

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 777**

51 Int. Cl.:

A61K 49/12 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/EP2012/068541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12759487 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2750716**

54 Título: **Nanoestructuras que comprenden manganeso**

30 Prioridad:

23.09.2011 EP 11182528

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

22.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AXELSSON, OSKAR;
PETORAL JR., RODRIGO M.;
EK, FREDRIK y
LAURITZSON, PETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 774 777 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 que comprenden manganeso

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a nanoestructuras poliméricas quelantes que incorporan iones de manganeso (II) paramagnéticos, así como a métodos para preparar dichas nanoestructuras, y a la utilización de las nanoestructuras para visualizar u obtener imágenes de material biológico.

10

Antecedentes

La obtención de imágenes de resonancia magnética, IRM, es una modalidad de obtención de imágenes médicas en las que se visualizan los tejidos blandos del cuerpo mediante la utilización de la magnetización de los núcleos atómicos. Existen muchas aplicaciones clínicas de la técnica, tales como la obtención de imágenes del sistema nervioso, sistema vascular e imágenes de tumores.

15

Normalmente, se obtienen imágenes de los abundantes núcleos de hidrógeno de las moléculas de agua del cuerpo. La intensidad de la señal de IRM depende de la naturaleza del núcleo, su abundancia y su entorno magnético local. Estos factores afectan a los tiempos de relajación longitudinal (T1, constante de tiempo de remagnetización) y transversal (T2, constante de tiempo de caída de la señal), que a su vez afectan a la intensidad de la señal. De esta manera, la fuente del contraste en IRM es una combinación de la concentración local de núcleos y su entorno magnético. Pueden potenciarse diversas características morfológicas mediante el destacado del contraste T1 o el contraste T2. El entorno magnético local puede modificarse con la presencia de agentes de contraste y, dependiendo de sus propiedades magnéticas, la señal puede incrementarse (contraste positivo) o reducirse (contraste negativo). Los agentes de contraste positivo con frecuencia resultan preferentes debido a que la interpretación de las imágenes se vuelve más simple, en las que más brillo indica la presencia de más agente de contraste. El principio de los agentes de contraste positivo es un acortamiento del tiempo de relajación longitudinal, T1, que describe la rapidez con que las moléculas de agua se remagnetizan después de cada barrido. En presencia de un agente de contraste positivo, puede recogerse más señal en un periodo de tiempo dado.

20

25

30

Además, el efecto de un compuesto sobre T1 viene dado por la relaxividad, de manera que una relaxividad elevada proporciona una potenciación más fuerte de la señal. La relaxividad (r) es dependiente de la frecuencia de una manera dependiente de la estructura, lo que complica la comparación de los datos procedentes de la literatura de diferentes fuentes. Los escáners de IRM clínicos habitualmente presentan un campo magnético de 1,5 o 3 Tesla, por lo que los presentes inventores han medido las relaxividades y son de 1,91 T, correspondientes a una frecuencia de resonancia de los protones de 81,3 MHz, que es un compromiso razonable. Las mediciones también se llevaron a cabo a otras frecuencias, tales como 60 MHz. La relaxividad de los agentes de contraste a base de gadolinio disponibles comercialmente es próxima a 4 /mMGd/s en los campos clínicamente relevantes.

35

40

El mercado se encuentra dominado actualmente por quelatos de gadolinio solubles en agua. Debido a sus pequeñas dimensiones físicas (<1 nm), se distribuyen rápidamente en el espacio extracelular (sangre más el espacio intersticial, entre las células de los tejidos), limitando en cierta medida el efecto de contraste. Un problema con la utilización *in vivo* de los iones metálicos paramagnéticos, tales como el gadolinio, es su toxicidad, y los quelatos en los agentes de contraste actualmente comercializados resuelven este problema con bastante éxito. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que los quelatos liberan pequeñas cantidades de gadolinio, que se vuelven problemáticos en pacientes con una función renal nula o muy defectuosa, en los que se ha encontrado un grave efecto secundario denominado fibrosis sistémica nefrogénica, FSN (Grobner et al., *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 21,1104, 2006; Sieber et al. *Invest. Radiol.* 43, 65, 2008).

45

50

El problema de la FSN lleva a la cuestión de si utilizar una alternativa al gadolinio como agente de contraste de acortamiento de T1; el mangafodipir es un quelato de manganeso (II) que se ha utilizado como agente de contraste (Elizondo G. et al., *Radiology*, 178, 73, 1991). Presenta una estabilidad moderada *in vivo* y gran parte del manganeso se libera en forma de iones después de la inyección y se acumula en el hígado, proporcionando un buen contraste entre tejido sano y canceroso. La liberación de cantidades moderadas de manganeso no es un gran problema, ya que es un elemento traza esencial para los organismos vivos y existen mecanismos para eliminarlo. El mangafodipir actualmente no se comercializa por su bajo volumen de ventas. Los iones manganeso son menos magnéticos que el gadolinio y la mayoría de compuestos de manganeso presentan relaxividades bajas, mostrando algunos ejemplos notables (Pan D. et al., *WIRES Nanomed Nanobiotechnol*, 3, 162, 2011) el potencial de los agentes de contraste a base de manganeso. Si las propiedades beneficiosas pudiesen incorporarse en una estructura más químicamente accesible, de tamaño adecuado y más bioinerte, se obtendría una clara ventaja. En la presente invención se da a conocer un grupo de materiales con el que se consigue lo anterior.

55

60

Existen varios agentes de contraste a base de nanopartículas conocidos de la técnica. Algunos de ellos, basados en óxido de hierro, se han utilizado como agentes de contraste específicamente hepáticos, pero ya no se encuentran en el mercado debido a los bajos volúmenes de ventas. Se encuentra disponible una enorme literatura referida a la

65

utilización experimental de dichas partículas (p.ej., Bulte J. W. M. y Modo M. M. J., eds., "Nanoparticles in Biomedical Imaging", Springer, 2008). Aunque la presente invención se refiere a estructuras nanométricas, no son del tipo núcleo-cubierta que habitualmente implica el término, sino que se basan en un polímero altamente entrecruzado.

5 Existe una enorme literatura sobre materiales poliméricos que portan grupos quelantes de iones metálicos paramagnéticos para la utilización en IRM. En general, se consigue un incremento robusto de la relaxividad, aunque no tan elevado como se indica en la presente invención. Según nuestros conocimientos, nada de dicha literatura da a conocer estructuras poliméricas que porten los bisfosfonatos de la presente invención.

10 Los ejemplos de la literatura siguientes son ejemplos de publicaciones anteriores relevantes, que en modo alguno deben interpretarse como comprendidas en el alcance de la presente invención.

En Rongved P., Carbohydr. Res 214, 315, 1991, se describe una serie de materiales poliméricos con un esqueleto de carbohidrato y grupos quelantes unidos. Los materiales más próximos a la presente invención son el dextrán-fosfato de gadolinio (III), que presenta una relaxividad de 16/mMGd/s a 20 MHz. Sustancialmente inferiores que para los materiales dados a conocer en la presente invención. Dicho material es de estabilidad desconocida. El fósforo se incorpora en los grupos fosfato unidos como ésteres de fosfato, a diferencia de los fosfonatos de la presente invención. De esta manera, el material se encuentra fuera del alcance de la presente invención.

20 Rongved también da a conocer un conjugado de manganeso (II)-EDTA-sucrosa-epiclorohidrina con una relaxividad de 19,2/mMMn/s y un conjugado de manganeso (II)-EDTA-aminoetil-dextrano con una relaxividad de 12,8/mMMn/s. Ambos valores son sustancialmente inferiores a los de los materiales de la presente invención, especialmente porque se midieron a una baja frecuencia, de 20 MHz. De esta manera, el material se encuentra fuera del alcance de la presente invención.

25 En el documento nº WO2010/135167 se describe un material bisfosfonato basado en poliestireno. No se han intentado producir nanoestructura, sino por el contrario materiales voluminosos.

30 La literatura que describe la utilización de dendrímeros con una estructura química (al contrario que las estructuras basadas en polímeros de la presente invención) y peso molecular específicos es muy grande.

El ejemplo mejor conocido de un dendrímero utilizado como agente de contraste de RM es gadómero-17 (Turetschek, K. et al., J. Magn. Reson. Imaging 20, 138, 2004) que, sin embargo, nunca ha alcanzado la práctica clínica. Este enfoque de las estructuras nanodimensionadas adolece de una síntesis química muy cara. En parte debido a las muchas etapas químicas y en parte por la dificultad de purificación e identificación de las muchas posibles impurezas. Además, relaxividades tan altas como las encontradas por los inventores de la presente invención no han sido informadas, según nuestros conocimientos, en el presente campo.

40 El razonamiento que subyace a los buenos resultados de la utilización de agentes macromoleculares como agentes de contraste de IRM con altas sensibilidad y selectividad para el diagnóstico tumoral es el efecto de permeación y retención potenciadas (PRP), también denominado reconocimiento tumoral pasivo. Se basa en el hecho de que los capilares de los tejidos sanos son virtualmente impermeables a moléculas de más de 3-4 nm, mientras que los capilares del tejido tumoral en crecimiento rápido son mucho más permeables. Es concebible que el efecto PRP sea la base de las propiedades favorables de obtención de imágenes tumorales de la presente invención.

45 Existen varios quelatos monoméricos de gadolinio que contienen fosfonato conocidos de la técnica, mientras que las combinaciones de manganeso-fósforo son menos comunes, aunque no raras (Pan D. et al., WIREs Nanomed Nanobiotechnol 3, 162, 2011). No son en modo alguno notables en sus propiedades de IRM y las relaxividades informadas son moderadas. Se encuentra un ejemplo de uno que porta un bisfosfonato en Vitha T. et al., Dalton Transactions p 3204, 2009.

50 Mingqian Tan et al. Bioconjugate Chemistry, vol. 22, nº 5, páginas 931 a 937, dan a conocer una nanoestructura que comprende quelatos Mn (II)-DOTA o Mn(II)-NOTA conjugados con dendrímeros de lisina con un núcleo silesquioxano para la utilización como agente de contraste de IRM.

55 Descripción resumida de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines informativos únicamente.

60 El primer aspecto de la presente exposición se refiere a nanoestructuras que comprenden iones de manganeso incorporados en un marco o andamiaje polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato germinales $-P=O(OR^1)(OR^2)-$ que, en el contexto de la presente invención, son iguales a $-R^4R^3C(P=O(OR^1)(OR^2))_2-$ en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de una carga negativa, H, alquilo y arilo, y en el que por lo menos uno de R^3 y R^4 es un grupo conectado con el marco polimérico, o que forma parte del marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R^3 y R^4 sea dicho grupo conectado, siendo el otro de R^3 y R^4 es un grupo que

es capaz de conectarse con el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, y en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano, o en el que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

La presente exposición se refiere además a nanoestructuras que comprenden iones de manganeso paramagnéticos, incorporados en estructuras nanodimensionadas basadas en un marco o andamiaje polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales -P=O(OR¹)(OR²) - que en el contexto de la presente invención son iguales a -R⁴R³C(P=O(OR¹)(OR²))₂, tal como se ha indicado anteriormente, en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente de una carga negativa, H, alquilo y arilo, y en el que por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, o que forma parte del marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que solo uno de R³ y R⁴ sea dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, y en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano, o en el que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

Aunque el término “nanodimensionado” se interpreta de manera general como cubriendo cualquier cosa más pequeña de 100 nm, el centro de atención de la presente invención son entidades de estructuras altamente ramificadas o entrecruzadas de una forma aproximadamente globular y un tamaño medio (diámetro hidrodinámico) de 1 a 100 nm, o en algunas formas de realización, de 2 a 50 nm, 3 a 10 nm o 3 a 7 nm.

