

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 424**

51 Int. Cl.:

**C08F 220/34** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2015 PCT/EP2015/075404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2015 E 15788035 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3215545**

54 Título: **Un procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua**

30 Prioridad:

**03.11.2014 EP 14382433**

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

**01.07.2019**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN CIDETEC (100.0%)  
Parque Tecnológico de San Sebastián, Paseo  
Miramón, 196  
20009 Donostia-San Sebastián, ES**

72 Inventor/es:

**AIERTZA OTXOTORENA, MIREN KARMELE;  
SÁNCHEZ ABELLA, LAURA;  
BENITO COLLADO, ANA BELÉN;  
LOINAZ BORDONABE, IRAIDA;  
CABAÑERO, GERMÁN;  
GRANDE, HANS-JÜRGEN;  
MARRADI, MARCO y  
GRACIA ESPAÑA, RAQUEL**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 718 424 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

Un procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua

5 La presente invención se refiere al campo de las nanopartículas y más particularmente al campo de la preparación de nanopartículas. Especialmente, se refiere a un procedimiento para la preparación de nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua. La invención también se refiere a aquellas nanopartículas obtenidas por ese procedimiento, a conjugados dispersables en agua que contienen esas nanopartículas, así como a su uso en biomedicina.

10

**Antecedentes de la técnica**

Las nanopartículas son partículas diminutas con tamaños que son menos de 100 nm y tienen muchas aplicaciones industriales debido a sus novedosas propiedades físicas y químicas. Algunas de esas aplicaciones están en el campo de la nanobiotecnología, la administración de fármacos, la catálisis, marcadores biológicos fluorescentes, biodetección de patógenos, sensores químicos, dispositivos ópticos/electrónicos/magnéticos y en medicina.

El desarrollo de un gran número de técnicas sintéticas ha permitido el uso de muchos tipos diferentes de materiales para obtener tamaños muy diversos de nanopartículas, desde cientos a solo unos pocos nanómetros. Sin embargo, la preocupación principal del uso de nanopartículas en nanomedicina es su toxicidad potencial para los sistemas vivos derivada principalmente de la acumulación en diferentes tejidos y órganos.

Se sabe que las propiedades físicas y químicas exhibidas de las nanopartículas a menudo son dependientes del tamaño. Se han desarrollado varios enfoques para la síntesis de masa molar controlada y distribución estrecha del tamaño para garantizar la uniformidad de las nanopartículas resultantes tanto como sea posible a una gran escala. Uno de estos enfoques comprende el uso de la química de reacción en clic.

Un procedimiento de reacción necesita cumplir con los siguientes requisitos para clasificarse como un procedimiento de reacción en clic: tener una trayectoria de reacción única; ser quimioselectivo; ser de alcance amplio (es decir, aplicable bajo un amplio intervalo de condiciones con una multitud de sustratos de partida); ser modular; dar compuestos estables; y mostrar altos rendimientos. Los requisitos adicionales para las reacciones que implican uno o más reactivos poliméricos para clasificarse como reacciones en clic son: funcionar en escalas de tiempo rápidas; y proceder con equimolaridad.

Se han desarrollado tres métodos diferentes para la construcción de nanopartículas monocatenarias a través de química en clic: homoacoplamiento intracatenario, heteroacoplamiento intracatenario y colapso inducido por reticulador. En particular, el procedimiento de colapso inducido por reticulador implica la adición de un reticulador para generar la reticulación intra-molecular de una única cadena polimérica para dar nanopartículas poliméricas monocatenarias discretas a través de química en clic. La reacción comprende el enlace de los grupos reticulables del agente de reticulado con los grupos reactivos complementarios de la cadena polimérica. El tamaño de las nanopartículas resultantes se controla de forma precisa por el grado inicial de polimerización del precursor polimérico o bien el nivel de incorporación del agente de reticulado.

Incluso aunque se ha reconocido la eficiencia de esta técnica, esta estrategia padece algunos inconvenientes. Uno de estos inconvenientes es la generación de subproductos obtenidos por la reacción de reticulado inter-molecular indeseada entre diferentes cadenas poliméricas. Para evitar estas reacciones inter-moleculares indeseadas, se requiere el uso de condiciones de reacción ultra-diluidas. Sin embargo, estas condiciones comprometen la viabilidad de la síntesis a gran escala de nanopartículas usando este procedimiento y no asegura que las reacciones de reticulado inter-moleculares se eviten enteramente.

50

Inconvenientes adicionales de los procedimientos en clic sintéticos mencionados anteriormente son las condiciones de reacción experimental exigentes requeridas. Por ejemplo, el uso de disolventes orgánicos y el uso de catalizadores limitan su amplio uso a una gran escala debido a que se requieren etapas de purificación y refinado adicionales. Adicionalmente, los materiales de partida tales como precursores poliméricos, el agente de reticulado y/o bien las nanopartículas obtenidas pueden ser incompatibles con las condiciones experimentales requeridas en la reacción.

Otros procedimientos para la preparación de nanopartículas poliméricas monocatenarias se han descrito en el estado de la técnica. Estos procedimientos se llevan a cabo en altas temperaturas. El uso de altas temperaturas es un inconveniente para su escalado industrial.

Por lo tanto, se han descrito en el estado de la técnica varias mejoras para llevar a cabo el procedimiento de reacción de colapso inducido por reticulador anterior en condiciones suaves. Se han estudiado la reducción de la temperatura y/o la retirada de disolventes orgánicos y de catalizador.

65

Sin embargo, se describe en el estado de la técnica que la temperatura es un parámetro crítico para obtener

nanopartículas. Adicionalmente, los requisitos del medio de reacción anhidro severos para llevar a cabo algunas de las reacciones en clic anteriormente mencionadas debido a la presencia de catalizadores/iniciadores incompatibles con agua limitan la producción industrial de nanopartículas poliméricas monocatenarias.

- 5 Por lo tanto, de lo que se conoce en la técnica, se deriva que todavía existe la necesidad de proporcionar un procedimiento de escalado para la preparación de nanopartículas hidrosolubles en condiciones suaves.

### Sumario de la invención

- 10 Los inventores han descubierto un procedimiento de escalado sencillo para preparar nanopartículas dispersables en agua que tienen un tamaño de partícula reducido controlado manteniendo la polidispersión del precursor de cadena polimérica. El procedimiento de la invención también permite aumentar la reacción de reticulado intramolecular para producir nanopartículas bien definidas sin o con una cantidad mínima de reacciones de acoplamiento inter-molecular entre las cadenas poliméricas. El control del tamaño de partícula y la polidispersión de las partículas dispersables en agua se logra mediante la selección del precursor de cadena polimérica apropiado que tiene una solubilidad apropiada en agua, en combinación con las condiciones experimentales suaves. Las condiciones suaves implican el uso de un medio acuoso y llevar a cabo el procedimiento a temperaturas ambientales en un sistema de alta dilución que resulta de la adición controlada, lenta y continua del agente de reticulado al polímero (o viceversa). Es ventajoso porque el procedimiento de la invención permite obtener nanopartículas dispersables en agua en ausencia de disolventes orgánicos y catalizadores de polimerización o reticulados.

- Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua, que comprende reticular un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; teniendo un agente de reticulado homobifuncional grupos reticulables; mediante (a) la adición de una solución acuosa del polímero a una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del polímero una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; o, como alternativa, (a') la adición de una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del polímero a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del polímero comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador; en la que las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua tienen un tamaño de partícula comprendido de 3 a 30 nm y una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm$  20 %.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a las nanopartículas monocatenarias dispersables en agua obtenibles por el procedimiento como se define en el primer aspecto de la invención.

- 40 El tercer aspecto de la invención se refiere a un conjugado dispersable en agua, que comprende las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua como se definen en el primer o el segundo aspectos de la invención y al menos un agente activo.

