> y R<sup>21</sup> son de manera independiente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SiO<sub>3</sub>, en la que n=3.

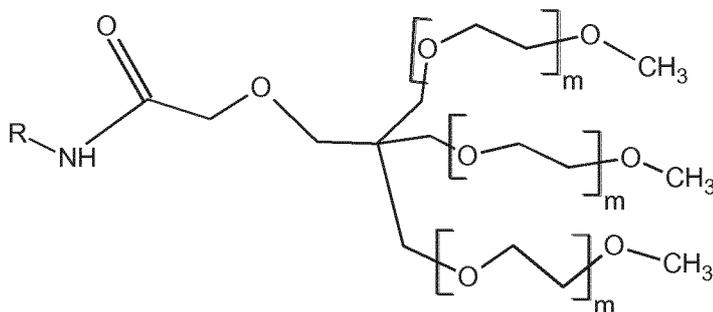
50. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-49, en la que dicha parte periférica comprende un polímero adherido de manera covalente lineal, neutro, sintético, bioinerte e hidrófilo.

51. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-50, en la que la parte periférica comprende un derivado adherido de manera covalente de polietilenglicol.

52. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 51, en la que la parte periférica comprende un derivado adherido de manera covalente de polietilenglicol terminado en metilo.

53. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 51 o 52, en la que la parte periférica comprende un derivado ramificado adherido de manera covalente de polietilenglicol.

54. Una nanoestructura globular de acuerdo con la realización 53, en la que el derivado ramificado adherido de manera covalente de polietilenglicol es:



en el que R es dicha parte central y m es de manera independiente 3-100.

55. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-49, en la que la parte periférica comprende poli(acrilamida) reticulada.

56. Una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-49, en la que la parte periférica comprende dextrano.

57. Una composición que comprende nanoestructuras globulares de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-56, en la que el peso molecular promedio en número es de 50.000-300.000.000 Da y el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras es de por encima de 8 nm.

58. Una composición de acuerdo con la realización 57, en la que el peso molecular promedio es de 50.000-50.000.000 Da.

59. Una composición de acuerdo con la realización 57 o 58, en la que el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras es de 8-100 nm.

60. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-59, en la que el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras es de 8-50 nm.

61. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-60, en la que el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras es de 8-20 nm.

62. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-61, en la que no más del 10 % en número de las nanoestructuras es menor de 8 nm.

63. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-62, en la que no más del 1 % en número de las nanoestructuras es menor de 8 nm.

64. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-63, en la que no más del 0,1 % en número de las nanoestructuras es menor de 8 nm.

65. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-64, en la que no más del 10 % en peso de las nanoestructuras se excreta en la orina de un mamífero en las 24 horas posteriores a la inyección intravenosa de dicho mamífero con dicha composición.

66. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-65, en la que no más del 1 % en peso de las nanoestructuras se excreta en la orina de un mamífero en las 24 horas posteriores a la inyección intravenosa de dicho mamífero con dicha composición.

67. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-66, en la que no más del 0,1 % en peso de las nanoestructuras se excreta en la orina de un mamífero en las 24 horas posteriores a la inyección intravenosa de dicho mamífero con dicha composición.

68. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-67, en la que dicho mamífero es un ratón, una rata o un ser humano.

69. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-68, en la que dicha composición es una composición farmacéutica que, además de las nanoestructuras, comprende un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

70. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-69, que comprende, adicionalmente, al menos un radionúclido quelado a dichas nanoestructuras.