El segundo aspecto de la presente exposición se refiere a una composición farmacéutica, que comprende dichas nanoestructuras, en particular aquellas nanoestructuras que comprenden iones de manganeso paramagnéticos.

El tercer aspecto de la presente exposición se refiere a la utilización de dichas nanoestructuras, en particular aquellas que comprenden iones de manganeso paramagnéticos, como agentes de contraste de utilidad clínica, en particular la utilización como agentes de contraste para IRM.

El cuarto aspecto de la presente exposición se refiere a métodos para producir dichas nanoestructuras, tanto los que comprenden iones de manganeso como los que no comprenden tales iones.

El quinto aspecto de la presente exposición se refiere a una nanoestructura que comprende un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en la que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como -R³R⁴C(P=O(OR¹)(OR²))₂, en el que: R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R³ y R⁴ sea dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectar el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, y en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano.

Algunas ventajas de las nanoestructuras dadas a conocer en la presente memoria respecto a la técnica anterior son la combinación de una relaxividad un orden de magnitud superior al de los materiales actualmente en el mercado, en combinación con un tamaño adecuado para la acumulación selectiva en el tejido tumoral y una buena biotolerabilidad. Lo anterior convierte a las nanoestructuras de la presente invención, en particular las nanoestructuras que comprenden iones de manganeso paramagnéticos, en adecuadas para la utilización como un agente de contraste para IRM y en particular para la obtención de imágenes tumorales.

Además, la utilización de manganeso en lugar de gadolinio como el componente paramagnético evita los problemas de toxicidad relacionados con el gadolinio.

La utilización de manganeso abundante en lugar de relativamente raro gadolinio también presenta ventajas de costes en la producción del material.

Realizaciones específicas

1. Una nanoestructura que comprende iones de manganeso incorporados en un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en el que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como:



(que es igual a -R⁴R³C(P=O(OR¹)(OR²))₂)

en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y en el que por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, con la condición

de que, en el caso de que únicamente uno de R³ y R⁴ sea dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-

5 oxisilano, o en el que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

2. Una nanoestructura según la realización 1, en la que los iones de manganeso son iones de manganeso (II).

3. Una nanoestructura según la realización 1 o 2, en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y metilo.

4. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que el grupo conectado con el marco polimérico, y/o el grupo capaz de conectarse con el marco polimérico o el residuo de dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en:

(CH₂)_nSi(R^x)₃ en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O⁻ o O-, en el que - denota un enlace con el marco polimérico, y en el que n es 1 a 5,

(CH₂)_nCOR^y en el que R^y es O-, NH₂, NHR^z, NR^z₂, o un enlace con el marco polimérico, en el que R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y en el que n es 1 a 5, y

- denota un enlace con el marco polimérico, y

(CH₂)_nSO₂R^y en el que R^y es O-, NH₂, NHR^z, NR^z₂, o un enlace con el marco polimérico; R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y n es 1 a 5, y

- denota un enlace con el marco polimérico.

5. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 4, que comprende átomos de silicio.

6. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que R³ y/o R⁴ se seleccionan del grupo que consiste en -(CH₂)_n-Si(R^x)₃, en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O- o O-, en el que - denota un enlace con el marco polimérico y en el que n es 1 a 5.

7. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 2 a 50 nm.

8. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 3 a 10 nm.

9. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 3 a 7 nm.

10. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 10 a 50 nm.

11. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 7 o 10, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 10 a 20 nm.

12. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en la que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano.

13. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en la que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

14. Una nanoestructura según la realización 13, en la que la proporción molar P/N es 0,1 a 3.

15. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 14, en la que la proporción molar P/Mn es de 7 a 20.

16. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 5 o 6 a 12 o 14 a 15, en caso de ser dependiente de la realización 5, en la que la proporción molar Si/Mn es de 5 a 20.

17. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 5 o 6 a 16, en caso de ser dependiente de la realización 5, en la que la proporción molar Si/P es de 0,7 a 1,3.

18. Una nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que los iones de manganeso están coordinados con los grupos fosfonato.

19. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en la que dicha nanoestructura comprende además grupos hidrofílicos unidos a las partes externas.

20. Una nanoestructura según la realización 19, en la que los grupos hidrofílicos comprenden fracciones - (CH₂CH₂O)_nCH₃ en las que n=4 a 50.

21. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 20, en la que el marco polimérico comprende residuos monómeros de la estructura genérica:

{(X^{7a}O)(X^{7b}O)PO}₂-(C){(CH₂)_nSi(OX^{7c})(OX^{7d})(OX^{7e})}{(CH₂)_oSi(OX^{7c})(OX^{7d})(OX^{7e})}

en la que: X^{7a}, X^{7b}, X^{7c}, X^{7d}, X^{7e} se seleccionan independientemente de, alquilo C₁₋₈ y bencilo, y n y o se seleccionan independientemente de 1 a 5.

22. Una composición que comprende una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 21.

23. Una composición farmacéutica que comprende una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 21.

24. Utilización de una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 21 o composición según la realización 22 o 23 como agente de contraste de IRM.

25. Un método para obtener una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 21, que comprende:

obtener nanoestructuras de un marco polimérico que comprende bisfosfonatos geminales, y poner en contacto dichas nanoestructuras con iones de manganeso.

26. Un método según la realización 25, que comprende además una etapa en la que las nanoestructuras se purifican mediante ultrafiltración.

5 27. Un método para obtener una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 13 o 14 a 21 en caso de ser dependiente de la realización 13, en el que se injerta un bisfosfonato geminal en un marco polimérico derivado de polietilenimina que posteriormente se carga con iones de manganeso.

28. Un método para obtener una nanopartícula según cualquiera de las realizaciones 12 o 13 a 21 en caso de ser dependiente de la realización 12, en el que dichos silanos se proporcionan en una mezcla de solventes que contiene agua y otros u otros solventes que son miscibles con agua.

10 29. Un producto obtenible mediante un método según cualquiera de las realizaciones 25 a 28.

30. Una nanoestructura que comprende un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en los que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan independientemente uno de otro como



(que es igual a $-R^4R^3C(P=O(OR^1)(OR^2))_2$)

20 en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y por lo menos uno de R^3 y R^4 es un grupo conectado con el marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R^3 y R^4 sea dicho grupo conectado, el otro de R^3 y R^4 es un grupo capaz de conectar el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR^5 y R^5 , en el que R^5 es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, y en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano.

25 31. Una nanoestructura según la realización 30, en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y metilo.

32. Una nanoestructura según la realización 30 o 31, en la que el grupo conectado con el marco polimérico, y/o el grupo capaz de conectarse con el marco polimérico o el residuo de dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en:

30 $(CH_2)_nSi(R^x)_3$ en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O^- o O^- , en el que - denota un enlace con el marco polimérico, y en el que n es 1 a 5,
 $(CH_2)_nCOR^y$ en el que R^y es O^- , NH_2 , NHR^z , NR^z_2 , o un enlace con el marco polimérico; R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y n es 1 a 5, y - denota un enlace con el marco polimérico, y
 35 $(CH_2)_nSO_2R^y$ en el que R^y es O^- , NH_2 , NHR^z , NR^z_2 , o un enlace con el marco polimérico; R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y n es 1 a 5, y - denota un enlace con el marco polimérico.

33. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 32, que comprende átomos de silicio.

40 34. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 33, en la que R^3 y/o R^4 se seleccionan del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-Si(R^x)_3$, en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O^- o O^- , en el que - denota un enlace con el marco polimérico y en el que n es 1 a 5.

35 35. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 34, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 2 a 50 nm.

45 36. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 35, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 3 a 10 nm.

37. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 36, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 3 a 7 nm.

38. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 35, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 10 a 50 nm.

50 39. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 35 o 38, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 10 a 20 nm.

40. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 39, en la que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano.

41. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 40, en la que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

55 42. Una nanoestructura según la realización 41, en la que la proporción molar P/N es 0,1 a 3.

43. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 33 o 34 a 42, en caso de ser dependiente de la realización 33, en la que la proporción molar Si/P es de 0,7 a 1,3.

44. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 43, en la que dicha nanoestructura comprende además grupos hidrofílicos unidos a las partes externas.

60 45. Una nanoestructura según la realización 44, en la que los grupos hidrofílicos comprenden fracciones - $(CH_2CH_2O)_nCH_3$ en las que n=4 a 50.

46. Una nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 30 a 45, en la que el marco polimérico comprende residuos monómeros de la estructura genérica:



X^{7a} , X^{7b} , X^{7c} , X^{7d} , X^{7e} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_{1-8} y bencilo, y n y o se seleccionan independientemente de 1 a 5.