- El cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende el conjugado dispersable en agua como se define en el tercer aspecto de la invención, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéutica o diagnósticamente aceptables apropiados.

- El quinto aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el conjugado dispersable en agua como se define en el tercer aspecto de la invención.

- 50 El sexto aspecto de la invención se refiere a un conjugado dispersable en agua como se define en el tercer aspecto de la invención, para su uso en terapia cuando el agente activo es un principio activo.

- El séptimo aspecto de la invención se refiere al uso del conjugado dispersable en agua como se define en el tercer aspecto de la invención, en el que el agente activo es un agente de formación de imagen para su uso como un agente de formación de imagen.

- El octavo aspecto de la invención se refiere al conjugado dispersable en agua como se define en el tercer aspecto de la invención para su uso en diagnósticos.

- 60 Por último, el noveno aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua como se definen en el primer y el segundo aspectos de la invención como un vehículo.

### Descripción detallada de la invención

- 65 Todos los términos como se usan en el presente documento en la presente solicitud, salvo que se indique otra cosa,

se entenderán en su significado común, tal como se conoce en la técnica. Otros términos y definiciones más específicos como se usan en la presente solicitud son como se expone a continuación y pretenden aplicarse uniformemente a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones salvo que una definición expresamente expuesta de otra manera proporcione una definición más amplia.

5

El término "dispersable en agua" se refiere a una nanopartícula polimérica monocatenaria cuya dispersabilidad en agua es igual a o mayor de 100 mg por litro de agua. El término "dispersabilidad" se refiere a la capacidad de la nanopartícula polimérica monocatenaria de la presente invención de dispersarse uniformemente en agua y puede filtrarse a través de un filtro de tamaño de 0,2 micrómetros.

10

El término "solución acuosa" se refiere a una solución que contiene un mínimo de un 50 % en peso de agua pura.

El término "polímero" se refiere a moléculas formadas a partir de la unión química de dos o más monómeros que se repiten. Por consiguiente, el término "polímero" incluye homopolímeros (preparados a partir de dos o más monómeros iguales) y copolímeros (preparados a partir de dos o más monómeros diferentes). Los términos "polímero", "polímero precursor", "polímero lineal" y "bobina de polímero" tienen el mismo significado y se usan intercambiamente. Estos términos se refieren al polímero que se usa como un material de partida para la preparación de las nanopartículas de la presente invención. El polímero puede ser sintético, natural o semisintético.

15

El término "polímero" se refiere a moléculas que tienen un peso molecular (MW) mayor de 10.000 Da; preferentemente comprendido de 10.000 a 100.000 Da; más preferentemente de 20.000 a 50.000 Da. El término "polímero sintético" se refiere a aquellos polímeros que no son de origen natural y que se producen enteramente a través de síntesis química. El término "polímero natural" se refiere a aquellos polímeros que son polímeros de origen natural. El término "polímero semisintético" se refiere a aquellos polímeros naturales que se han modificado químicamente a través de síntesis química.

25

Los polímeros usados en la presente invención tienen una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua. La solubilidad de los polímeros de la invención puede medirse por cualquier método descrito en el estado de la técnica para medir la solubilidad de los polímeros. En particular, en la presente invención la solubilidad se ha determinado midiendo la transmitancia de la luz visible que ha de ser el 100 % para aquellos polímeros completamente disueltos.

30

Los polímeros usados en la presente invención contienen una cantidad de monómeros reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica. El término "grupos reactivos complementarios" se refiere a aquellos grupos funcionales del polímero que permiten formar una nanopartícula reticulada tridimensional (red) con los grupos reticulables del agente de reticulado. Los "grupos reactivos complementarios" pueden estar formando parte del esqueleto del polímero o pueden estar fijados al esqueleto como cadenas laterales.

35

El término "polidispersión de un polímero" se refiere a la "polidispersidad de un polímero", un valor calculado dividiendo el peso molecular promedio en peso del polímero entre el peso molecular promedio en número. Este valor significa el intervalo de pesos moleculares presentes en el polímero y se refiere a la amplitud de la distribución del peso molecular obtenida a partir del análisis por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

40

El término "polidispersión del tamaño de partícula de la nanopartícula" se refiere a "polidispersidad del tamaño de partícula", un valor obtenido del cuadrado de la desviación estándar dividido entre el diámetro medio. La polidispersidad del tamaño de partícula se refiere a la amplitud de la distribución del tamaño obtenida por dispersión de luz dinámica (DLS).

45

Esos "grupos reactivos complementarios" pueden estar formando parte del esqueleto del polímero o pueden introducirse en la estructura del polímero. Cuando se introducen los grupos reactivos complementarios, esta etapa puede llevarse a cabo en varias etapas, durante la etapa de polimerización o bien cuando el procedimiento de polimerización ya ha acabado. En una realización particular, la adición de los "grupos reactivos complementarios" se lleva a cabo por una transesterificación de un grupo hidroxilo de una cadena de polisacárido con glicidilmetacrilato.

50

El término "reticulado" se refiere a una nanopartícula que tiene una red de reticulado tridimensional en la que la red se forma por una cadena única del polímero de partida que se ha colapsado por uno o más agentes de reticulado.

55

El término "reticulación" se refiere en el campo de la ciencia polimérica al uso de reticuladores para promover una diferencia en las propiedades físicas de los polímeros. El término "retículo" se refiere a enlaces que enlazan un "grupo reactivo complementario" con un grupo reticulable del agente de reticulación mediante enlace covalente. Por ejemplo, el enlace que enlaza un "grupo reactivo complementario" de la cadena única del polímero con un grupo reticulable del agente de reticulación por enlace covalente, o viceversa. El término "reticulador" o "agente de reticulado" que se usa en el presente documento intercambiamente se refiere al compuesto que tiene la capacidad de reticular cadena o cadenas poliméricas. El término "agente de reticulado homobifuncional" se refiere a aquellos agentes de reticulado que contienen dos sitios reactivos idénticos (es decir, dos grupos reticulables idénticos), que pueden reaccionar con los grupos reactivos complementarios.

60

65

El término "monómero reticulable" o "monómero reactivo" o "monómero complementario" que se usan en el presente documento intercambiamente se refieren al grupo funcional en la cadena polimérica que reacciona con el reticulador para formar las nanopartículas poliméricas monocatenarias.

5

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos excipientes o vehículos adecuados para su uso en la tecnología farmacéutica para preparar composiciones con uso médico.

El término "diagnósticamente aceptable" se refiere a aquellos excipientes o vehículos adecuados para su uso en la tecnología diagnóstica para preparar composiciones con uso diagnóstico. En particular, el término "diagnósticamente aceptable" se refiere a aquellos excipientes o vehículos adecuados para su uso en la tecnología diagnóstica para preparar composiciones con uso diagnóstico de formación de imagen.

En una realización alternativa, el procedimiento de la invención se lleva a cabo a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del polímero una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar (procedimiento a). En una realización alternativa, el procedimiento de la invención se lleva a cabo a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del polímero comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar (procedimiento a').

15

En una realización preferida, la concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional o, como alternativa, la concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del polímero está comprendida de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  molar; más preferentemente de aproximadamente  $10^{-5}$  molar. La tasa de adición en combinación con las otras condiciones experimentales mencionadas anteriormente permite preparar nanopartículas con las propiedades físicas y químicas apropiadas para que se usen en biomedicina.

20

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua, que comprende reticular un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; teniendo un agente de reticulado homobifuncional grupos reticulables; mediante (a) la adición de una solución acuosa del polímero a una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del polímero una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador; en la que la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua tiene un tamaño de partícula comprendido de 3 a 30 nm y una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm 20$  %.

30

En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua, que comprende reticular un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; teniendo un agente de reticulado homobifuncional grupos reticulables; mediante (a') la adición de una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del polímero a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del polímero comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador; en la que la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua tiene un tamaño de partícula comprendido de 3 a 30 nm y una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm 20$  %.