71. Una composición de acuerdo con la realización 70, en la que la relación en número promedia (radionúclido enlazado):nanoestructura es de 0,1-20.000/nanoestructura, con la condición de que la parte central comprenda al menos 4 grupos quelantes disponibles para cada radionúclido.
- 5 72. Una composición de acuerdo con la realización 70 o 71, en la que dicho radionúclido comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
73. Una composición de acuerdo con la realización 72, en la que dicho radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia se selecciona del grupo que consiste actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ).
- 10 74. Una composición de acuerdo con la realización 72 o 73, en la que dicho radionúclido comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen.
75. Una composición de acuerdo con la realización 74, en la que dicho radionúclido comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET.
- 15 76. Una composición de acuerdo con la realización 75, en la que dicho radionúclido para el diagnóstico por imagen de PET es galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).
77. Una composición de acuerdo con la realización 74, en la que dicho radionúclido comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT.
- 20 78. Una composición de acuerdo con la realización 77, en la que dicho radionúclido para el diagnóstico por imagen de SPECT es tecnecio-99m en su forma tri-catiónica ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ).
79. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 72-78, en la que dicho radionúclido comprende un radionúclido para la radioterapia.
80. Una composición de acuerdo con la realización 79, en la que dicho radionúclido para la radioterapia es itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).
- 25 81. Una composición de acuerdo con la realización 72 o 73, en la que dicho radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia es lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).
82. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-81, cuando depende de la reivindicación 69, en la que la composición farmacéutica se formula para su inyección parenteral.
- 30 83. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-81, cuando depende de la reivindicación 69, en la que la composición farmacéutica se formula para su inyección intravenosa.
84. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-81, cuando depende de la reivindicación 69, en la que la composición farmacéutica se formula para su administración rectal.
- 35 85. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84 para su uso en un método para el diagnóstico y/o el tratamiento de un tumor de tejidos blandos.
86. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84 para su uso en un método para el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad metastásica.
87. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84 para la producción de una composición farmacéutica para el diagnóstico y/o el tratamiento de un tumor de tejidos blandos.
- 40 88. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84 para la producción de una composición farmacéutica para el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad metastásica.
89. Uso de una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-56 y un radionúclido para la producción de una composición farmacéutica para el diagnóstico y/o el tratamiento de un tumor de tejidos blandos.
- 45 90. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-56 y un radionúclido para la producción de una composición farmacéutica para el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad metastásica.
91. Uso de acuerdo con la realización 88 o 90, en el que dicho radionúclido comprende un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 50 92. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 89-91, en el que dicho radionúclido se selecciona del grupo que consiste actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ).
- 55 93. Un método para el tratamiento de un tumor y/o una enfermedad metastásica en un paciente que necesite tal tratamiento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-56 y un radionúclido al paciente.
94. El método de la realización 93, en el que dicho radionúclido es un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 60 95. El método de la realización 94, en el que dicho radionúclido se selecciona del grupo que consiste actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ), cobre-62 ( $^{62}\text{Cu}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}^{3+}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), torio-227 ( $^{227}\text{Th}$ ), itrio-86 ( $^{86}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) y zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ).

96. Un método para el tratamiento de un tumor en un paciente que necesite tal tratamiento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84.

97. El método de una cualquiera de las realizaciones 93-96, en el que dicho tumor es un tumor de tejidos blandos.

98. Un método para el diagnóstico de la presencia de un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad diagnósticamente eficaz de una nanoestructura globular de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-56 y un radionúclido al paciente.

990. El método de la realización 98, en el que dicho radionúclido es un radionúclido para el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.

100. El método de la realización 99, en el que dicho radionúclido se selecciona del grupo que consiste actinio-225 (<sup>225</sup>Ac), cobre-62 (<sup>62</sup>Cu), cobre-64 (<sup>64</sup>Cu), cobre-67 (<sup>67</sup>Cu), galio-67 (<sup>67</sup>Ga), galio-68 (<sup>68</sup>Ga), holmio-166 (<sup>166</sup>Ho), indio-111 (<sup>111</sup>In), plomo-212 (<sup>212</sup>Pb), lutecio-177 (<sup>177</sup>Lu), radio-223 (<sup>223</sup>Ra), renio-186 (<sup>186</sup>Re), renio-188 (<sup>188</sup>Re), rubidio-82 (<sup>82</sup>Rb), samario-153 (<sup>153</sup>Sm), estroncio-89 (<sup>89</sup>Sr), tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc<sup>3+</sup>), talio-201 (<sup>201</sup>Tl), torio-227 (<sup>227</sup>Th), itrio-86 (<sup>86</sup>Y), itrio-90 (<sup>90</sup>Y) y zirconio-89 (<sup>89</sup>Zr).

101. Un método para el diagnóstico de la presencia de un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad diagnósticamente eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-84.

102. El método de una cualquiera de las realizaciones 98-101, en el que dicho tumor es un tumor de tejidos blandos.

103. Una composición para la obtención de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-86, que comprende poner en contacto las nanoestructuras, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-56, con al menos un radionúclido.

104. Un kit para la preparación de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-69, que comprende una pluralidad de nanoestructuras de acuerdo con las reivindicaciones 1-56 disueltas en un tampón acuoso con un pH de 6-7,5 y una osmolalidad de 500-2.000 mOsm/kg.