Definición de términos

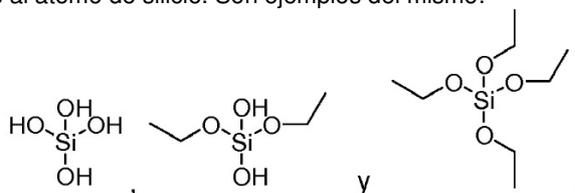
- 5 El término “nanoestructura” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una entidad con un diámetro total de 1 a 100 nm de forma esencialmente globular, es decir, excluyendo escamas, barras, tubos y cintas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término excluye las estructuras con frecuencia denominadas “nanopartículas de núcleo-cubierta” o simplemente “nanopartículas”, que presentan un núcleo mineral o metálico y un recubrimiento orgánico.
- 10 La expresión “marco polimérico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo unido covalentemente de átomos que forman una estructura de tipo árbol multiramificado o una estructura de red con múltiples enlaces cruzados. Los marcos poliméricos se forman por el enlace de monómeros y/o oligómeros y/o entrecruzantes mediante enlaces covalentes. Pueden encontrarse monómeros típicos en libros de textos de química de polímeros, tales como J. R. Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995. Son algunos ejemplos de monómeros, 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, $H_2N-(CH_2)_n-COOH$, en el que n es 1 a 10, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, N-vinilpirrolidona y precursores de silicona como $(CH_3COO)_2Si(CH_3)_2$. Algunos ejemplos de polímeros son polímeros formados de parejas correspondientes de monómeros como ácido tereftálico + 1,4-diamino-benceno, ácido tereftálico + etilenglicol y $HCOO-(CH_2)_nCOOH + H_2N-(CH_2)_m-NH_2$, en el que n y m son independientemente 1 a 10. Los oligómeros con 2 a 10 unidades de monómero unidas pueden utilizarse como precursores. Son algunos ejemplos de oligómeros diferentes de los grupos unidos de los monómeros anteriormente indicados, los silanos cíclicos o policíclicos, tales como hexametildiclotrisiloxano, 2,4,6,8-tetrametilclotetrasiloxano y decametildiclopentasiloxano. Pueden encontrarse entrecruzantes típicos en libros de textos de química de polímeros, tales como J. R. Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995.
- 25 Son algunos ejemplos de entrecruzantes, N,N'-metilén-bis(acrilamida), epiclohidrina, divinilbenceno, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 1,3-fenilén-diisocianato, dianhídrido de ácido 3,3'-bifeniltetracarboxílico, éter 1,4-butanodioldivinílico, 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. El marco polimérico de la invención comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano o se deriva de polietilenimina.
- Dicho marco polimérico constituye el esqueleto de la nanoestructura. El experto en la materia conoce que la naturaleza aleatoria del procedimiento de polimerización causa que los materiales sean mezclas de muchos patrones de ramificación, posiciones de entrecruzamiento y pesos moleculares similares, aunque no idénticos.
- 35 La expresión “grupo bisfosfonato geminal” se refiere a dos grupos fosfonato separados por un átomo de carbono, es decir, los grupos fosfonato se unen al mismo carbono. Los compuestos que comprenden dicho grupo bisfosfonato geminal con frecuencia se denominan 1,1-bisfosfonatos (o 1,1-difosfonatos). Los grupos fosfonato en el grupo bisfosfonato geminal pueden estar sustituidos. Cada uno de los grupos fosfonato presenta la fórmula $-P=O(OR^1)(OR^2)$, en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo.
- La expresión “grupo conectado con el marco polimérico” se refiere a un grupo químico en el que un enlace covalente sustituye formalmente un átomo de hidrógeno del marco polimérico. Los grupos químicos comprendidos por dicha definición son generalmente residuos lineales cortos de hidrocarburos, éteres, amidas o ésteres. Son algunos ejemplos típicos, $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nCO-$, $-(CH_2)_nCOO-$, $-(CH_2)_nCONH-$ y $-(CH_2)_nSi(O-)_3$. En el presente contexto, el término “corto” significa que n es 1 a 8.
- 45 La expresión “grupo que forma parte del marco polimérico” se refiere a una situación en que dos grupos fosfonato se encuentran en el mismo átomo de carbono del marco polimérico.
- 50 La expresión “grupo capaz de conectarse con el marco polimérico” se refiere a precursores de los grupos anteriormente indicados a los que se hace referencia como conectados al marco polimérico. Algunos ejemplos son $-(CH_2)_nOH$, $-(CH_2)_nBr$, $-(CH_2)_nCOCl-$, $-(CH_2)_nCOCH_3$, $-(CH_2)_nCOCH_2CH_3$, $-(CH_2)_nCOO-$, $-(CH_2)_nCONH_2$ y $(CH_2)_nSi(OEt)_3$.
- 55 El término “bioinerte” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material que es biocompatible, es decir, inocuo para un organismo vivo y simultáneamente estable a la degradación *in vivo*.
- 60 El término “DLS”, por sus siglas en inglés, tal como se utiliza en la presente memoria, es un acrónimo de dispersión dinámica de la luz, un método de dimensionado de partículas, y también puede hacerse referencia al mismo como “espectroscopía de correlación fotónica” o “dispersión de la luz cuasi-elástica”. Los tamaños de DLS proporcionados tal como se indica en el texto y en las reivindicaciones, si no se indica otra cosa, se refieren a la posición del máximo del pico de volumen medio para una muestra medida a 25°C en solución acuosa neutra con una fuerza iónica correspondiente a NaCl 150 mM.
- 65 El término “globular” tal como se utiliza en la presente memoria pretende describir nanoestructuras con una forma en

la que el eje menor no es más de la mitad del eje mayor, es decir, el eje más largo a través del centro (centro de gravedad) de la estructura no es más de dos veces la longitud del eje más corto a través del mismo punto.

5 La expresión "residuo orgánico hidrofílico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un residuo orgánico que fomenta la solubilidad en solventes acuosos y en la presente invención está implícito que son bioinertes, que excluye polipéptidos y carbohidratos complejos. Son ejemplos de residuos orgánicos hidrofílicos adecuados, cualquier grupo que contiene carbono con una composición molecular $(aO+bN)/(cC+dS+eSi+fP) > 0,3$, en la que a, b, c, d, e y f son el porcentaje molar de oxígeno (O), nitrógeno (N), carbono (C), azufre (S), silicio (Si) y fósforo (P), respectivamente.

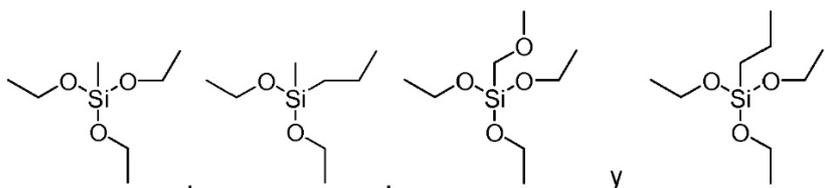
10 La expresión "silano activado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un silano del tipo siguiente $R_nSi(X)_{4-n}$, en el que X es un grupo alcoxi, grupo ariloxi, un halógeno, un grupo dialquilamino, un heterociclo que contiene nitrógeno o un grupo aciloxi.

15 El término "oxisilano" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier compuesto orgánico con uno o más átomos de oxígeno unidos al átomo de silicio. Son ejemplos del mismo:



20 El término "organosilano" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a compuestos orgánicos que contienen uno o más enlaces carbono-silicio.

El término "organo-oxisilano" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y uno o más átomos de oxígeno unidos al átomo de silicio. Son ejemplos del mismo:



25 El término "hidrocarburo" y la expresión "cadena de hidrocarburo" tal como se utilizan en la presente memoria, denotan un residuo orgánico que consiste en hidrógeno y carbono. El hidrocarburo puede ser totalmente saturado o puede comprender una o más insaturaciones. El hidrocarburo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 50.

30 El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada totalmente saturada (sin dobles o triples enlaces). El grupo alquilo puede presentar en el presente texto 1 a 15 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede denominarse "alquilo C₁₋₁₅" o denominaciones similares. Entre los grupos alquilo típicos se incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo y hexilo.

35 La expresión "alquilo inferior" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono.

40 La expresión "alcohol inferior" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un alcohol con 1 a 8 átomos de carbono.

45 En donde se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, un intervalo numérico tal como "1 a 8" o "1-8" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; p.ej., "1 a 8 átomos de carbono" significa 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. Existen, sin embargo, algunas excepciones que resultarán evidentes para el experto en la materia. En particular, en cualquier caso en que se proporcione un intervalo en la presente memoria, tal como la proporción molar P/N o la proporción molar 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 también incluye todos los números decimales comprendidos dentro del intervalo.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alcoxi" se refiere a la fórmula -OR en la que R es un alquilo C₁-

s, p.ej., metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi (isopropoxi), n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, amiloxi e isoamiloxi. Un alcoxi puede estar sustituido opcionalmente.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ariloxi" se refiere a RO-, en la que R es un arilo, en el que "arilo" se refiere a un anillo carbocíclico (todo carbonos) o dos o más anillos fusionados (anillos que comparten dos átomos de carbono contiguos) que presentan un sistema electrónico pi totalmente deslocalizado. El anillo arilo puede ser un anillo de 4 a 20 elementos. Entre los ejemplos de grupos arilo se incluyen benceno, naftaleno y azuleno. Un grupo arilo puede estar sustituido opcionalmente, p.ej., fenoxi, naftaleniloxi, azuleniloxi, antraceniloxi, naftalenililio y fenililio. Un ariloxi puede estar sustituido opcionalmente.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "acilo" se refiere a un grupo carbonilo, es decir, -C(=O)-.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aciloxi" se refiere a un átomo de oxígeno conectado mediante un grupo carbonilo, es decir, -C(=O)-O-.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "heterociclo" se refiere a un anillo de 3 a 18 elementos estable que consiste en átomos de carbono y entre uno y cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclo puede ser monocíclico, bicíclico o tricíclico.

20 La expresión "base fuerte" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere en el presente contexto a bases que son más fuertes que hidróxido y no compatibles con medios acuosos.

25 La expresión "diámetro hidrodinámico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al diámetro de la esfera dura hipotética que se difunde a la misma velocidad que la partícula. La hidratación y la forma se encuentran incluidos en el comportamiento de la esfera. El término se conoce además como "diámetro de Stokes" o "diámetro de Stokes-Einstein".

30 El término "conjugado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una entidad molecular que es un marcador de fluorescencia, pigmento, etiqueta de espín, marcador radioactivo, ligando a un receptor biológico, quelato, inhibidor enzimático, sustrato enzimático, anticuerpo o estructura relacionada con anticuerpo. Ver, p.ej., "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson, segunda edición, Elsevier 2008, ISBN 978-0-12-370501-3 para antecedentes de la materia.

35 Las expresiones "asa para conjugación" y "punto de unión" se refieren ambas a una molécula bifuncional que puede unirse, o ser incorporada en, la red polimérica, aunque dejando un grupo reactivo que puede unirse a un conjugado, tal como se ha definido anteriormente. Un ejemplo típico, aunque no exclusivo, sería (EtO)₃SiCH₂CH₂CH₂NH₂.

El acrónimo TEOS representa tetraetoxisilano.

40 El acrónimo DCM representa diclorometano.

La abreviatura "bisbis" representa 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano, el producto del ejemplo 1b.

45 Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a iones de manganeso paramagnéticos incorporados en estructuras nanodimensionadas (nanoestructuras) basadas en un marco o andamiaje polimérico que comprende una multitud de grupos fosfonato, -P=O(OR¹)(OR²) en los que R¹ y R² se seleccionan independientemente de entre una carga negativa, H, alquilo o arilo.

55 Más específicamente, la presente invención se refiere a una nanoestructura que comprende un iones de manganeso incorporados en un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en el que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como -R³R⁴C(P=O(OR¹)(OR²))₂, en el que: R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, o que forma parte del marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R³ y R⁴ sea dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, y en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano, o en el que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

60 En el caso de que por lo menos uno de R¹ o R² es H, el ácido fosfónico resultante se ioniza en grado dependiente del pH.

Tal como se ha indicado anteriormente, el término “nanoestructura” se refiere a una estructura con un diámetro total de 1 a 100 nm.

5 En algunas realizaciones de la invención, R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H y metilo.

10 En el átomo de carbono que separa los grupos bisfosfonato, es decir, el átomo de carbono intermedio, se encuentra presente uno o más enlaces con el marco polimérico. De esta manera, el átomo de carbono intermedio puede ser parte, o estar unido al marco polimérico.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, R^3 y/o R^4 se seleccionan del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-Si(R^x)_3$, en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O^- o O^- , en el que - denota un enlace con el marco polimérico, y en el que n es 1 a 5.

En algunas realizaciones de la presente invención, R^3 es $-(CH_2)_nCO-$ (formando el grupo carbonilo el enlace con el marco polimérico) y R^4 es H y $n=1-5$. En algunas de dichas realizaciones, $n=1$.

20 En algunas realizaciones de la presente invención, R^3 y R^4 son independientemente $-(CH_2)_n-SiO_3$, en el que $n=1$ a 5 y el silano es parte del marco polimérico mediante la formación de enlaces Si-O-Si, tal como se explica en mayor detalle posteriormente.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, R^3 y R^4 son ambos $-(CH_2)_n-SiO_3$, en el que $n=3$ y el silano es parte de dicho marco polimérico de la manera anteriormente indicada.

También resulta concebible utilizar amidas, cloruro o fluoruros fosfónicos en lugar de ésteres o ácidos fosfónicos como componentes o materiales de partida de los compuestos indicados en la presente memoria. Los fosfonatos pueden encontrarse presentes en su forma libre o como ésteres o como amidas o cualquier mezcla de los mismos.

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

35 Tal como se ha indicado anteriormente, el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano o se deriva de polietilenimina.

40 El marco polimérico, al que dichos grupos fosfonato están unidos, puede construirse a partir de un gran número de monómeros bien conocidos tal como pueden encontrarse en cualquier libro sobre la química de los polímeros (p.ej., J. R. Fried, "Polymer Science and Technology", Prentice Hall, 1995). Algunos ejemplos son poliácridatos, polimetacrilatos, poliamidas, poliestireno, poldimetilsiloxanos (siliconas), poliorganosilanos, poliaminas, tales como polietilenimina o carbohidratos, especialmente estructuras altamente ramificadas o entrecruzadas.