35

En una realización de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento es aquel en el que las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua tienen una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm 15$  %; preferentemente  $\pm 10$  %; más preferentemente  $\pm 5$  %.

40

En una realización de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento es aquel en la que las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua tienen un tamaño de partícula comprendido de 5 a 20 nm y una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm 20$  %.

45

El procedimiento de la invención se lleva a cabo con un polímero que tiene una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica. En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento se lleva a cabo con un polímero que tiene una cantidad de monómeros reactivos complementarios comprendida del 10 al 40 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica.

50

El procedimiento de la invención es aquel en el que las nanopartículas poliméricas monocatenarias tienen un tamaño de partícula comprendido de 3 a 30 nm; con una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión del polímero  $\pm$  20 %. En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento se lleva a cabo con un polímero que tiene una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; más preferentemente comprendida del 10 al 40 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica. El tamaño de partícula de las nanopartículas de la invención y su polidispersión pueden medirse por cualquier método descrito en el estado de la técnica para medir el tamaño de partícula de las nanopartículas. En particular, el método usado en la presente invención para medir el tamaño de partícula en solución es la dispersión de luz dinámica (DLS) que informa del diámetro promedio en número y el microscopio de fuerza atómica (MFA) o el microscopio electrónico de transmisión (MET) para medir las partículas secas y el método usado en la presente invención para medir la polidispersión de la partícula de las nanopartículas es la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento es aquel en el que el porcentaje de reticulación intramolecular de la nanopartícula está comprendido del 3 al 45 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica de la nanopartícula; preferentemente comprendida del 5 al 20 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento comprende hacer reaccionar un polímero que tiene una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 10 al 40 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; y las nanopartículas poliméricas monocatenarias tienen un tamaño de partícula comprendido de 3 a 20 nm y un porcentaje de reticulación intramolecular comprendido del 5 al 20 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención, el polímero es un copolímero. Los ejemplos de los copolímeros apropiados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de metacrilato, copolímeros de acrilato-metacrilato o copolímeros de acrilamida, por ejemplo poli[ácido (meta)acrílico-co-metacrilato de 2-(2-(aminooxi)acetamido)etilo] y poli[N,N-dimetil-2-aminoetilmetacrilato-co-metacrilato de 2-(aminooxi)etilo].

En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención, el polímero es un polímero semi-sintético derivado de un polímero natural. Los ejemplos de polímeros naturales apropiados para la preparación del semi-sintético apropiado para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, dextrano, alginato, quitosano y ácido hialurónico. Los ejemplos de polímeros semi-sintéticos apropiados para la presente invención incluyen dextrano derivatizado con metacrilato de glicidilo o ácido hialurónico.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención, el grupo reactivo complementario del polímero de la invención es el grupo  $-O-C(=O)-C(=CH_2)-CH_3$ ; el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es el grupo  $-SH$ ; y el procedimiento se lleva a cabo a un pH igual a o más alto que 8. En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-SH$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-O-C(=O)-C(=CH_2)-CH_3$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH igual a o más alto que 8.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención, el grupo reactivo complementario del polímero de la invención es el grupo  $-O-NH_2$ ; el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-CHO$ ; y el procedimiento se lleva a cabo a un pH comprendido desde 5 y 7. En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención, el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-CHO$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-O-NH_2$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH comprendido desde 5 hasta 7.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además una etapa previa de someter un polímero con grupos reactivos complementarios protegidos a una reacción de desprotección para producir el polímero que tiene los grupos reactivos complementarios desprotegidos como se define anteriormente. La reacción de desprotección puede comprender someter el polímero a los grupos reactivos complementarios protegidos a condiciones ácidas, a condiciones básicas o cualquier otra condición de desprotección adecuada.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además una etapa previa de someter un agente de reticulado con grupos reticulables protegidos a una reacción de desprotección para producir el agente de reticulado con grupos reticulables complementarios desprotegidos como se define anteriormente. La reacción de desprotección puede comprender someter el agente de reticulado con los grupos reticulables protegidos a condiciones ácidas, a condiciones básicas o cualquier otra condición de desprotección adecuada.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además una etapa previa de someter un polímero con grupos reactivos complementarios protegidos a una reacción de desprotección para producir el polímero que tiene los grupos reactivos complementarios desprotegidos como se define anteriormente; y someter un agente de reticulado con grupos reticulables protegidos a una reacción de desprotección para producir el agente de reticulado con grupos reticulables complementarios desprotegidos como se define anteriormente.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, en el procedimiento de la invención en el que la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua como se define anteriormente o a continuación tienen grupos funcionales reactivos, el procedimiento comprende además una etapa adicional de convertir los grupos funcionales reactivos en grupos funcionales no reactivos. Es ventajoso debido a que esas modificaciones pueden mejorar algunas propiedades físicas y/o químicas de las nanopartículas tales como por ejemplo su tiempo de vida o su estabilidad. Las modificaciones apropiadas de la estructura de la nanopartícula pueden ser el enlace covalente de la cadena de polietilenglicol, el enlace covalente de un péptido, la incorporación de grupos funcionales cargados positivos o bien negativos y el enlace de grupos hidroxilo y alcanos de bajo peso molecular.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además una etapa adicional de purificación de la nanopartícula obtenida en el procedimiento como se define anteriormente y a continuación. Puede usarse cualquier método apropiado para purificar la nanopartícula descrita en el estado de la técnica. En particular, la etapa de purificación se selecciona del grupo que consiste en diálisis, filtración por centrifuga y precipitación; preferentemente, la etapa de purificación se lleva a cabo por diálisis.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además una etapa adicional de secado de la nanopartícula como se define anteriormente y a continuación. Puede usarse cualquier método apropiado para secar la nanopartícula descrita en el estado de la técnica. En particular, la etapa de secado se selecciona del grupo que consiste en secado por pulverización y secado por congelación. En una realización preferida, la etapa de secado llevada a cabo es secado por congelación.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento de la invención comprende además etapas adicionales, en el que las etapas adicionales comprenden: purificar y secar la nanopartícula obtenida en el procedimiento como se define anteriormente o a continuación.

La nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua obtenible por un procedimiento como se define anteriormente en el primer aspecto de la invención es también parte de la invención. Para los fines de la presente invención las expresiones "obtenible", "obtenido" y expresiones equivalentes se usan intercambiamente y, en cualquier caso, la expresión "obtenible" abarca la expresión "obtenido".

El tercer aspecto de la invención se refiere a un conjugado dispersable en agua, que comprende la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua como se define anteriormente en el primer y el segundo aspectos de la invención y al menos un agente activo. La estructura de la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua es ventajosa por su versatilidad y multifuncionalidad que permite la carga de un enorme intervalo de agentes activos. Adicionalmente, el tamaño de partícula y la polidispersidad de las nanopartículas obtenidas por el procedimiento de la invención también es ventajoso porque permite obtener conjugados dispersables en agua que tienen las propiedades físicas y químicas adecuadas para su uso en biomedicina.

Estos agentes activos pueden unirse covalentemente de forma directa o mediante uno o dos conectores al esqueleto; o, como alternativa, pueden unirse no covalentemente al esqueleto. En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el agente activo se selecciona del grupo que consiste en el principio activo y un agente de agente de formación de imagen.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el agente activo es un principio activo; preferentemente el principio activo se selecciona de agentes pequeños (es decir, ingredientes farmacéuticos activos) a biomoléculas (es decir, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos). Los ejemplos de principio activo incluyen, pero sin limitación, anticuerpo, antígeno, péptido, oligosacárido, oligonucleótido de doble cadena (ADN) y ARNip.

El procedimiento para preparar un conjugado dispersable en agua como se define anteriormente es también parte de la invención.