105. Un kit para la preparación de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 70-86, que comprende una pluralidad de nanoestructuras de acuerdo con las reivindicaciones 1-56 disueltas en un tampón acuoso con un pH de 6-7,5 y una osmolalidad de 500-2.000 mOsm/kg y un radionúclido.

106. Un kit de acuerdo con la realización 105, en el que el radionúclido está presente en forma catiónica en una solución.

107. Un kit de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 104-106, en el que el tampón acuoso comprende un regulador del pH.

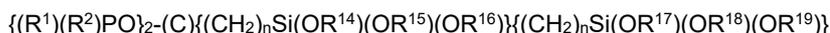
108. Un kit de acuerdo con la realización 107, en el que el regulador del pH se selecciona del grupo que consiste en acetato, bicarbonato, lactato, citrato, malato y propionato.

109. Un kit de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 104-108, que comprende, adicionalmente, un osmoregulador.

110. Un kit de acuerdo con la realización 109, en el que el osmoregulador se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, manitol, sorbitol, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y glicerol.

111. Una nanoestructura globular producida mediante un proceso que comprende las etapas de:

- 1) formar una parte central mediante una polimerización hidrolítica de un disilano de la estructura



en la que

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilo inferiores y arilo y

R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup> y R<sup>19</sup> se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en alquilo inferiores y arilo;

y

n=1-5; y

- 2) poner en contacto dicha parte central con un precursor de la parte periférica en condiciones favorables para que dicha parte se una de manera covalente a dicha parte central.

## REIVINDICACIONES

1. Una nanoestructura globular que tiene un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de 8-100 nm que comprende una parte central y una parte periférica, en la que dicha parte central tiene un diámetro calculado ( $D_c$ ) de 6-90 nm y dicha parte periférica tiene un espesor estimado ( $T_p$ ), de tal manera que  $D_h = D_c + 2T_p$ , en la que dicha parte central comprende:

(i) una estructura polimérica reticulada que comprende residuos monoméricos en los que al menos el 30 % en número de los residuos monoméricos se han reticulado formando de este modo la estructura polimérica reticulada; dichos residuos monoméricos incluyen residuos monoméricos que tienen la estructura



en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo; y en la que  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H y alquilos inferiores o un enlace a la estructura polimérica y  $n=1-5$ , de tal manera que la estructura polimérica se ha formado por medio de enlaces de -O-Si, en los que el átomo de silicio es un átomo de silicio en la estructura anterior y/o

(ii) una estructura polimérica ramificada que comprende residuos monoméricos

en la que la cantidad de puntos de ramificación es al menos el 30 % de la cantidad de residuos monoméricos, en la que la estructura polimérica ramificada se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en polietilenimina, polietilenimina modificada, poliol hiperramificado y triazina hiperramificada; y

en la que dicha parte central comprende grupos quelantes de los que al menos 4 permiten la quelación de al menos un catión con carga múltiple, en la que dichos grupos quelantes se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en  $-COOR^1$ ,  $-P=O(OR^1)(OR^2)$  y  $-S(=O)_2OR^1$ , en los que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo;

y en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético adherido de manera covalente a la parte central, en la que el material polimérico sintético es hidrófilo y bioinerte y eléctricamente neutro o zwitteriónico y en la que dicha parte periférica comprende un material polimérico sintético seleccionado del grupo que consiste en  $A-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$ , en el que  $m=2-100$ ,  $R^9$  es un H o alquilos inferiores y A es un grupo que se une a dicha estructura polimérica, en el que A se selecciona del grupo que consiste en:

-OSi( $R^{10}$ )<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que  $R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en H o hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y  $o=2-5$ ;

-OSi(OR<sup>11a</sup>)(OR<sup>11b</sup>)(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que  $R^{11a}$  y  $R^{11b}$  son iguales o diferentes y cada uno se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en un enlace covalente a la estructura polimérica, H e hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y  $o=2-5$ ;

-NR<sup>10</sup>-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que  $R^{10}$  es tal como anteriormente y  $n=1-5$ ;

-O-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que  $n=1-5$ ;

-NR<sup>10</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que  $R^{10}$  es tal como anteriormente y  $o=2-5$ ;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que  $o=2-5$ ;

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, en el que  $o=2-5$ ; y

-SX<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que X es de manera independiente nada u O

y  $n=1-5$ ; y que comprende, adicionalmente, un radionúclido quelado a dicha nanoestructura.