45 Las nanoestructuras según la presente exposición son, tal como se ha indicado anteriormente, estructuras con una forma aproximadamente globular y un tamaño medio (diámetro hidrodinámico) de 1 a 100 nm; en algunas realizaciones, el tamaño medio puede ser de 2 a 50 nm; en otras realizaciones, el tamaño medio puede ser de 3 a 10 nm, o 3 a 7 nm, o 10 a 50 nm o 10 a 20 nm.

En algunas realizaciones de la invención, en un ejemplo que se utiliza como un agente de contraste intravenoso, el diámetro hidrodinámico medio de las nanoestructuras es de 3 a 7 nm.

50 En algunas realizaciones, por ejemplo realizaciones en las que el material se utiliza para la obtención de imágenes de ganglios linfáticos, de la invención, el diámetro hidrodinámico medio de la nanoestructura es de 10 a 50 nm o de 10 a 20 nm.

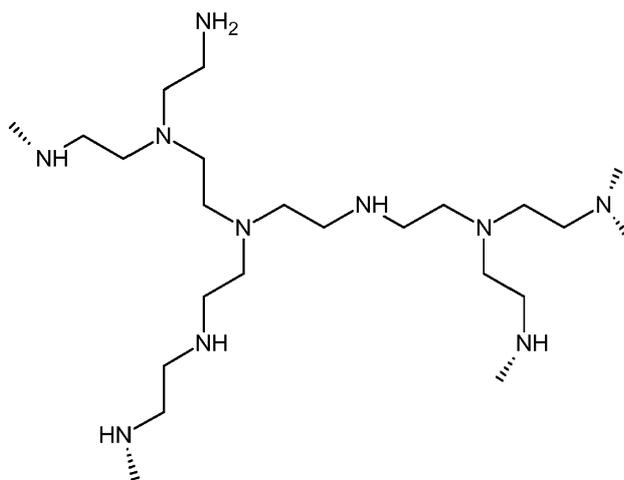
55 El diámetro hidrodinámico al que se hace referencia es el diámetro de la esfera dura equivalente calculada a partir del coeficiente de difusión según la ecuación de Stokes-Einstein. El coeficiente de difusión se calcula, a su vez, a partir de los datos de dispersión lumínica dependiente del tiempo obtenidos mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés). A título comparativo, se mide que la albúmina de suero bovino presenta un diámetro hidrodinámico de 6,5 nm mediante DLS en solución acuosa, concordando en gran medida con la estructura cristalina. Dependiendo de si se utiliza la media en número, la media en volumen o la media de dispersión de intensidad, los valores pueden ser algo diferentes. La media en volumen generalmente es la más útil, ya que muestra el tamaño de partícula del grueso del material. Los diámetros medios a los que se hace referencia en el presente texto se refieren a medias en volumen.

65 Resulta favorable utilizar estructuras con una estructura de tipo ramificado o en red para formar las estructuras globulares deseadas en la presente invención. Un modo establecido de conseguir una estructura de red es mediante la introducción de enlaces cruzados mediante la incorporación de una fracción de monómeros bifuncionales durante

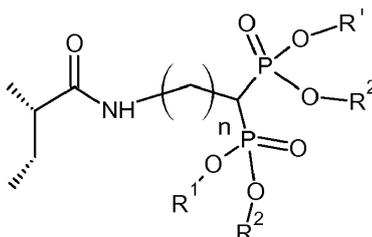
el procedimiento de polimerización. Un ejemplo bien conocido es el entrecruzamiento de poliestireno con divinilbenceno.

5 Pueden formarse estructuras ramificadas disponiendo de más de una posición reactiva en los monómeros ("The architecture and surface behavior of highly branched molecules", Peleshanko, S., Tsukruk, V. V., Prog. Polym. Sci.33, 523, 2008). Un ejemplo bien conocido es la formación de la polietilenimina altamente ramificada mediante la polimerización de aziridina. La polietilenimina contiene una mezcla de grupos amino primarios, secundarios y terciarios y presenta una estructura aleatoria ramificada, tal como se indica en el esquema, posteriormente. La estructura exacta sólo debe interpretarse como típica en la presente invención. Los bisfosfonatos cruciales para la presente invención
10 pueden unirse a los grupos amino primarios y/o secundarios.

En algunas realizaciones de la invención, el marco polimérico es polietilenimina. Posteriormente se muestra un fragmento estructura de polietilenimina típico. Los enlaces de línea discontinua indican que la red polimérica continúa.



15 Al incorporar el bisfosfonato en un marco de poli(acrilato) (no comprendido en las presentes reivindicaciones) resulta concebible unir el bisfosfonato al nitrógeno de la amida mediante un conector corto. Un ejemplo típico de un fragmento estructural de dicho material sería la estructura posteriormente, con R^1 y R^2 tal como se han definido anteriormente en el texto, 'n' es 1 a 5 y los enlaces de línea discontinua indican que el fragmento pertenece a un polímero. También resulta concebible unir el bisfosfonato directamente al esqueleto de carbonos.
20



25 Los marcos a base de poliaromáticos como poliestireno o polivinilpiridina también puede contemplarse (no comprendido en las presentes reivindicaciones). El bisfosfonato en este caso está unido al sistema aromático. Las poliamidas como la polivinilpirrolidona también son concebibles (no comprendidas en las presentes reivindicaciones).

30 Se requiere un grado adecuado de entrecruzamiento para formar las nanoestructuras globulares de la presente invención. Resulta preferente la incorporación de 1% a 100% de un agente entrecruzante difuncional, trifuncional o tetrafuncional. Una lista de agentes entrecruzantes típicos: N,N'-metilén-bis(acrilamida), epíclorohidrina, divinilbenceno, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 1,3-fenilén-diisocianato, dianhídrido de ácido 3,3'-bifeniltetracarboxílico, éter 1,4-butanodioldivinílico, tetraetoxisilano, oligosilicatos, tales como metasilicato, o silsequioxanos, organosilanos, tales como bis(trietoxisilil)metano, bis(trietoxisilil)etano, bis(trietoxisilil)propano, bis(trietoxisilil)butano,
35 metiltrietoxisilano, etiltrietoxisilano y propil trietoxisilano.

El grado de polimerización se ajusta a los productos de rendimiento del tamaño deseado mediante la manipulación de los parámetros del procedimiento tal como se conocen de la técnica. El tamaño deseado no sólo puede expresarse como diámetro hidrodinámico, sino también como grado de polimerización (número medio de monómeros). Resulta
40 menos útil que el diámetro hidrodinámico, aunque es otro modo de conceptualizar las estructuras y se incluye como referencia. Por ejemplo, para un polímero con una densidad próxima a 1 g/ml, los intervalos de tamaño preferentes son 25 a 3.000.000 o 25 a 375.000 o 80 a 3000 o 80 a 1000 monómeros.

Resulta concebible mezclar la totalidad de dichos marcos poliméricos en cualquier combinación químicamente compatible, mediante mezcla de los monómeros antes de la polimerización, o mediante injertación de un segundo polímero en un primer polímero.

5 Un marco particularmente ventajoso se forma mediante la polimerización por condensación de trialcoxiorganosilanos $R^5-Si(OR^6)_3$, en el que R^5 es H o un residuo orgánico y R^6 es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono o arilo. Dicho marco presenta la propiedad de ser altamente polar, por lo tanto compatible con agua, y el grado de entrecruzamiento puede controlarse mediante los parámetros de procedimiento durante la producción. Resulta ventajoso utilizar monómeros con presencia de más de un grupo tialcoxisililo.

En algunas realizaciones de la invención se encuentran presentes dos grupos alcoxisilano en el monómero.

15 En algunas realizaciones de la invención, dichos alcoxisilanos están separados por 1 a 10 átomos de carbono o 3 a 9 átomos de carbono.

En algunas realizaciones de la invención, dichos alcoxisilanos están separados por 7 átomos de carbono.

20 En algunas realizaciones de la invención, dichos alcoxisilanos están separados por tres o cinco átomos de carbono.

En algunas realizaciones de la invención, los dos grupos fosfonato son parte del grupo R^5 .

En algunas realizaciones de la invención, dichos dos silanos están separados por 7 átomos de carbono y los dos grupos fosfonato son parte del grupo R^5 .

25 En algunas realizaciones de la invención, dichos silanos presentan la estructura genérica siguiente:

30 $\{(X^{7a}O)(X^{7b}O)PO\}_2-(C)\{(CH_2)_nSi(OX^{7c})(OX^{7d})(OX^{7e})\}\{(CH_2)_oSi(OX^{7c})(OX^{7d})(OX^{7e})\}$, en la que X^{7a} , X^{7b} , X^{7c} , X^{7d} , X^{7e} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_{1-8} y bencilo, y 'n' y 'o' se seleccionan independientemente de 1 a 5.

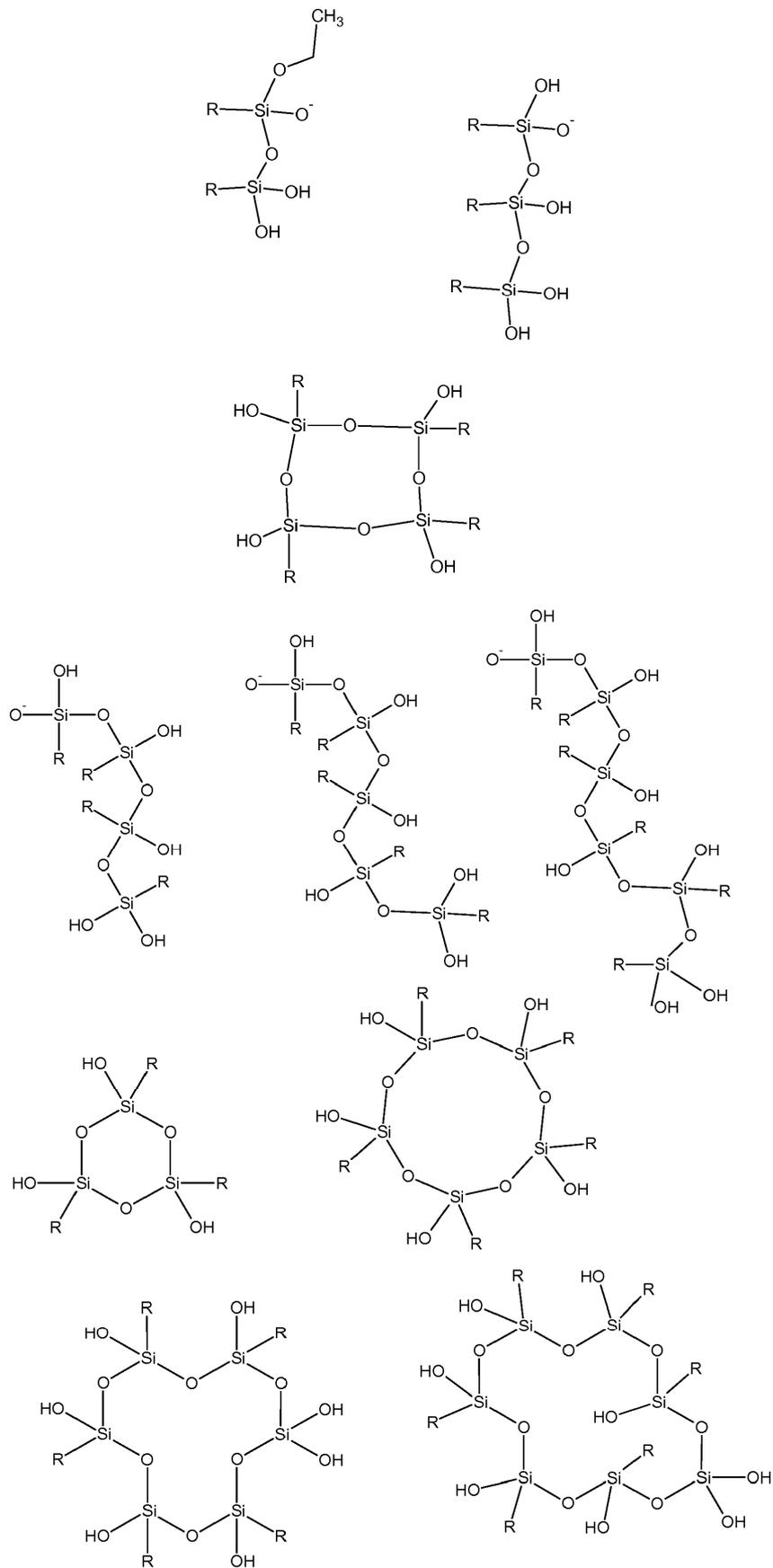
En algunas realizaciones, un segundo silano, tal como un disilano, se injerta en el marco polimérico formado por el primer disilano.