- 5 En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento comprende poner en contacto las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua de la presente invención con el agente activo como se define anteriormente para obtener un conjugado dispersable en agua.
- 10 En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar el conjugado dispersable en agua comprende llevar a cabo el procedimiento del primer aspecto de la invención con un agente activo polimérico.

- En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar el conjugado dispersable en agua, que comprende
- 15 reticular un agente activo polimérico con un agente de reticulado homobifuncional, comprende además una etapa previa de poner en contacto el polímero con el agente activo como se define anteriormente para obtener un agente activo polimérico. Por lo tanto, el procedimiento comprende poner en contacto un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida
- 20 del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica con un agente activo para obtener un agente activo polimérico; y reticular el agente activo polimérico obtenido en la etapa previa con un agente de reticulado homobifuncional que tiene grupos reticulables; mediante (a) la adición de una solución acuosa del agente activo polimérico a una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una
- 25 velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente activo polimérico una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar o, como alternativa, (a') la adición de una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del agente activo polimérico a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del agente activo polimérico comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en
- 30 ausencia de un catalizador; para obtener un conjugado dispersable en agua de la presente invención.

- En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar el conjugado dispersable en agua, que comprende
- 35 reticular un agente activo polimérico con un agente de reticulado homobifuncional, comprende además una etapa previa de preparación del agente activo polimérico polimerizando las unidades de monómero correspondientes del polímero en presencia del agente activo para obtener un agente activo polimérico como se define anteriormente. Por lo tanto, el procedimiento comprende polimerizar las unidades de monómero correspondientes en presencia del agente activo para obtener un agente activo polimérico que tiene una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena
- 40 polimérica; y reticular el agente activo polimérico obtenido en la etapa previa con un agente de reticulado homobifuncional que tiene grupos reticulables; mediante (a) la adición de una solución acuosa del agente activo polimérico a una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una velocidad de adición que permita tener durante la adición de la mezcla del agente activo polimérico una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar o, como
- 45 alternativa, (a') la adición de una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del agente activo polimérico a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del agente activo polimérico comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador; para obtener un conjugado dispersable en agua de la presente invención.

- 50 En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar el conjugado dispersable en agua comprende llevar a cabo el procedimiento del primer aspecto de la invención con un agente activo de reticulado homobifuncional que tiene grupos reticulables.

- 55 En una realización alternativa, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento para preparar el conjugado dispersable en agua, que comprende reticular un polímero con un agente activo de reticulado homobifuncional, comprende además una etapa previa de poner en contacto el agente de reticulado homobifuncional con el agente activo como se define
- 60 anteriormente para obtener un agente activo de reticulado homobifuncional. Por lo tanto, el procedimiento comprende reticular un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica con un agente activo de reticulado que tiene grupos reticulables obtenido en la etapa anterior; mediante (a) la adición de una solución acuosa del polímero a una solución acuosa del
- 65 agente activo de reticulado homobifuncional a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del polímero una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente activo de reticulado

homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar o, como alternativa, (a') la adición de una solución acuosa del agente activo de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del polímero a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente activo de reticulado homobifuncional una concentración del agente activo de reticulado homobifuncional en la solución del polímero comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador para obtener un conjugado dispersable en agua de la invención.

El conjugado dispersable en agua de la presente invención puede estar en forma de una composición farmacéutica o diagnóstica, que también es parte de la invención. Por lo tanto, el cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende el conjugado dispersable en agua de la presente invención, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéutica o diagnósticamente aceptables apropiados. Las composiciones farmacéuticas o diagnósticas pueden estar en forma de composiciones para administración parenteral (intramuscular, subcutánea o intravenosa), administración externa (oral o rectal) o administración tópica (dérmica, mucosa o inhalada).

La composición anteriormente mencionada puede prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los excipientes o vehículos farmacéutica o diagnósticamente aceptables apropiados y sus cantidades pueden determinarse fácilmente por aquellos expertos en la materia de acuerdo con el tipo de formulación a prepararse.

El conjugado dispersable en agua de la presente invención puede estar en forma de un kit, que también es parte de la invención. Por lo tanto, el quinto aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el conjugado dispersable en agua como se define anteriormente. En una realización, el kit comprende además medios y/o instrucciones adecuados. En una realización alternativa, el kit comprende además un soporte sólido, disolventes, reactivos y/o tampones.

Las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua de la presente invención son intermedios para la preparación del conjugado dispersable en agua de la presente invención. Por lo tanto, las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua de la invención también son útiles como vehículos para agentes activos.

El conjugado dispersable en agua de la invención que comprende uno o más ingredientes activos es útil en terapia. También se refiere a un método para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a mamíferos en necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz del conjugado dispersable en agua de la presente invención, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el conjugado dispersable en agua es aquel en el que el agente activo es un agente de formación de imagen. El término "agente de formación de imagen" se refiere a cualquier sustancia que se usa como un marcador o potencia estructuras específicas en cualquier técnica de formación de imagen. En una realización, el agente de formación de imagen se selecciona del grupo que consiste en agente fluorescente, agente de contraste y agente de formación de radioimagen. Los ejemplos de agentes de formación de imagen apropiados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metales de transición y metales de transición radiactivos quelados a agentes quelantes, por ejemplo DTPA (ácido dietileno triamino pentaacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético) o NOTA (ácido 1,4,7-triazacilononan-1,4,7-triacético), fluoresceína, rodamina y cian 5,5.

En una realización, opcionalmente en combinación con uno o más rasgos de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el conjugado dispersable en agua es aquel en el que el agente de formación de imagen es un "agente de contraste". El término "agente de contraste" se refiere a agentes que acentúan ciertas estructuras que de otra manera serían difíciles de ver por técnicas habituales.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del conjugado dispersable en agua como un agente de formación de imagen cuando el agente activo es un agente de formación de imagen.

En una realización, el conjugado dispersable en agua se usa como un agente de formación de imagen en ensayos de detección. Un ensayo de detección apropiado puede comprender: (a) poner en contacto el conjugado dispersable en agua de la invención que tiene un agente activo capaz de unirse específicamente a un agente diana con el agente diana presente en una muestra a ensayarse durante un período de tiempo apropiado que permita la unión; y, opcionalmente, (b) identificar y/o cuantificar el agente diana. Las muestras de ensayo para la presente invención pueden ser suero, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.

En una realización, el conjugado dispersable en agua se usa como un agente de formación de imagen en ensayos de detección. Un ensayo de detección apropiado puede comprender: (a) poner en contacto el conjugado dispersable en agua de la invención que tiene un agente activo capaz de unirse específicamente a un agente diana con el agente diana presente en un sujeto durante un período de tiempo apropiado para permitir circular el conjugado

dispersable en agua al sitio diana; y, opcionalmente, (b) identificar y/o cuantificar el agente diana. En una realización particular la identificación y/o la cuantificación del agente diana se lleva a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para la identificación y/o la cuantificación pueden ser fluorescencia, resonancia de plasmón superficial y colorimetría.

5

El ensayo de detección como se define anteriormente puede usarse para fines diagnósticos donde la cantidad presente o una del agente diana puedan correlacionarse con una enfermedad o afección específicas. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere al conjugado dispersable en agua, que comprende uno o más agentes de formación de imagen para su uso en diagnósticos. Este aspecto podría formularse como un método para el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto, el método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del conjugado dispersable en agua que tiene uno o más agentes de formación de imagen como se define anteriormente al sujeto. Este aspecto podría formularse como un método para el diagnóstico de una enfermedad en una muestra aislada de un sujeto, el método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del conjugado dispersable en agua que tiene uno o más agentes de formación de imagen como se define anteriormente a la muestra aislada del sujeto. La detección de estos agentes de formación de imagen puede llevarse a cabo por técnicas bien conocidas tales como técnicas diagnósticas de formación de imagen. Los ejemplos de técnicas diagnósticas de formación de imagen adecuadas para la presente invención incluyen, pero no se limitan a formación de imagen por resonancia magnética (IRM), rayos x, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), microscopio de fluorescencia y fluorescencia *in vivo*.