2. Una nanoestructura de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos grupos quelantes comprenden grupos bisfosfonato germinal que, de manera independiente entre sí, se incorporan como



en los que:

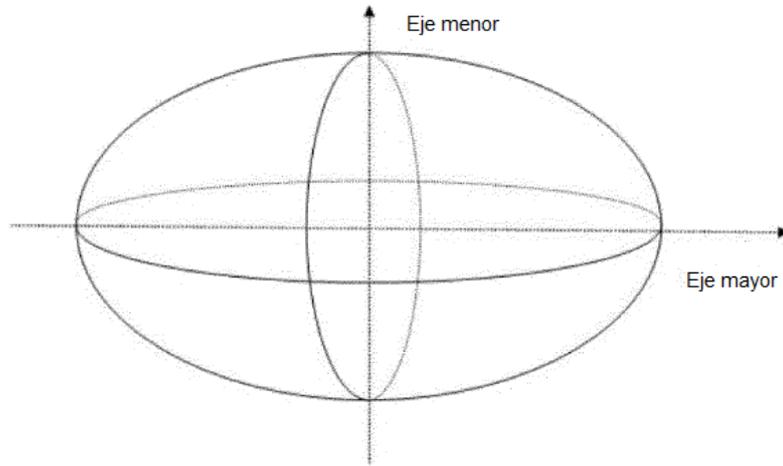
$R^1$  y  $R^2$  se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en carga negativa, H, alquilos inferiores y arilo y  $>C$  indica un átomo de carbono que se conecta a o forma parte de dicha estructura polimérica reticulada o ramificada.

3. Una nanoestructura de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-2, en la que la estructura polimérica ramificada de la parte central es polietilenimina y la parte periférica comprende  $-NH(C=O)(CH_2)_n-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$ , en la que  $n=1-5$ ,  $m=2-100$ ,  $R^9$  es un H o alquilos inferiores; y los grupos quelantes comprenden grupos DOTA.

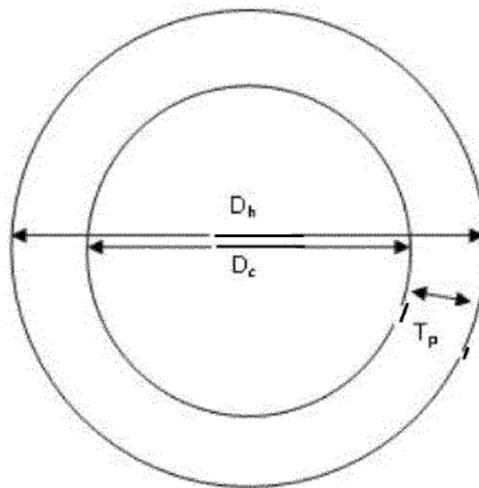
4. Una nanoestructura de acuerdo con la reivindicación 1, en la que hay 0,5-2 grupos  $A-(O-CH_2CH_2)_mOR^9$  adheridos por nm<sup>2</sup> de la interfaz entre dicha parte central y dicha parte periférica.

5. Una nanoestructura de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que el/los radionúclido/s quelado/s a las nanoestructuras comprende/n <sup>90</sup>Y.

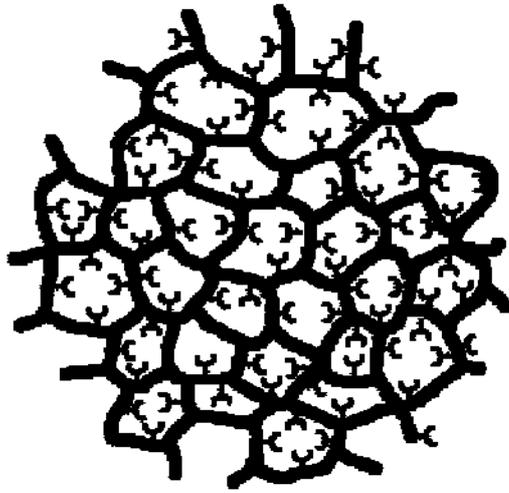
6. Una nanoestructura de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que el/los radionúclido/s quelado/s a las nanoestructuras comprende/n  $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ .
- 5 7. Una nanoestructura de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que el/los radionúclido/s quelado/s a las nanoestructuras comprende/n  $^{177}\text{Lu}$ .
8. Una composición que comprende nanoestructuras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el peso molecular promedio en número es de 50.000-300.000.000 Da y el diámetro hidrodinámico promedio de dichas nanoestructuras es de 8-100 nm.
- 10 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que no más del 10 % en número de las nanoestructuras es menor de 8 nm.
- 15 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que la relación en número promedia (radionúclido enlazado):nanoestructura es de 0,1-20.000, con la condición de que la parte central de la nanoestructura comprenda al menos 4 grupos quelantes disponibles para cada radionúclido.
- 20 11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para su uso en el diagnóstico por imagen y/o la radioterapia.
- 25 12. Un kit para la preparación de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende una multitud de nanoestructuras de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 disueltas en un tampón acuoso con un pH de 6-7,5 y una osmolalidad de 500-2.000 mOsm/kg.