35 La reactividad de los trialcoxi silanos en la polimerización varía con la identidad de los grupos R^6 . Los presentes inventores han encontrado que lo anterior es un factor crítico en el control del tamaño molecular durante la producción y han encontrado que metilo y etilo, en particular este último, resulta adecuado para rendir las estructuras de la presente invención, aunque resulta concebible utilizar cualquier otro grupo de alquilo inferior, arilo, sililamida, acilo, sililfluoruro o sililcloruro.

40 En algunas realizaciones de la invención, R^6 es un grupo etilo.

45 Existen muchas maneras diferentes en que los trialcoxi silanos pueden unirse mediante enlaces Si-O-Si. Los elementos estructurales diméricos, así como los lineales, ramificados y cíclicos son conocidos (R.J. Fessenden, J. S. Fessenden, "Trends in Organosilicon Biological Research" in Advances in Organometallic Chemistry vol. 18, página 275). También son bien conocidas de la literatura las estructuras de jaula de silicio-oxígeno de diversos tamaños (Hanssen R.J.M. Et al., Eur. J. Inorg. Chem 675, 2004) y también pueden encontrarse presentes grupos alcoxi residuales o grupos silanol libres, en grados diferentes. También resulta concebible que los iones metálicos paramagnéticos cruciales para la presente invención en cierta medida se coordinen mediante grupos Si-O-. Algunos elementos estructurales que pueden encontrarse presentes en dichas estructuras se muestran en el Esquema 1.

50 Esquema 1: ilustración de algunas estructuras Si-O-Si que pueden utilizarse en la presente invención; R es cualquier residuo orgánico.



conocido que une a cationes multivalentes como el calcio fuertemente. Una ventaja de los materiales de la presente invención es que muestran una preferencia del manganeso sobre el calcio y el magnesio a concentraciones fisiológicas (ello se ilustra adicionalmente después, en el Ejemplo 15).

5 Los grupos fosfonato pueden encontrarse completamente presentes en su forma éster, completa o parcialmente hidrolizados en su forma ácida y posteriormente ionizados en cierta medida de parcial a completo según el valor del pH del medio circundante o cualquier mezcla de los mismos. Resulta óptimo cargar los iones de manganeso en el polímero a un pH neutro o básico. Resulta útil cualquier pH entre 12 y 6, o entre 11 y 8, o preferentemente entre 10,5 y 9,5. Lo anterior indica que resulta, por lo menos en parte o en ocasiones, o incluso completamente, la forma aniónica del fosfonato hidrolizado, que desempeña un papel importante en la unión de los iones metálicos. No sólo los ésteres o ácidos de fosfonato, sino también las amidas fosfónicas pueden contemplarse como parte del material o utilizarse como material de partida.

15 Los presentes inventores han encontrado que, al incorporar la estructura bisfosfonato en un marco polimérico, preferentemente hidrofílico, y se deja que se una a manganeso (II), se consigue un incremento espectacular de la relaxividad. El quelato de manganeso del bisfosfonato-ácido zoledrónico monomérico presenta una relaxividad de 2,3 /mM Mn/s (tal como se muestra en el Ejemplo 17) y el manganeso más el ácido bisfosfonato metilendifosfónico monomérico presenta una relaxividad de 1 /mM Mn/s. Las relaxividades de los materiales cargados de manganeso poliméricos de la presente invención están comprendidas entre 24 y 48 /mM Mn/s.

20 Específicamente, al derivatizar la polietilenimina con un éster activado de un bisfosfonato geminal tal como se indica en el Ejemplo 9 y, posteriormente, se carga con iones de manganeso (II), se obtiene un material con una relaxividad de 24 /mM Mn/s. Ésta es sustancialmente superior a la relaxividad anteriormente indicada del complejo de ácido zoledrónico, mostrando de esta manera la ventaja de incorporar el bisfosfonato en un marco polimérico. La proporción molar de fósforo a nitrógeno en dichos materiales puede estar comprendida entre 0,1 y 3, y preferentemente es de entre 0,2 y 0,8.

25 Para mostrar cómo la relaxividad se origina de la combinación de bisfosfonatos geminales con un polímero, también se sometieron a ensayo los polímeros "desnudos" correspondientes. La polietilenimina sin ningún aditivo se une a manganeso muy poco y la relaxividad del poco que se une al polímero es muy baja (0,8/mM/s). También el poliorganosilano formado a partir de $(\text{EtO})_2\text{P}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OEt})_3$ proporciona una relaxividad poco impresionante de 3,0 /mM Mn/s tras la carga con manganeso. Conjuntamente, lo anterior demuestra que la relaxividad inesperadamente elevada en los materiales de la presente invención viene de la combinación de todas las características de ser polimérico, portar bisfosfonatos geminales e incorporar un metal paramagnético, tal como manganeso.

30 En el Ejemplo 2 se describe cómo un 1,3-bisfosfonato unido al marco polimérico de polietilenimina, que se encuentra comprendido fuera del alcance de la presente invención, presenta una relaxividad más baja (18,5/mM/s) que los bisfosfonatos geminales de la presente invención (≥ 24 /mM/s). También presenta una baja estabilidad en el ensayo de intercambio iónico utilizado por los presentes inventores. De esta manera, resulta razonable esperar que los 1,2-bisfosfonatos, así como cualesquiera 1,n-bisfosfonatos, en los que $n > 2$ resulta menos deseable que los bisfosfonatos geminales de la presente invención.

35 Los iones metálicos paramagnéticos presumiblemente forman quelatos con los grupos fosfonatos, y una proporción de fósforo a manganeso de 10 a 15 aparentemente es el mejor compromiso entre relaxividad y estabilidad, aunque resulta concebible cualquier valor entre 7 y 20. En la Tabla 1 del Ejemplo 11, el efecto de variar la proporción de fósforo a manganeso se describe en detalle.

40 La proporción preferente de silicio a manganeso estará comprendida entonces entre 5 y 20 y la proporción de fósforo a silicio debe ser de aproximadamente 1, tal como de entre 0,7 y 1,3.

45 Opcionalmente, puede injertarse un material bioinerte hidrofílico en las partes externas de las nanoestructuras de la presente invención. Dichas partes externas son aquellas partes de la nanoestructura que resultan accesibles a las reacciones químicas con reactivos derivatizantes. Lo anterior puede resultar ventajoso para la biocompatibilidad del material, y pueden considerarse muchos materiales hidrofílicos, tales como carbohidratos o polímeros artificiales hidrofílicos. Resultan de particular interés los compuestos poliéter, y especialmente los derivados de polietilenglicol (PEG). Los derivados de PEG terminados en metoxi resultan preferentes (m-PEG). Pueden injertarse de cualquier manera químicamente aceptable con el marco polimérico, tal como átomos de oxígeno, nitrógeno o carbono, tal como con grupos residuales de ácido fosfónico o silanol después de la quelación metálica o, alternativamente, de manera directa con el polímero libre metálico. Las longitudes de cadena adecuadas de los derivados de PEG lineales son de 4 a 50 unidades de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Las más deseables son mezclas que comprende entre 5 y 20 unidades y presentan una medida de aproximadamente 10 o 11. Los reactivos que se acoplan más convenientemente con las nanoestructuras presentan terminación amino y pueden acoplarse con grupos fosfonato residuales. Los derivados de PEG ramificados también resultan de interés y especialmente estructuras como aquellas en el Ejemplo 8, que son más compactas y mejores en la protección de la superficial que los derivados de PEG lineales de peso molecular similar.

El número de grupos poliméricos bioinertes en cada entidad nanoestructura puede estar comprendido entre 10 y 1000, o entre 10 y 100, o entre 10 y 50.

5 En algunas realizaciones, las nanoestructuras bisfosfonato cargadas de manganeso poliméricas de la presente invención comprenden grupos m-PEG lineales con una longitud de cadena de 5 a 20 residuos monómeros acoplados con una fracción de los grupos fosfonato mediante enlaces amida.

10 En algunas realizaciones, las nanoestructuras bisfosfonato cargadas de manganeso poliméricas de la presente invención comprenden grupos PEG ramificados de estructura X1 (Ejemplo 8h) acoplados con una fracción de los grupos fosfonato mediante enlaces amida.

15 Resulta concebible introducir asas para la conjugación de las nanoestructuras de la presente invención con diversas entidades moleculares activas, tales como biomarcadores o entidades informadoras. Una lista de ejemplos típicos sería: péptidos, peptoides, proteínas, anticuerpos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN, fragmentos de APN, fluoróforos, quelatos o ligandos farmacológicos de molécula pequeña.

20 El segundo aspecto principal de la presente invención es un procedimiento para producir dichas nanoestructuras. En su sentido más amplio, en primer lugar implica la formación de entidades poliméricas nanodimensionadas globulares que comprenden una multitud de grupos bisfosfonato seguido de una etapa en la que el producto de la primera etapa se pone en contacto con iones de manganeso (II). Opcionalmente, las dos etapas, aunque químicamente diferentes, pueden llevarse a cabo simultáneamente en el mismo recipiente de reacción. Las características principales del procedimiento se describen de manera general en la figura 1. En uno o más casos del procedimiento, se incorpora una etapa de selección por tamaño o purificación mediante ultrafiltración.

25 Se obtiene un glóbulo polimérico nanodimensionado que comprende una multitud de bisfosfonatos mediante injertación (002) con un glóbulo polimérico existente (obtenido mediante una etapa de polimerización 001) o mediante polimerización de una mezcla de monómeros que comprende bisfosfonatos (003). Dependiendo de qué marco polimérico se desee, pueden contemplarse muchos iniciadores de polimerización diferentes. Para los monómeros a base de trialcoxisilano de una de las realizaciones preferentes de la presente invención, resulta posible utilizar la hidrólisis espontánea y la condensación para llevar a cabo la polimerización o utilizar la catálisis ácida o básica. En ocasiones ha demostrado ser ventajoso utilizar una adición de una sal estabilizadora del pH como un bicarbonato, en particular bicarbonato sódico, o un carboxilato como acetato sódico, formato sódico o formato de tetrametilamonio a la mezcla de reacción para optimizar el rendimiento del producto en un intervalo de tamaño de 3 a 10 nm.