20

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, el término "comprende" y las variaciones del término, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Asimismo, el término "comprende" abarca el caso de "que consiste en". Objetos adicionales, ventajas y rasgos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención.

25

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Asimismo, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

### Ejemplos

30

Las siguientes abreviaturas se usan en los ejemplos a continuación:

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

35

EDC: 3-(Etiliminometilnamino)-*N,N*-dimetilpropan-1-amina

MES: ácido 2-[*N*-morfolino]etansulfónico)

40

NHS: (N-hidroxisuccinimida)

THF: tetrahidrofurano

TFA: ácido trifluoroacético

45

DMSO: dimetilsulfóxido

PEG: polietilenglicol

PDI: índice de polidispersidad

50

Cy5.5: éster de cianina5.5 NHS

DLS: dispersión de luz dinámica

55

SEC: cromatografía de exclusión por tamaño

ICP: plasma inductivamente acoplado

MWCO: corte de peso molecular

60

## 1. PARTÍCULAS

### Procedimiento general de referencia

65

El polímero que tiene una concentración comprendida de 0,005-0,05 M de los grupos reticulables se disuelve en una solución acuosa a una temperatura de 20-25 °C, a un pH apropiado y fuerza iónica de acuerdo con la química en clic

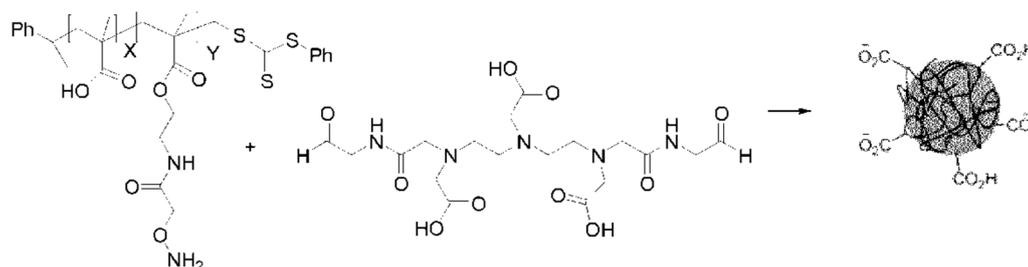
implicada. El agente de reticulado homobifuncional se disuelve en una solución acuosa a temperatura ambiente en una concentración comprendida de 0,05-0,5 M a pH y fuerza iónica de acuerdo con la química en clic implicada.

La solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional se añade a la solución acuosa del polímero de una manera lenta, controlada y continua a la solución acuosa del polímero en agitación vigorosa a temperatura ambiente.

- 5 La tasa de adición de la solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional al polímero se ajusta para obtener una concentración ultradiluida constante de  $10^{-5}$  M del agente de reticulado homobifuncional en la solución de polímero. Opcionalmente, los posibles motivos sin reaccionar del polímero pueden inactivarse usando las moléculas más adecuadas.
- 10 Después, la solución se dializa hasta que los conectores sin reaccionar o las moléculas de inactivación están fuera de la membrana; y finalmente, la solución acuosa resultante se seca (por secado por congelación) para obtener la partícula como un compuesto sólido.

#### EJEMPLO 1: Nanopartículas de polímero monocatenarias basadas en ácido polimetacrílico (PMAAc).

15



1A

- 20 El agente de reticulado homobifuncional (ácido 5,8-bis(carboximetil)-2-(2-(2,2-dimetoxietilamino)-2-oxoetil)-13-metoxi-10-oxo-14-oxa-2,5,8,11-tetraazapentadecan-1-carboxílico) (377,5 mg, 0,665 mmol) se disolvió en 2,67 ml de HCl (5 M) y se agitó a una temperatura de 20-25 °C durante 30 minutos. Después, el pH de la solución obtenida de esta manera se ajustó a 6 mediante la adición de NaOH (ac.) y el volumen final se ajustó a 3,33 ml con agua.
- 25 El polímero de partida se desprotegió a partir de un copolímero basado en metacrilato de *tert*-butilo (MW alrededor de 65000 (usando una curva de calibrado de poli(metacrilato de metilo) en THF a 40 °C) y un índice de polidispersidad (PDI) de 1,44 (THF a 40 °C)). El polímero desprotegido en el que x es 0,83 e y es 0,17 (700 mg, 0,95 mmol de grupo reticulable reactivo) también se disolvió en agua (20 ml) y el pH se ajustó a 6 mediante la adición de 2,1 ml de HCl 1,2 M. El volumen final se ajustó a 48 ml con agua y también se incorporó complejo de picolina borano (101,6 mg, 0,95 mmol).
- 30 Después de eso se añadió la solución de agente de reticulado a la solución de polímero a una velocidad de 1 ml/h a una temperatura de 20-25 °C y se siguió agitando durante 16 h. La solución se precipitó después en acetona (130 ml) y se obtuvo un sólido blanco. El precipitado se centrifugó después de eso y se secó en una campana

- 35 extractora de humos para retirar las trazas de acetona. Finalmente el sólido se redisolvió en agua y se secó por congelación para obtener 800 mg de nanopartículas con un tamaño de alrededor de 23 nm en DLS (en PBS a 25 °C) y un PDI de 1,58 en SEC (tampón fosfato + NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, pH = 6,3, T = 40 °C).

1B

- 40 El agente de reticulado homobifuncional (ácido 5,8-bis(carboximetil)-2-(2-(2,2-dimetoxietilamino)-2-oxoetil)-13-metoxi-10-oxo-14-oxa-2,5,8,11-tetraazapentadecan-1-carboxílico) (65 mg; 0,115 mmol) y HCl (5 M) (0,46 ml) se mezclaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de ese tiempo, el pH de la mezcla se ajustó cuidadosamente a pH 6 con NaOH (ac.). En caso necesario, se añadió agua para completar un volumen de
- 45 0,7 ml de concentración final (0,16 M). Esta solución se usó sin purificación adicional.

- El polímero de partida se desprotegió a partir de un copolímero basado en metacrilato de *tert*-butilo (MW alrededor de 65000 (usando una curva de calibrado de poli(metacrilato de metilo) en THF a 40 °C) y un índice de polidispersidad (PDI) de 1,44 (THF a 40 °C)). La desprotección se realizó mediante el tratamiento con un exceso de
- 50 TFA (5 ml) en 15 ml de diclorometano/H<sub>2</sub>O (9/1 v/v) de 1 g de copolímero. El precipitado resultante se lavó con diclorometano y se secó al vacío. El polímero desprotegido bruto (100 mg) en el que x es 0,83 e y es 0,17 se disolvió en agua (1 ml) añadiendo NaOH ac. hasta pH > 12. Después de unos pocos minutos, el pH de la solución transparente resultante (pH 13) se ajustó cuidadosamente a 6 con HCl. Se añadió agua para tener un volumen final de 6,5 ml.

55

A continuación, la solución 0,16 M del agente de reticulado (0,38 ml) se añadió a la solución de polímero a una

velocidad de 0,12 ml/h y a una temperatura de 20-25 °C. La solución se agitó durante 48 h. Después se añadió complejo de picolina borano (13,8 mg) y, después de 12 horas, la reacción bruta se cargó en una membrana de 3500 MWCO y se dializó contra agua pura hasta que la conductividad se redujo a alrededor de 1  $\mu$ S/cm. La solución acuosa obtenida de esta manera (21 ml) se almacenó en la nevera a 4 °C a una concentración de 3,7 mg/ml. Las 5 nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de 11 nm medido por DLS (en PBS medido a 25 °C).