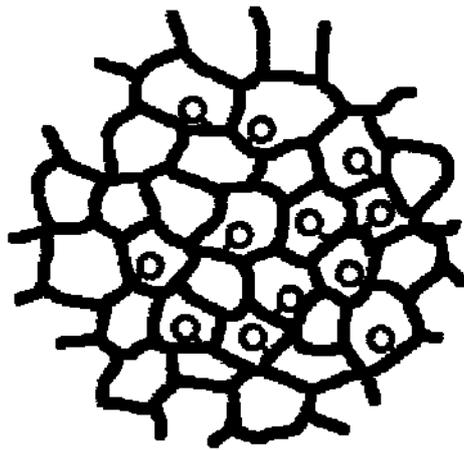
**Fig. 1**



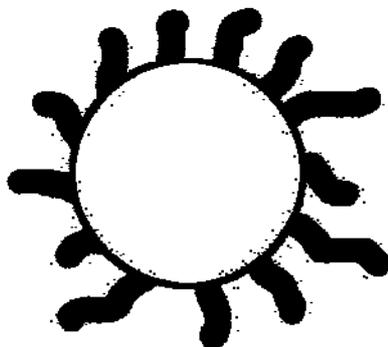
**Fig. 2**



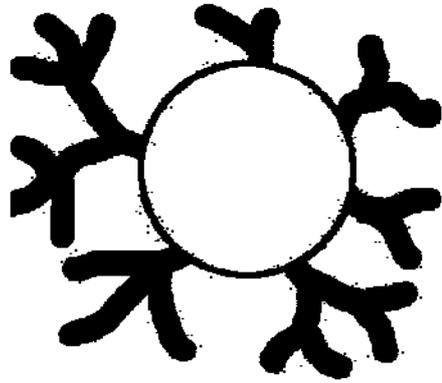
**Fig. 3**



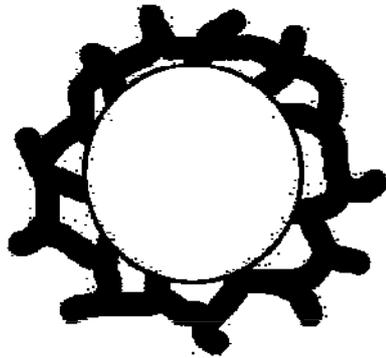
**Fig. 4**



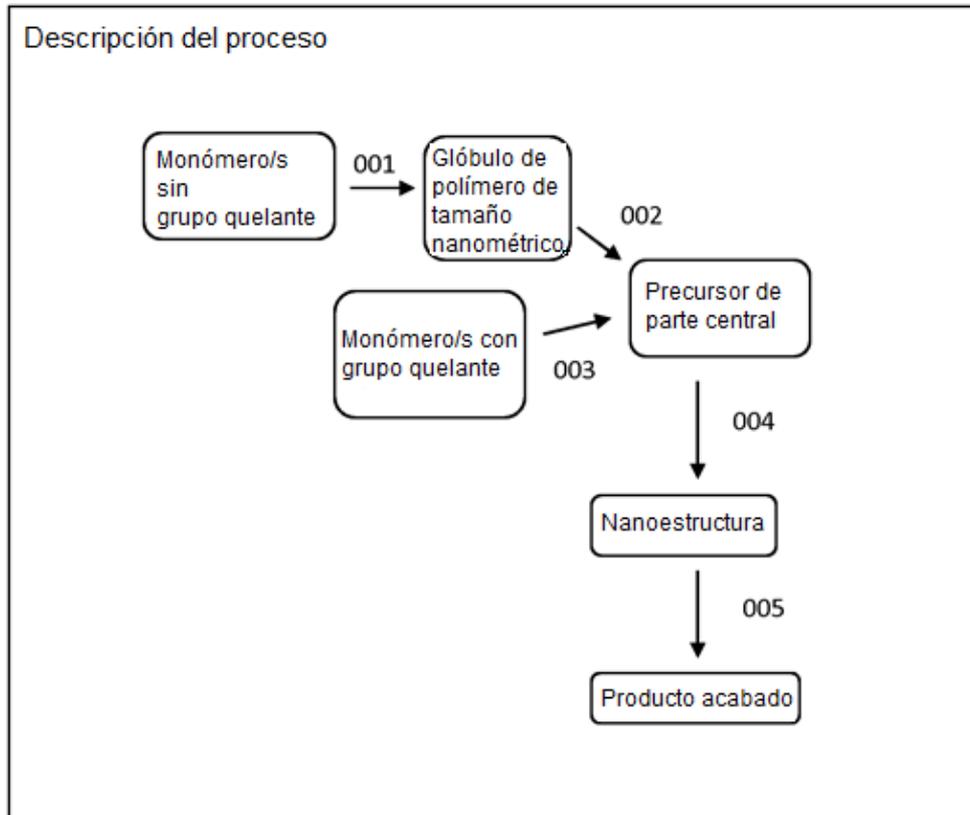
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