35 Con frecuencia un solvente resulta deseable para la etapa 003 y aunque el experto en la materia podrá contemplar muchos diferentes, resulta deseable evitar solventes tóxicos por lo que el agua y alcoholes inferiores, tales como propanol, butanol, etilenglicol o 1,3-propanodiol resultan preferentes. Con frecuencia resulta deseable optimizar el rendimiento y calidad del producto mediante la utilización de mezclas de solventes.

40 En algunas realizaciones del procedimiento, se utiliza una mezcla de 5% a 25% de agua en un alcohol inferior en la etapa 003.

45 En algunas realizaciones del procedimiento, se utiliza una mezcla de 5% a 25% de agua en etanol, 1-propanol o 2-propanol, etilenglicol o 1,2- o 1,3-propanodiol en la etapa 003.

50 Se ha encontrado que resulta ventajoso utilizar temperaturas superiores a la temperatura ambiente para la etapa 003, tal como temperaturas de 40°C a 130°C, o de 80°C a 120°C o de 100°C a 120°C. En el caso de que se utilicen alcoholes inferiores para funcionar con recipientes resistentes a la presión cerrados para conseguir la temperatura de reacción deseada.

55 La duración de la etapa 003 depende del marco polimérico y el modo de inicio y puede estar comprendida entre segundos y días o semanas. Para los trialcoxisilanos en algunas de las realizaciones preferentes de la presente invención, ha demostrado ser ventajoso utilizar tiempos de 6 a 200 horas, o de 6 a 48 horas o de 12 a 36 horas, o de aproximadamente 24 horas, en la etapa 003.

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

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

En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la etapa 003 son una temperatura de primero 90°C a 100°C durante 40 a 50 horas, seguido de 105°C a 115°C durante otras 20 a 30 horas.

65 La concentración de monómeros en la etapa 003 depende de qué marco polimérico se desea y puede estar

comprendida entre una concentración molar y condiciones libres de solvente. Sin embargo, para los trialcoxisilanos en una de las realizaciones preferentes de la presente invención, ha demostrado ser ventajoso trabajar a concentraciones de monómero de 10 a 500 mM o de 20 a 100 mM y en particular de 40 a 80 mM.

5 En algunas realizaciones de la invención, las condiciones de la etapa 003 son en primer lugar una temperatura de 90°C a 100°C durante 20 a 50 horas, seguido de 105°C a 115°C durante 20 a 30 horas y una concentración de monómero de 40 a 60 mM.

10 En la etapa 002, que implica la inyección de un reactivo bisfosfonato en un marco polimérico, las condiciones son algo diferentes. Especialmente, las restricciones de temperatura y concentración son más relajadas. Los presentes inventores han encontrado que, partiendo de una solución de polietilenimina en agua, opcionalmente mezclada con la mezcla de un cosolvente, a una temperatura compatible con agua líquida, tal como la temperatura ambiente y poniéndola en 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 intermediario éster reactivo, tal como sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida en presencia de un agente de acoplamiento, tal como N-(dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodimida a una temperatura, tal como la temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo de 1 a 48 horas, tal como 20 a 24 horas, produce un material con bisfosfonatos injertados en el marco polimérico.

20 Se lleva a cabo una etapa de selección de tamaño (004) con la solución de precursores de nanoestructura (X) para eliminar las entidades indeseablemente grandes o pequeñas. Los materiales de partida y residuos de solventes de la mezcla de reacción también son eliminados en esta etapa. La ultrafiltración es un método preferente de purificación, especialmente al utilizarla en la forma que habitualmente se denomina filtración de flujo laminar o diafiltración. Resulta preferente eliminar nanoestructuras y/o agregados indeseablemente grandes pasando la solución por un filtro con poros bastante grandes, etapa 004a. Los valores de corte nominales preferentes para dichos filtros son 300 kDa, o 100 kDa o 50 kDa. En la etapa 004b, el material deseado se recoge sobre un filtro con un tamaño de poro más pequeño. Los tamaños de poro preferentes para la etapa 004b presentan valores de corte nominales de 50 kDa, 30 kDa o 10 kDa.

30 La etapa de selección de tamaño (004) puede no resultar necesaria en el caso de que el material de partida presente una distribución de tamaños estrecha.

35 En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 002 o 003 se pasa en primer lugar por un filtro de 100 kDa (etapa 004a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 30 kDa (etapa 004b).

En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 002 o 003 se pasa en primer lugar por un filtro de 300 kDa (etapa 004a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 100 kDa (etapa 004b).

40 En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 002 o 003 se pasa en primer lugar por un filtro de 50 kDa (etapa 004a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 30 kDa (etapa 004b).

45 En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 002 o 003 se pasa en primer lugar por un filtro de 100 kDa (etapa 004a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 10 kDa (etapa 004b). Resulta ventajoso lavar el material con varias partes de agua después de la etapa 004b para eliminar adicionalmente monómeros o residuos de solvente de la etapa 001, 002 o 003.

También pueden utilizarse otros métodos de ultrafiltración, tales como los filtros de centrifuga o la diálisis, aunque son menos escalables.

50 Las partículas del intervalo de tamaños deseado también pueden seleccionarse mediante cromatografía de exclusión por tamaños (también denominada filtración en gel).

55 La etapa, 005, en la que se carga dicho polímero con manganeso (II) implica someter una solución de dicho polímero a iones de manganeso (II). Dichos iones pueden añadirse a la mezcla de reacción en forma de un sólido o de una solución. Las sales solubles de manganeso (II), como flúor, cloro, bromo, acetato, nitrato o sulfato resultan preferentes. También resulta concebible utilizar fuentes menos solubles de manganeso, como MnO. Las concentraciones útiles de iones de manganeso son de 0,1 mM a 5 M, tal como 0,1 a 600 mM, o 0,1 a 10 mM, según la concentración del polímero. Tal como se ha comentado anteriormente, la proporción de fósforo a manganeso es importante. Resulta óptimo cargar los iones de manganeso en el polímero a un pH neutro o básico. Resulta útil cualquier pH entre 12 y 6, o entre 11 y 8, o preferentemente entre 10,5 y 9,5. La adición del manganeso debe producirse después de un periodo de tiempo durante el que se ha estabilizado el pH en el valor deseado. Los presentes inventores han encontrado que los tiempos de 10 minutos a 24 horas, tal como entre media hora y dos horas, resulta suficientes. Tras la carga de las nanoestructuras con manganeso, se ajusta el pH a neutro (entre 8 y 6, o entre 7,7 y 7). La temperatura para la carga puede ser cualquier punto entre el de congelación y el de ebullición del solvente o mezcla de solventes en cuestión, y resulta preferente entre la temperatura ambiente y 60 grados.

65

- 5 En una etapa opcional 006, se separan partículas del intervalo de tamaños deseado de las especies indeseablemente grandes o pequeñas. Con frecuencia lo anterior no resulta necesario, ya que las nanoestructuras sólo cambian marginalmente de tamaño al añadir el manganeso. La etapa 006 puede presentar varias subetapas 006a, 006b, etc., o, para una subetapa en ningún orden particular, 006x.
- 10 La ultrafiltración es un método preferente de purificación de una etapa de selección por tamaños 006x, especialmente al utilizarla en la forma que habitualmente se denomina filtración de flujo laminar o diafiltración. Resulta preferente eliminar nanoestructuras y/o agregados indeseablemente grandes pasando la solución por un filtro con poros bastante grandes, etapa 006a. Los valores de corte nominales preferentes para dichos filtros son 300 kDa, o 100 kDa o 50 kDa. En la etapa 006b, el material deseado se recoge sobre un filtro con un tamaño de poro más pequeño. Los tamaños de poro preferentes para la etapa 006b presentan valores de corte nominales de 50 kDa, 30 kDa o 10 kDa.
- 15 En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 005 se pasa en primer lugar por un filtro de 100 kDa (etapa 006a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 30 kDa (etapa 006b).
- En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 005 se pasa en primer lugar por un filtro de 300 kDa (etapa 006a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 100 kDa (etapa 006b).
- 20 En algunas realizaciones de la invención, una solución obtenida de la etapa de procedimiento 005 se pasa en primer lugar por un filtro de 50 kDa (etapa 006a) y, posteriormente, se recoge sobre un filtro de 30 kDa (etapa 006b).
- Resulta ventajoso lavar el material con varias partes de agua después de la etapa 006b para eliminar iones metálicos residuales, monómeros o residuos de solvente de la etapa 005.
- 25 También pueden utilizarse otros métodos de ultrafiltración, tales como los filtros de centrífuga o la diálisis en la etapa 006x.
- 30 Las partículas del intervalo de tamaños deseado también pueden seleccionarse mediante cromatografía de exclusión por tamaños (también denominada filtración en gel) en la etapa 006x.
- Opcionalmente, dicho producto fosfonato polimérico rico en manganeso puede purificarse en la etapa 007. La etapa 007 puede presentar varias subetapas 007a, 007b, etc., o, para una subetapa en ningún orden particular, 007x.
- 35 Un método preferente de una etapa de purificación 007x es el tratamiento con una pequeña cantidad de intercambiador de cationes, tal como poliestireno sulfonado, para eliminar el exceso de manganeso o el manganeso unido laxamente. Las resinas de intercambio iónico disponibles comercialmente con frecuencia presentan una capacidad de 1 a 2 mmoles/g de resina y típicamente el material en bruto de la etapa b) que contiene 1 mol de manganeso se trataría con 1 a 100 g de forma sódica o potásica de una resina de intercambio iónico.
- 40 En algunas realizaciones de la invención, la etapa 007x implica todavía otra diafiltración, recogiendo el material en un filtro de 30 kDa.
- En algunas realizaciones de la invención, la etapa de procedimiento 007x implica el tratamiento del producto de la etapa 006 con la forma sódica de una resina de intercambio iónico del tipo sulfonato de poliestireno.
- 45 También pueden añadirse etapas de purificación posteriores 007x para eliminar impurezas lipofílicas, tales como trazas de endotoxinas (residuos de bacterias muertas).
- 50 En algunas de realizaciones del procedimiento, el producto de la etapa 006 se trata con carbón activado.
- En algunas realizaciones del procedimiento el producto de la etapa 006 se pasa por un filtro de polietileno, o polipropileno o PVDF.
- 55 En algunas de realizaciones del procedimiento, el producto de la etapa 006 se trata con polimixina B inmovilizada.
- Opcionalmente, puede insertarse una etapa 009 tal como se indica en la figura 1, en la que se injerta un modificador de superficie bioinerte en las partes accesibles de la nanoestructura.
- 60 Opcionalmente, puede llevarse a cabo un entrecruzamiento (etapa 010) mediante la incorporación de agentes entrecruzantes en muchos sitios en el procedimiento, tal como se indica en la figura 1. El entrecruzamiento mediante la mezcla del agente entrecruzante en la etapa 001 es un procedimiento estándar. El monómero también puede presentar una tendencia inherente a entrecruzarse, como los trialcóxisilanos en una de las realizaciones preferentes de la presente invención, de manera que el material formado en la etapa 002 ya se encuentra entrecruzado.
- 65 En el tercer aspecto principal de la presente invención, el material se utiliza como un agente de contraste para

procedimientos diagnósticos y en particular para la obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM). El material de la presente invención presenta las propiedades de baja toxicidad y elevada relaxividad, lo que lo convierte en útil como agente de contraste en exámenes de IRM de un organismo, en particular de un cuerpo humano.