**EJEMPLO 2: Nanopartículas poliméricas monocatenarias basadas en poli(N,N-dimetilaminoetil) metacrilato (PDMAEMA) marcadas con fluoresceína.**

10 2A. Preparación de nanopartículas poliméricas monocatenarias basadas en poli(N,N-dimetilaminoetil) metacrilato (PDMAEMA).

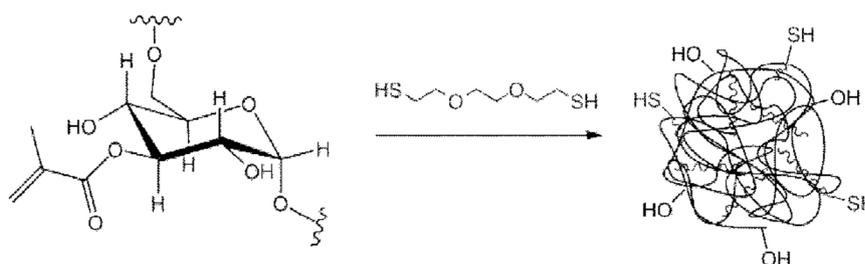
Las partículas del Ejemplo 2 se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 usando el poli[N,N-dimetil-2-aminoetilmetacrilato<sub>0,87</sub>-co-(2-(2-(aminoxi)acetamido)etilmetacrilato<sub>0,13</sub>)] como un polímero (300 mg, 0,14 mmol de grupo reticulable reactivo, MW alrededor de 53000 (usando una curva de calibrado de poli(metacrilato de metilo) en THF a 40 °C)) y ácido 5,8-bis(carboximetil)-2-(2-(2,2-dimetoxietilamino)-2-oxoetil)-13-metoxi-10-oxo-14-oxa-2,5,8,11-tetraazapentadecan-1-carboxílico (57 mg, 0,098 mmol) como un agente de reticulado homobifuncional. Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de alrededor de 15 nm en DLS (en PBS a 25 °C) y un PDI de 1,22 en SEC (THF a 40 °C).

20 2B. Marcaje con fluoresceína de nanopartículas poliméricas monocatenarias basadas en poli(N,N-dimetilaminoetil) metacrilato (PDMAEMA).

Las nanopartículas obtenidas del Ejemplo 2 (20 mg, 0,1 mmol de monómero principal) se disolvieron en 400  $\mu$ l de agua y la solución se agitó (800 rpm) a 65 °C. Después de 10 minutos se añadió ácido 6-bromohexanoico (1,95 mg, 0,01 mmol) disuelto en DMSO (concentración de 50 mg/ml) a la mezcla y se dejó en agitación a 65 °C durante 36 h. La muestra obtenida de esta manera se filtró por centrifugación (10.000 rpm, 30 min) en tubo VIVASPIN 6 (corte 3 kDa) (previamente lavado con agua dos veces) y se lavó tres veces con agua/DMSO 95:5 (3 x 1 ml).

30 Las partículas en el filtro se recogieron con 1 ml de agua/DMSO (3:1) y se añadió EDC (1,92 mg, 0,01 mmol). Después de 10 min, Se añadió NHS (1,15 mg, 0,01 mmol) y la solución se dejó en agitación a 40 °C durante 20 min. Después se disolvió fluorescein-5-tiosemicarbazida (0,33 mg, 0,001 mmol) en DMSO (concentración de 50 mg/ml) y la mezcla se dejó agitar a 40 °C durante 16 h. La solución se dializó después en oscuridad (MWCO = 3500) contra agua pura hasta que la conductividad se redujo a alrededor de 1  $\mu$ S/cm y el producto se secó por congelación para 35 obtener un polvo naranja (13,7 mg).

**EJEMPLO 3: Nanopartículas de polímero monocatenarias basadas en dextrano (DXT).**



40 3A

El agente de reticulado homobifuncional (20 mg, 0,112 mmol) se disolvió en 0,73 ml de una mezcla de PBS/Me-OH 1:1 y el pH se ajustó a 9,5. El polímero basado en Dextrano (300 mg, 0,39 mmol de grupos reticulables) también se 45 disolvió en PBS (25 ml) y el pH se ajustó a 9. En lo sucesivo la solución de agente de reticulado se añadió a la solución de polímero a una velocidad de 0,02 ml/h ( $7 \times 10^{-5}$  mM/min) y se siguió agitando durante 36,5 h de adición.

La solución obtenida de esta manera se dializó después (MWCO = 1000 Da) contra agua pura primero hasta que la conductividad se redujera a alrededor de 1  $\mu$ S/cm y en lo sucesivo agua pura ajustada a pH 9 usando NaOH (2 50 cambios de agua). Finalmente la solución acuosa resultante se secó por congelación para obtener 279,9 mg de nanopartículas como un sólido blanco. Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de alrededor de 18 nm en DLS (en PBS a 25 °C) y un PDI de 2,14 en SEC (tampón fosfato + NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, pH = 6,3, T = 40 °C).

3B 55

El agente de reticulado homobifuncional (12 mg, 0,067 mmol) se disolvió en 0,43 ml de una mezcla de PBS/Me-OH

1:1 y el pH se ajustó a 9,5. El polímero basado en Dextrano (300 mg, 45 % en moles de grupos reticulables, también se disolvió en PBS (25 ml) y el pH se ajustó a 9. En lo sucesivo la solución de agente de reticulado se añadió a la solución de polímero a una velocidad de 0,02 ml/h ( $7 \times 10^{-5}$  mM/min) y se siguió agitando durante 36,5 h de adición. Se realizó un ensayo de Ellman para asegurar la ausencia de los grupos reactivos tiol.

5

La solución obtenida de esta manera se dializó después (MWCO = 1000 Da) contra agua pura primero hasta que la conductividad se redujera a alrededor de  $1 \mu\text{S/cm}$ . Finalmente la solución acuosa resultante se secó por congelación para obtener nanopartículas como un sólido blanco. Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de 9 nm medido por DLS.

10

3C

El agente de reticulado homobifuncional (16 mg, 0,09 mmol) se disolvió en 0,57 ml de una mezcla de PBS/MeOH 1:1 y el pH se ajustó a 9,5. El polímero basado en Dextrano (300 mg, 35 % en moles de grupos reticulables, también se disolvió en PBS (25 ml) y el pH se ajustó a 9. En lo sucesivo la solución de agente de reticulado se añadió a la solución de polímero a una velocidad de 0,02 ml/h ( $7 \times 10^{-5}$  mM/min) y se siguió agitando durante 36,5 h de adición. Se realizó un ensayo de Ellman para asegurar la ausencia de los grupos reactivos tiol.

15

La solución obtenida de esta manera se dializó después (MWCO = 1000 Da) contra agua pura primero hasta que la conductividad se redujera a alrededor de  $1 \mu\text{S/cm}$ . Finalmente la solución acuosa resultante se secó por congelación para obtener nanopartículas como un sólido blanco. Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de 10 nm medido por DLS.

20

3D

25

El agente de reticulado homobifuncional (20 mg, 0,11 mmol) se disolvió en 0,73 ml de una mezcla de PBS/MeOH 1:1 y el pH se ajustó a 9,5. El polímero basado en Dextrano (300 mg, 55 % en moles de grupos reticulables, también se disolvió en PBS (25 ml) y el pH se ajustó a 9. En lo sucesivo la solución de agente de reticulado se añadió a la solución de polímero a una velocidad de 0,02 ml/h ( $7 \times 10^{-5}$  mM/min) y se siguió agitando durante 36,5 h de adición. Se realizó un ensayo de Ellman para asegurar la ausencia de los grupos reactivos tiol.

30

La solución obtenida de esta manera se dializó después (MWCO = 1000 Da) contra agua pura primero hasta que la conductividad se redujera a alrededor de  $1 \mu\text{S/cm}$ . Finalmente la solución acuosa resultante se secó por congelación para obtener nanopartículas como un sólido blanco. Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de 6 nm medido por DLS.