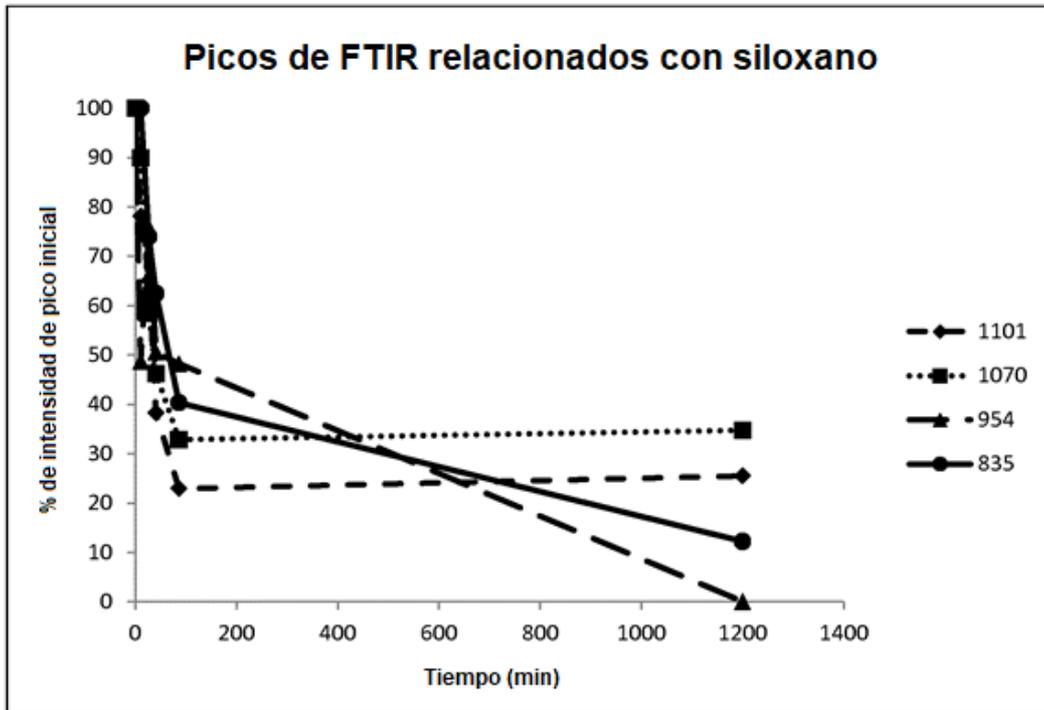


Fig.9

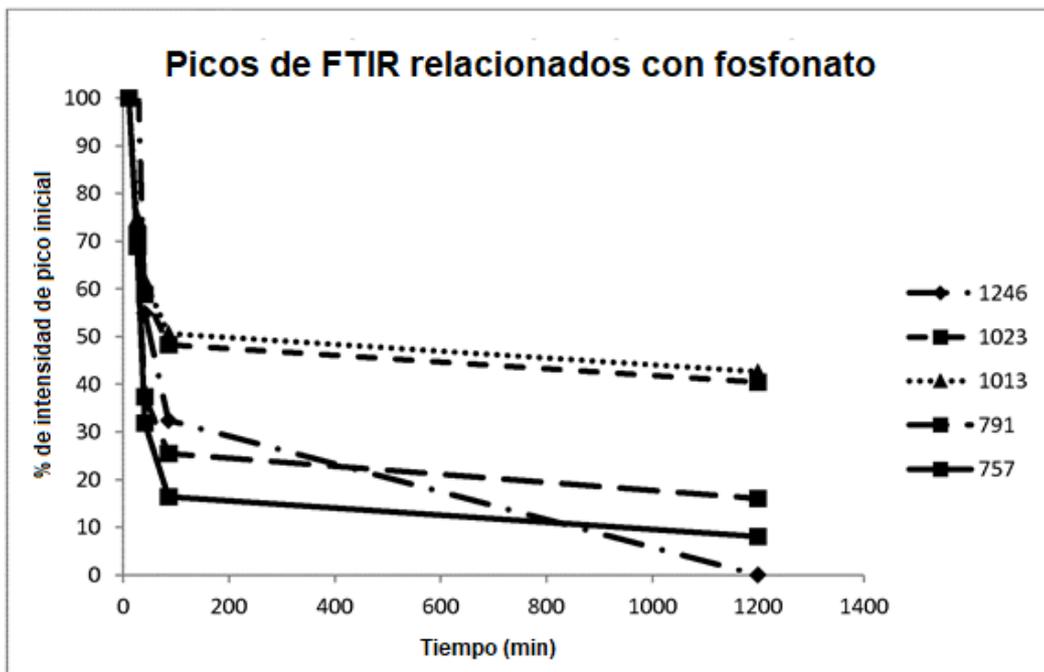