5 La combinación de las propiedades de elevada relaxividad y de tamaño adecuado para dichas realizaciones de la invención, en la que el diámetro hidrodinámico es superior a 3 nm o superior a 4 nm o superior a 5 nm, provoca que las composiciones que comprenden las nanoestructuras de la presente invención resulten adecuadas para la obtención de imágenes de tumores, en particular tumores sólidos, mediante IRM. También resulta concebible utilizar dichas composiciones de la presente invención como un agente de contraste para la obtención de imágenes anatómicas generales, p.ej., angiografía; en particular, la angiografía de las arterias coronarias finas del corazón, o la angiografía de las arterias carótidas, o de las arterias renales o de la aorta, resulta posible por la elevada relaxividad y contraste de la presente invención. La obtención de imágenes de estructuras en la cabeza, órganos internos o extremidades también resulta de interés. De los órganos internos, resultan de particular interés el hígado, el páncreas y los intestinos. Las imágenes del colon pueden conseguirse mediante administración intravenosa o la administración en forma de un enema. Para las imágenes del estómago, hígado y tracto gastrointestinal superior, resulta concebible administrar el agente de contraste por vía oral.

Debido a la baja toxicidad y elevada relaxividad de los materiales de la presente invención, resultan útiles como agentes de etiquetado celular. Las células, como las células madre o los macrófagos para la utilización diagnóstica o terapéutica en un paciente se cargan con nanoestructuras de la presente invención *ex vivo* y después se administran en dicho paciente y puede visualizarse mediante IRM su distribución en el cuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, se inyecta una solución de las nanoestructuras en el tejido, con frecuencia por vía intradérmica, o subcutánea y después se utiliza para visualizar las estructuras linfáticas de un paciente mediante IRM. Resulta de interés particular la obtención de imágenes de los ganglios linfáticos, que son una localización común de los tumores metastásicos. Con este propósito resultan particularmente útiles nanoestructuras con tamaños de aproximadamente 10 nm, tal como 7 a 50 nm o 7 a 25 nm o 7 a 15 nm.

En algunas realizaciones de la presente invención, se administra una formulación de las nanoestructuras de la presente invención con un diámetro hidrodinámico media en el intervalo de 8 a 15 nm en el paciente por vía intradérmica y los ganglios linfáticos de dichos pacientes se visualizan mediante un procedimiento de IRM.

Debido a que las nanoestructuras de la presente invención presentan las propiedades de elevada relaxividad y baja toxicidad, resulta concebible utilizar el material para el etiquetado celular. En tal caso, se cargan células, p.ej., células madre o macrófagos, con nanoestructuras externamente al cuerpo de mamífero, p.ej., un cuerpo humano, y después se insertan en dicho mamífero y se genera una imagen mediante escaneo de IRM. A continuación, resulta posible realizar un seguimiento de las células a medida que son transportadas por el organismo.

La utilización *in vivo* de las nanopartículas de la presente invención requiere que se formulen de un modo farmacológicamente aceptable según las mejores prácticas bien conocidas por el experto en la materia. El modo preferente de administración es parenteral, en particular resulta ventajosa la vía intravenosa, aunque la intraarterial puede presentar ventajas bajo determinadas circunstancias. La administración parenteral con frecuencia requiere una formulación líquida. El agua es un solvente preferente para llevar a solución las nanoestructuras de la presente invención, aunque pueden añadirse uno o más cosolventes o aditivos en una proporción de 0,1% a 10% para mejorar la estabilidad en solución. Son cosolventes aceptables los alcoholes como el etanol o el glicerol, polímeros biocompatibles con el etilenglicol o el alcohol polivinílico, el dimetilsulfóxido o la N-metilpirrolidina. También puede resultar ventajoso añadir uno o más osmorreguladores, tales como manitol, sorbitol, lactosa, glucosa u otros azúcares o alcoholes de azúcares. Resulta deseable que la formulación sea isoosmótica con los líquidos corporales. Preferentemente, la solución para la utilización intravenosa presenta una osmolalidad de 270 a 2000 mOsm, o de 280 a 1000 mOsm, o de 280 a 500 mOsm, o en particular de 280 a 300 mOsm. Muchos de dichos aditivos también pueden cumplir la función de crioprotectores, potenciando la eficiencia de reconstitución después de la liofilización. También puede resultar ventajoso añadir electrolitos para reducir los efectos fisiológicos de la solución inyectada. Los electrolitos preferentes serían una combinación de sales no tóxicas de sodio, calcio y/o magnesio. La regulación del pH de la solución inyectable resulta preferente y puede contemplarse cualquier tampón adecuado para la inyección, aunque resulta preferente Tris-HCl. Los secuestradores de iones metálicos también pueden contemplarse como aditivo. Algunos ejemplos típicos serían EDTA (ácido etilendiaminotetracético), DTPA (ácido dietilentiainopentaacético) y DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético) o fodipir. La utilización de resinas secuestrantes de iones en fase sólida añadidas a la botella de almacenamiento también puede encontrarse contemplada.

La concentración de nanoestructuras puede describirse de muchas maneras diferentes, aunque las dos más relevantes son la concentración en masa, proporcionada como g/l de solución y la concentración de manganeso, en mmoles/l de solución. Los intervalos de concentración de manganeso en formulaciones que resultan adecuadas para la administración como agente de contraste se encuentran comprendidos entre 1 y 500 mM o entre 10 y 300 mM, o entre 10 y 200 mM o entre 50 y 200 mM o entre 100 y 200 mM. En el caso de que se proporcionen como concentración en masa y suponiendo que la proporción de fósforo-manganeso es de aproximadamente 6, las concentraciones en

masa que resultan adecuadas para la formulación de agente de contraste se encuentran comprendidas entre 0,5 y 300 g/l, o entre 5 y 200 g/l, o entre 5 y 250 g/l o entre 5 y 100 g/l o entre 100 y 250 g/l. Las concentraciones en masa son aproximadamente iguales a las concentraciones expresadas en mM de manganeso, aunque la correspondencia variará dependiendo del marco polimérico, el grado de entrecruzamiento y la presencia de una capa de recubrimiento bioinerte.

Una realización de la presente invención constituye una formulación farmacéuticamente aceptable para la administración intravenosa con una concentración de manganeso de 100 a 300 mM y una proporción de fósforo a manganeso de 7 a 20.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a formulaciones farmacéuticamente aceptables para la administración intravenosa con una concentración de manganeso de 100 a 300 mM y una proporción de fósforo a manganeso de 7 a 20.

Otro aspecto de la invención se refiere a una nanoestructura que comprende un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en el que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como:



(que es idéntico a $-R^4R^3C(P=O(OR^1)(OR^2))_2$)

en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y en el que por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R³ y R⁴ es dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico, o el residuo de dicho grupo, o seleccionado del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contenían un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano, es decir, una nanoestructura tal como se ha comentado anteriormente pero que no contiene ningún ion manganeso. Dicha nanoestructura resulta útil como intermediario en la producción de nanoestructuras según las realizaciones anteriormente comentadas. Dicha estructura puede unirse a otros cationes diferentes del manganeso y resultar útil en dicha función.

Breve descripción de los dibujos

En los ejemplos a continuación se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es una vista esquemática de un método para obtener las nanopartículas según la invención, y la figura 2 ilustra la mejora del contraste 5 h después de la inyección en un ratón con un tumor.

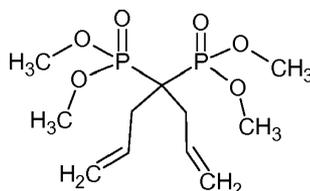
Las figuras 3a, 3b y 3c son curvas relacionadas con experimentos de titulación conductimétrica descritos en el Ejemplo 23.

Las figuras 4a y 4b ilustran la recuperación de SI055 en las fracciones 1 a 10 procedentes de columnas preinmunes (fig. 4A) e inmunes (fig. 4B).

Ejemplos

Ejemplo 1: síntesis de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano

1a: 1,1-dialil-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



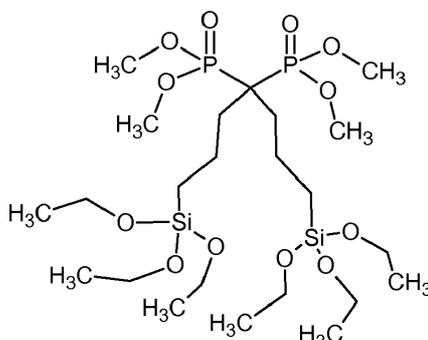
Un reactor de 2 l dotado de un agitador mecánico se secó a 130°C bajo vacío y después se dejó enfriar bajo una presión positiva de nitrógeno. El reactor se cargó con THF seco (1 l) (Aldrich seco, al 99,9% con 250 ppm de BHT) mediante transferencia en tubo bajo gas inerte. Se añadió tetrametilmetilén-di(fosfonato) (97,4 g, 420 mmoles) y bromuro de alilo (183 ml, 255 g, 2,11 moles) (sin evolución de calor, no se detecta gas ácido). Se fijó la temperatura de la camisa en 0°C y a una temperatura interna de 6°C se añadió (dividido en 6 partes), t-butóxido de potasio (140,3 g en total, 1,25 moles). La temperatura se elevó a aproximadamente 12°C después de cada adición y se dejó que volviese a 6°C (o menos) antes de la siguiente adición. Se llevó a cabo una última adición de bromuro de alilo (9,4 ml, 0,11 moles) y t-butóxido (7,3 g, 65 mmoles) para convertir el último pequeño porcentaje de producto monoalilado (no se detecta exoterma). La temperatura en la camisa se fijó en 15°C durante aproximadamente 2 h y después la mezcla

de reacción blanca densa se agitó durante la noche con una temperatura de la camisa de 0°C. La reacción se desactivó con 50 ml de NH₄Cl (aq.) saturado (elevación de la temp. de 2°C a 5°C) y después se añadió tolueno (1 l) y se eliminó por destilación 1 l para eliminar THF y el exceso de bromuro de alilo. Se recogió a 63-73°C con una temperatura de camisa de 70 a 100 grados durante 2 h. Al residuo se añadió gel de sílice (100 g) y carbón activado (15 g). La mezcla de reacción se agitó durante unos cuantos minutos y el líquido se desvió con un soporte de filtro de fritita (o se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman normal). La torta residual se lavó con tolueno (3x100 ml). El filtrado agrupado se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman para eliminar los últimos residuos de carbón activado (indicado por un color verdoso) y se concentró en el evaporador rotatorio (temperatura del baño: 40°C), proporcionando el compuesto del título en forma de un líquido amarillo pálido. El producto en bruto se reintrodujo en el reactor limpio y se disolvió en una mezcla de tolueno (50 ml) y heptano (380 ml). La cristalización puede inducirse a una temperatura interna de 12-9°C mediante inoculación. La temperatura de la camisa se redujo a -25°C durante un periodo de 2 h y se mantuvo a esa temperatura durante dos horas más para completar la cristalización. Se eliminó el licor madre con un soporte de filtro de fritita y la suspensión cristalina se lavó con dos partes de heptano preenfriado (40 ml). Se disolvieron los cristales en EtOAc y la solución se lavó a través de la válvula del fondo. Se eliminó el solvente a presión reducida, proporcionando 70,0 g, 224 mmoles, 53% del producto en forma de un sólido con una temperatura de fusión (tf) ligeramente superior a la temperatura ambiente.

RMN-¹H (CDCl₃); 6.35 (m, 2H), 5.20 (m, 4H), 3.68 (d, 12H), 3.00 (abx, 4H).

También resulta posible destilar el producto en un aparato de destilación de película delgada de camino corto.