35

## 2. CONJUGADOS DISPERSABLES EN AGUA

### EJEMPLO 4: Conjugado de gadolinio

40

Las partículas obtenidas en el Ejemplo 2 (62 mg, 0,022 mmol de conector) se disolvieron en agua (1 ml) y el pH se ajustó a 6 usando HCl 0,1 M. Después una solución de  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20,5 mg en 1,25 ml, 0,055 mmol) se añadió lentamente y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. Por último, la muestra se dializó (MWCO = 1000 Da) contra agua pura hasta que la conductividad se redujera a alrededor de  $1 \mu\text{S/cm}$  y la solución acuosa resultante se secó por congelación para obtener 60 mg de las nanopartículas como un sólido blanco, con un tamaño de alrededor de 25 nm en PBS medido en DLS, siendo la cantidad de Gd incorporada alrededor del 2,5 % en peso medida por plasma inductivamente acoplado (ICP). Los valores de relajividad medidos en un espectrómetro Minispec TD-NMR de 60 MHz fueron  $R_1 = 8,4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  y  $R_2 = 10,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  en PBS.

45

### 50 EJEMPLO 5: Conjugado MALEIMIDA-NODA-GA

Las partículas obtenidas en el Ejemplo 1A (50 mg, aprox. 0,39 mmol de unidades de ácido) se dispersaron en agua (1 ml). Se añadieron (75  $\mu\text{l}$  de una solución 100 mg/ml en agua, 0,039 mmol) y NHS (45  $\mu\text{l}$  de una solución 100 mg/ml en agua, 0,039 mmol) y la mezcla se agitó (900 rpm) a 40 °C durante 2 h 30 min. Después de ese tiempo, se añadió cisteamina (30  $\mu\text{l}$  de una solución 100 mg/ml en agua, 0,039 mmol) y se agitó (900 rpm) a 40 °C durante 16 h.

55

La muestra obtenida de esta manera se filtró por centrifugación (10.000 rpm, 30 min) en un tubo VIVASPIN 20 (corte de 5 kDa) (previamente lavado con agua dos veces) y se lavó dos veces con agua (2 x 8 ml).

60

Las partículas en el filtro se recogieron con agua (2 ml) y se añadió *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (100 mg, 0,39 mmol) y apareció un precipitado blanco. Después, el pH se ajustó a pH 5-6 usando NaOH 5 M (una vez que el pH fue 5 el precipitado desapareció).

Se añadió MALEIMIDA-NODA-GA (30  $\mu\text{l}$  de una solución 100 mg/ml en DMSO, 0,0039 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 horas. Después de ese tiempo, se añadió bromoetanol (16,4  $\mu\text{l}$ , 0,195 mmol) y

65

se agitó a 40 °C durante 16 h. Finalmente el producto se dializó contra agua básica (pH 9) durante 2 días (corte de membrana: 1 kDa, 3 cambios de agua). Se secó por congelación para obtener 31 mg de una nanopartícula que tiene un tamaño de partícula de alrededor de 54 nm medido en DLS (en PBS A 25 °C).

## 5 EJEMPLO 6: Conjugado NH<sub>2</sub>-NODA-GA

Las partículas obtenidas en el Ejemplo 1B (60 mg) se dispersaron en H<sub>2</sub>O (1 ml) y el pH se ajustó a pH 8-8,5 mediante la adición de NaOH. Se añadió H<sub>2</sub>O hasta alcanzar un volumen final de 2 ml. Después, se añadieron 325 µl de una solución (100 mg/ml) de DMT- MM.HCl en H<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Después, se añadieron 235 µl de una solución (25 mg/ml) de NODA-GA-NH<sub>2</sub> en DMSO. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y se dializó contra agua a pH ~ 7 durante 3 días (3 cambios de agua al día) a 25 °C (MWCO: 3500 Da). Las nanopartículas funcionalizadas se almacenaron en solución (Volumen final 6,2 ml; c = 4 mg/ml). Las nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño de alrededor de 18 nm en DLS (en PBS medido a 25 °C).

## 15 EJEMPLO 7: Conjugado de oligonucleótido de doble cadena

Oligonucleótido de doble cadena:

SEQ ID NO. 1: 3'-TTAAAAAGAGGAAGAAGTCTA-5'  
SEQ ID NO. 2: 5'-TTTTTCTCCTTCTTCAGATTT-3'

Las partículas obtenidas en el Ejemplo 2 y el oligonucleótido de doble cadena como se define anteriormente que comprende 23 bases y que tiene un MW = 12829,6 (pedido a Microsynth) se disuelven separadamente en PBS hasta una concentración de 60 µM. Dividir el volumen final en 3 partes iguales, una parte es la solución del oligonucleótido de doble cadena y las otras dos son la solución de partículas. La solución de partículas (2/3 del volumen final) se pone en agitación a aproximadamente 600 rpm en un termobloque a 37 °C. Cuando la solución de partículas está en agitación se añade lentamente la solución de oligonucleótido de doble cadena y tan pronto como se añade la mezcla se somete a vórtex durante al menos 10 segundos. Después de eso la solución se deje reposar durante al menos 30 min antes de su uso. Los conjugados dispersables en agua obtenidos (para 20:1 N/P) fueron de alrededor de 20 nm de tamaño medido en DLS (en PBS a 25 °C).

## EJEMPLO 8: Conjugado Octreótido/Cian 5,5/PEG

A una solución de las partículas obtenidas en el Ejemplo 2 (30 mg, aprox. 0,077 mmol de unidades de ácido) en tampón MES a pH = 6 (1,5 ml), se añadió EDC (14,76 mg, 0,077 mmol). Después de 10 min, se añadió NHS (8,85 mg, 0,077 mmol) y la reacción se mantuvo en agitación a 40 °C durante 3 horas.

Después, se añadió octreótido (Sigma-Aldrich) (0,0077 mmol, 10,85 mg) en una solución de DMSO (108,5 µl de una solución 100 mg/ml) y el pH se ajustó a 7,4 usando NaOH. Después de 3 h de agitación a 40 °C, Se añadió Cy5.5 (0,0015 mmol, 1,01 mg) en agua (10 µl de una solución 100 mg/ml) y la mezcla se cubrió de la luz. Después de una hora, se incorporó PEG 750 a la reacción (0,03 mmol, 23,24 mg) y se dejó en agitación a 40 °C durante 16 h. La solución se dializó después en oscuridad (MWCO = 3500) contra agua pura hasta que la conductividad se redujera a alrededor de 1 µS/cm y el producto se secó por congelación para obtener un polvo verde (15,2 mg). El porcentaje de las moléculas incorporadas fue como sigue: -Octreótido 3,2 % en peso; Cy5.5 0,2 % en peso; PEG 750 1 % en moles.

## 3. ESTUDIO DE INTERNALIZACIÓN

### 3A. CITOMETRÍA DE FLUJO

#### (i) MÉTODO

Los estudios de captación de nanopartículas con citometría de flujo se llevaron a cabo usando células HepG2 (hepatocarcinoma humano). El aparato usado es un FACSCanto II de Bioscience con tres láseres: violeta (405 nm), azul (488 nm) y rojo (633 nm). Las HepG2 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10 % (FBS), 1000 U de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Cuando la confluencia celular fue alrededor del 70 %, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo. Se sembró un total de 300.000 células en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos.

Las nanopartículas marcadas con fluoresceína del Ejemplo 2 se añadieron en el medio de cultivo 24 h después en las concentraciones como se definen en la Tabla 1. Después de cultivarse durante 1, 2, 4, 8 y 24 horas las células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron y se estudiaron por citometría de flujo. La relación de captación se calculó a partir de la gráfica de representación de puntos de dispersión directa (FCS) frente a intensidad de

fluorescencia (PEA. Los datos se analizaron con el programa WinMDI.