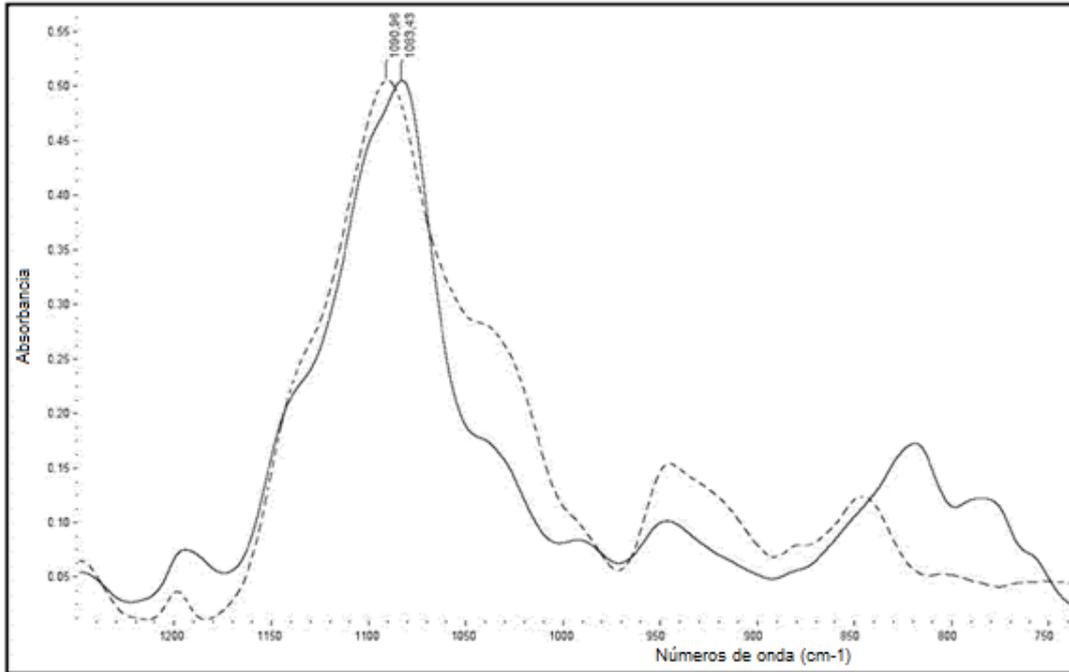
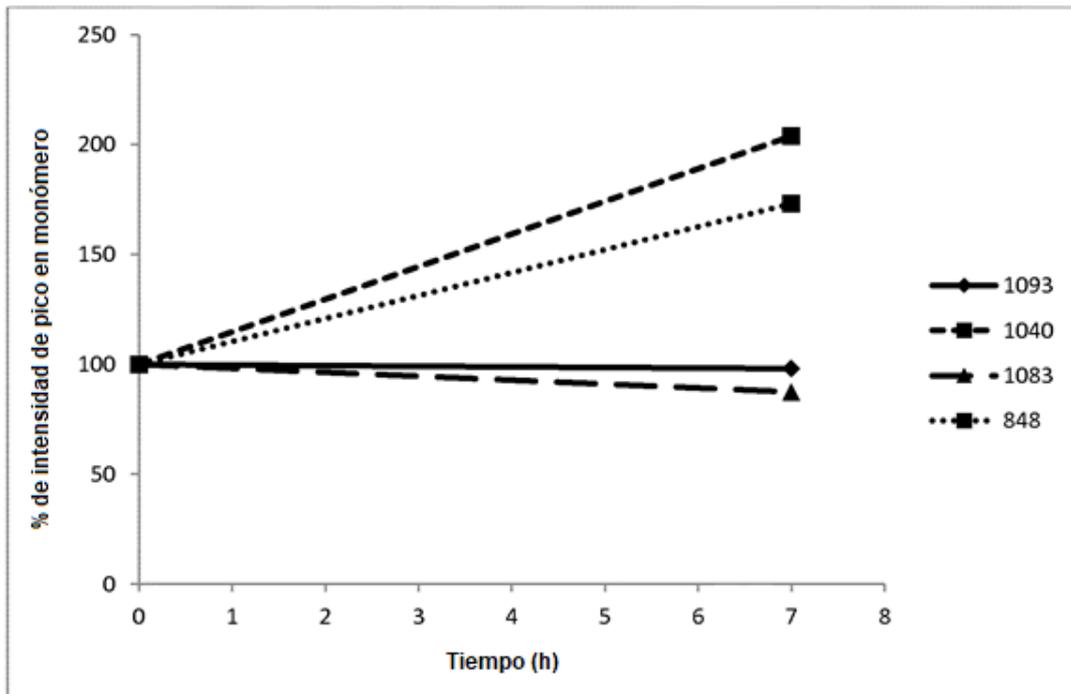