**(ii) MUESTRA**

- 5 - Nanopartícula: Nanopartículas poliméricas monocatenarias basadas en poli(N,N-dimetilaminoetil) metacrilato (PDMAEMA) marcadas con fluoresceína del Ejemplo 2 de la presente invención.
- Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ): 10, 50 y 100.

**10 (iii) RESULTADOS**

La Tabla 1 muestra las velocidades de captación de las nanopartículas de la presente invención a varias concentraciones y tiempos de exposición.

15

Tabla 1

VELOCIDAD DE CAPTACIÓN	Tiempo (h)				
	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	1	2	4	8
10	8,69 $\pm$ 1,14	21,27 $\pm$ 4,43	45,22 $\pm$ 4,69	78,44 $\pm$ 3,89	98,73 $\pm$ 0,17
50	25,07 $\pm$ 13,09	48,58 $\pm$ 24,26	78,51 $\pm$ 14,93	97,73 $\pm$ 1,17	99,92 $\pm$ 0,04
100	38,08 $\pm$ 21,30	60,60 $\pm$ 22,54	89,79 $\pm$ 6,66	99,49 $\pm$ 0,30	99,93 $\pm$ 0,01

- Como se muestra en las velocidades de captación de la Tabla 1, hay un aumento proporcional en la absorción de las nanopartículas de la presente invención dentro de las células ensayadas, incluso en las que se usan altas concentraciones de nanopartículas (es decir, 100  $\mu\text{g/ml}$ ). En particular, después de 4 h de incubación, el 90 % de los 20 100  $\mu\text{g/ml}$  de las nanopartículas de la invención se absorbió dentro de las células y después de 8 h todas las nanopartículas se absorbieron por las células. Estos resultados son una indicación de que las nanopartículas de la invención no tienen una toxicidad significativa y, por lo tanto, las nanopartículas de la presente invención son apropiadas para su uso en el campo de la biomedicina.

**25 3B. MICROSCOPIA CONFOCAL**

**(i) MÉTODO**

- Los estudios de captación de nanopartículas con microscopia confocal se llevaron a cabo usando células HepG2 (hepatocarcinoma humano). El aparato usado para formar la imagen de las células HepG2 después de la incubación con nanopartículas marcadas con fluoresceína es CLSM (Carl-Zeiss LSM 10 META). Se sembró un total de 100.000 células en una placa de cultivo de 3,5 cm que contiene un cubreobjetos, que se colocó en una placa de cultivo de 3,5 cm. Después de 24 h, las nanopartículas fluorescentemente marcadas con fluoresceína como se define en el Ejemplo 2 se añadieron al medio de cultivo con una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Después de la incubación 35 durante otras 4 horas el medio de cultivo se retiró y las células se enjuagaron tres veces con PBS esterilizado. Las células se fijaron posteriormente con solución de formaldehído al 3,7 % en PBS durante 30 min y se enjuagaron de nuevo. Por último, las células en estos cubreobjetos se observaron en CLSM empleando un objetivo de inmersión de aceite 63 x con una abertura de poro de 0,75  $\mu\text{m}$ .

**40 (ii) MUESTRA**

- Nanopartículas: Nanopartículas poliméricas monocatenarias basadas en poli(N,N-dimetilaminoetil) metacrilato (PDMAEMA) marcadas con fluoresceína del Ejemplo 2 de la presente invención.
- 45 - Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ): 50.

**(iii) RESULTADOS**

- Las imágenes obtenidas por microscopía confocal confirmaron que las nanopartículas de la presente invención 50 fueron capaces de internalizarse dentro de las células ensayadas. Fue posible visualizar las nanopartículas marcadas con fluoresceína dentro de las células ensayadas como puntos verdes.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

55 <110> FUNDACIÓN CIDETEC

<120> Un procedimiento para preparar nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua

<130> P3103PC00  
5 <140> EP14382433.2  
<141> 03-11-2014  
<160> 2  
10 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 1  
20 atctgaagaa ggagaaaaat t 21  
<210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 2  
tttttctcct tcttcagatt t 21

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua, que comprende reticular un polímero que tiene una solubilidad igual a o más alta que 100 mg por litro de agua y una cantidad de grupos reactivos complementarios comprendida del 5 al 60 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica; con un agente de reticulado homobifuncional que tiene grupos reticulables; mediante
- 5 (a) la adición de una solución acuosa del polímero a una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del polímero una concentración de los grupos reticulables del polímero en la solución del agente de reticulado homobifuncional comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar; o, como alternativa,
- 10 (a') la adición de una solución acuosa del agente de reticulado homobifuncional a una solución acuosa del polímero a una velocidad de adición que permita tener durante la adición del agente de reticulado homobifuncional una concentración del agente de reticulado homobifuncional en la solución del polímero comprendida de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  molar;
- 15 a una temperatura comprendida de 20 a 25 °C en ausencia de un catalizador; en la que la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua tiene un tamaño de partícula comprendido de 3 a 30 nm y una polidispersión de la partícula igual a la polidispersión de polímero  $\pm 20$  %;
- 20 opcionalmente, el procedimiento comprende, además, una etapa adicional de purificación de la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua y opcionalmente, el procedimiento comprende, además, una etapa adicional de secado de la nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua.
- 25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nanopartícula tiene un porcentaje de reticulación intra-molecular comprendido del 3 al 45 % en moles de la cantidad total de unidades de monómero presentes en la cadena polimérica.
- 30 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el procedimiento comprende, además, una etapa previa de someter un polímero con grupos reactivos complementarios protegidos a una reacción de desprotección para producir el polímero de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-O-NH_2$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-CHO$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH comprendido desde 5 hasta 7; o, como alternativa,, en el que el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-CHO$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-O-NH_2$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH comprendido desde 5 hasta 7.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-O-C(=O)-C(=CH_2)-CH_3$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-SH$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH igual a o más alto que 8; o, como alternativa,
- 45 en el que el grupo reactivo complementario del polímero es un grupo  $-SH$ , el grupo reticulable del agente de reticulado homobifuncional es un grupo  $-O-C(=O)-C(=CH_2)-CH_3$  y el procedimiento se lleva a cabo a un pH igual a o más alto que 8.
- 50 6. Una nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua, obtenible mediante el procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un conjugado dispersable en agua, que comprende las nanopartículas poliméricas monocatenarias dispersables en agua como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y al menos un agente activo.
- 55 8. El conjugado dispersable en agua de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el agente activo se selecciona de un principio activo y un agente de formación de imagen.
9. El conjugado dispersable en agua de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el agente activo es un agente de formación de imagen.
- 60 10. Una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende el conjugado dispersable en agua como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéutica o diagnósticamente aceptables apropiados.
- 65 11. Un kit que comprende el conjugado dispersable en agua como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9.

12. Uso del conjugado dispersable en agua de acuerdo con la reivindicación 9, como un agente de formación de imagen en un ensayo de detección que comprende: (a) poner en contacto el conjugado dispersable en agua que tiene un agente activo capaz de unirse específicamente a un agente diana con el agente diana presente en una muestra a ensayarse durante un período de tiempo apropiado que permita la unión; y, opcionalmente, (b) identificar y/o cuantificar el agente diana.
13. El conjugado dispersable en agua de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso como un agente de formación de imagen en un ensayo de detección que comprende: (a) poner en contacto el conjugado dispersable en agua que tiene un agente activo capaz de unirse específicamente a un agente diana con el agente diana presente en un sujeto durante un período de tiempo apropiado para permitir circular el conjugado dispersable en agua al sitio diana; y, opcionalmente, (b) identificar y/o cuantificar el agente diana.
14. El conjugado dispersable en agua de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 7-9, para su uso en terapia cuando el agente activo es un principio activo.
15. El conjugado dispersable en agua de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en diagnósticos.
16. La nanopartícula polimérica monocatenaria dispersable en agua como se define en la reivindicación 6 para su uso como un vehículo para un principio activo en terapia.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden  
5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 14382433 A [0122]