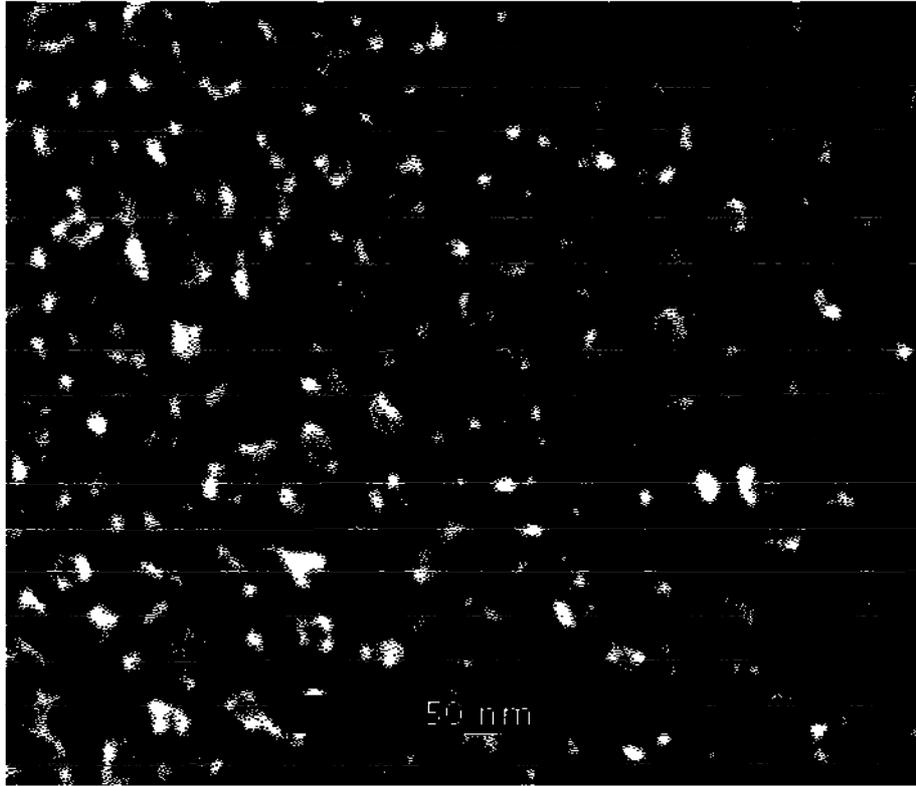
Fig. 10



**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**