1b: 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



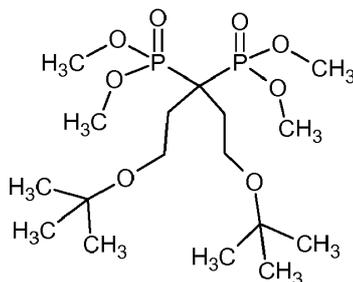
Un reactor de 2 l con camisa de control de la temperatura, termómetro interno y un agitador mecánico se cargó con tolueno (330 ml, Aldrich seco, tapón de sellado Sure), tetrametil-1,1-bis-alil-metilén-bis(fosfonato) (70 g, 224 mmoles) y trietoxisilano (123 ml, 655 mmoles). La mezcla de reacción se desoxigenó mediante tres ciclos de vacío-nitrógeno, procurando mantener ciclos de vacío cortos para evitar la pérdida de tolueno y silano. Resulta crucial eliminar el oxígeno. La temperatura de la camisa se fijó en 30°C, se inyectó con jeringa catalizador de Karstedt (4,5 ml, al 2% en tolueno, 0,053 mmoles) en partes de 0,5 ml con 30 minutos entre ellas (4,5 h en total). Tras completar las adiciones de catalizador, se fijó la camisa de control de la temperatura en 30°C y se dejó la mezcla bajo agitación durante la noche. A la mañana siguiente, la temperatura de la camisa se fijó en 40 grados; se añadió un cabezal de destilación y se eliminó por destilación tolueno y un exceso de silano a una presión de 62 a 13 mbar. Duración: 2 h. Se añadió etanol (800 ml) y carbón activado (15 g) y la suspensión se agitó durante 10 min y la mezcla se pasó por la válvula del fondo y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman. Se eliminó el solvente a presión reducida en un evaporador rotatorio hasta un peso constante (temperatura del baño: 45°C), proporcionando 138 g (215 mmoles, 96%) del producto en forma de un aceite marrón pálido.

RMN ¹H (CDCl₃); 3.95 (q, 12 H), 3.77 (d, 12H), 2.37 (m, 4H), 2.12 (m, 4H), 1.32 (t, 18H), 0.88 (t, 4H).

También resultó posible destilar el producto en un aparato de destilación de película delgada de camino corto.

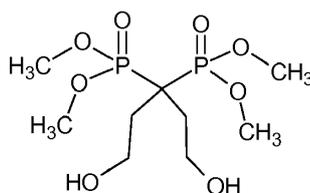
Ejemplo 2: síntesis de 1,1-bis(2-trimetoxisililetil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano

2a: 1,1-bis(2-t-butoxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



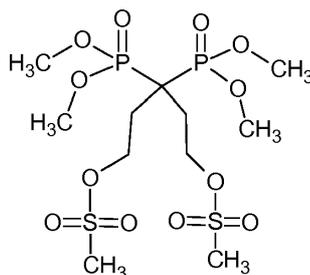
5 A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(dimetil)fosfonato)metano (50 g, 215 mmoles) en THF seco (500 ml) bajo nitrógeno se añadió hidruro sódico (18,9 g, al 60% en aceite mineral, 474 mmoles) en tres partes, durante 30 minutos. La mezcla se agitó durante 3 horas y después se añadió 1-bromo-2-t-butoxietano (90,5 g, 500 mmoles) en partes de 5 ml. Se retiró el baño de hielo tras tres horas y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción con un baño de hielo nuevamente y se desactivó mediante la adición de 50 ml de cloruro amónico acuoso saturado. Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron en diclorometano (300 ml). Se añadió sílice (100 g) bajo agitación y se filtró la suspensión y la torta de filtración se lavó con 3x 200 ml de diclorometano. El producto se obtuvo después de la eliminación de los solventes.

15 *2b: 1,1-bis(2-hidroxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano*



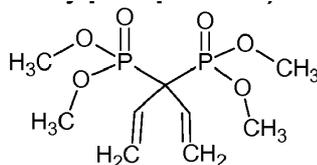
20 Se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 50 ml) y diclorometano (DCM, 50 ml) a 2 g de 1,1-bis(2-t-butoxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (Ejemplo 2a). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se eliminaron los volátiles a presión reducida, proporcionando el producto.

2c: síntesis de 1,1-bis(2-mesiloxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



25 El producto del Ejemplo 2b (1,1-bis(2-hidroxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano) (10 mmoles) se disolvió en diclorometano enfriado con hielo (10 ml). Se añadió piridina (40 mmoles, 3,24 g) y cloruro de metanosulfonilo (3,44 g, 30 mmoles), manteniendo el último con una temperatura interna <5°C. Tras tres horas, se añadió éter (30 ml) y agua (7 ml). Tras la separación de fases, se lavó la capa orgánica con HCl 2 M, solución acuosa al 5% de hidrogenocarbonato de sodio y agua. Tras el secado sobre sulfato de magnesio se evaporaron los volátiles, rindiendo el producto.

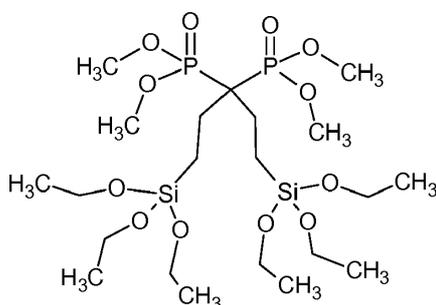
35 *2d: 1,1-divinil-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano*



5 A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(2-mesiloxietil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (50 g, 104 mmoles) en THF seco (500 ml) bajo nitrógeno se añadió dietil-isopropiletilamina (300 mmoles). Se retiró el baño de hielo tras 30 minutos y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron con éter (300 ml). Se agitó sílice (100 g) y carbón activado (15) y se filtró la suspensión y la torta de filtración se lavó con 3x 200 ml de éter. El producto se obtuvo después de la eliminación del solvente.

10

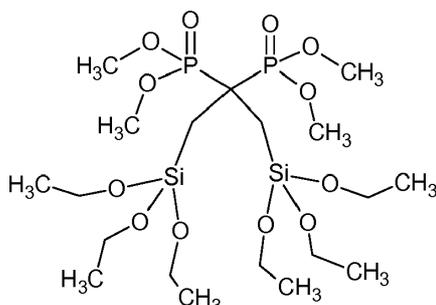
2e: 1,1-bis(2-trimetoxisililetil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



15 A una solución de 1,1-divinil-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (Ejemplo 2d) (2,0 mmoles) en tolueno seco (20 ml) se añadieron 80 µl de una solución de catalizador de Karstedt en tolueno (Pt al 25) y trietoxisilano (6,0 mmoles, 4,1 ml). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 2 días. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el silano residual mediante dos ciclos de adición de tolueno-vacío. Se añadió el residuo a tolueno, se trató con una pequeña cantidad de carbón activado, se pasó por un filtro de PTFE de 5 µm, y se purificó mediante cromatografía flash en una columna de sílice con diclorometano + metanol al 0-10% como eluyente, rindiendo el producto deseado.

20

Ejemplo 3: síntesis de 1,1-bis(trimetoxisililmetil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano



25

A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(dimetil)fosfonato)metano (50 g, 215 mmoles) en THF seco (500 ml) bajo nitrógeno se añadió hidruro sódico (18,9 g, al 60% en aceite mineral, 474 mmoles) en tres partes, durante 30 minutos. La mezcla se agitó durante 3 horas y después se añadió en partes clorometiltrietoxisilano (500 mmoles), manteniendo la temperatura interna a menos de 5°C. Se retiró el baño de hielo después de tres horas y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción con un baño de hielo nuevamente y se desactivó mediante la adición de 50 ml de cloruro amónico acuoso saturado.

30

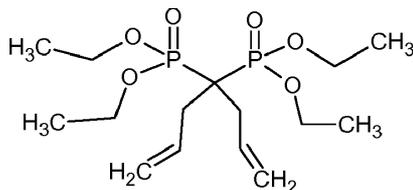
Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron en diclorometano (300 ml). Se añadió sílice (100 g) bajo agitación y se filtró la suspensión y la torta de filtración se lavó con 3x 200 ml de diclorometano. El producto se obtuvo después de la eliminación de los solventes.

35

Ejemplo 4: síntesis de 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(dietilfosfonato)metano

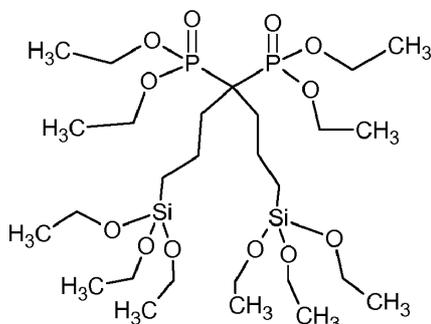
4a: 1,1-dialil-1,1-bis(dietilfosfonato)metano

40



- 5 A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(dietilfosfonato)metano (4,97 g, 20 mmoles) en THF seco (50 ml) bajo nitrógeno se añadió bromuro de alilo (8,7 ml, 100 mmoles). Durante un periodo de dos horas se añadió terc-butóxido de potasio (6,8 g, 60 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente y después se desactivó mediante la adición de 50 ml de solución acuosa saturada de cloruro amónico. Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron en diclorometano. La cromatografía flash en sílice con diclorometano+metanol (gradiente de 0-10%)
 10 proporcionó producto esencialmente puro (RMN).

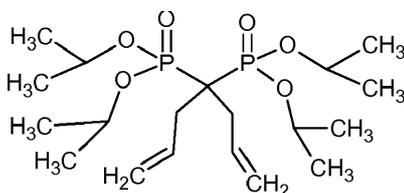
4b: 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(dietilfosfonato)metano



- 15 A una solución de 1,1-dialil-1,1-bis(dietilfosfonato)metano (Ejemplo 2a) (4,4 g, 14,2 mmoles) en tolueno seco (25 ml) se añadieron 212 µl de una solución de catalizador de Karstedt en tolueno (Pt al 2%) y trietoxisilano (42,7 mmoles, 7,8 ml). La solución se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el silano residual mediante dos ciclos de adición de tolueno-vacío. Se añadió el residuo a tolueno, se trató con una
 20 pequeña cantidad de carbón activado, se pasó por un filtro de PTFE de 5 µm, y se purificó mediante cromatografía flash en una columna de sílice con diclorometano + metanol al 0-10% como eluyente. Rendimiento: 6,9 g de material con una pureza de 90% según RMN.

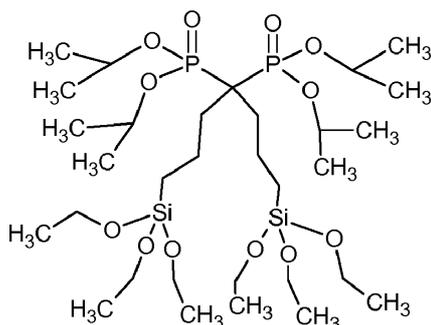
Ejemplo 5: síntesis de 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(diisopropilfosfonato)metano

- 25 5a: 1,1-dialil-1,1-bis(diisopropilfosfonato)metano



- 30 A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(diisopropilfosfonato)metano (6,44 ml, 20 mmoles) en THF seco (50 ml) bajo nitrógeno se añadió bromuro de alilo (8,7 ml, 100 mmoles). Durante un periodo de dos horas se añadió terc-butóxido de potasio (6,8 g, 60 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente y después se desactivó mediante la adición de 50 ml de solución acuosa saturada de cloruro amónico. Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron en diclorometano. La cromatografía flash en sílice con diclorometano+metanol (gradiente de 0-10%)
 35 proporcionó 6,5 g de producto esencialmente puro (RMN).

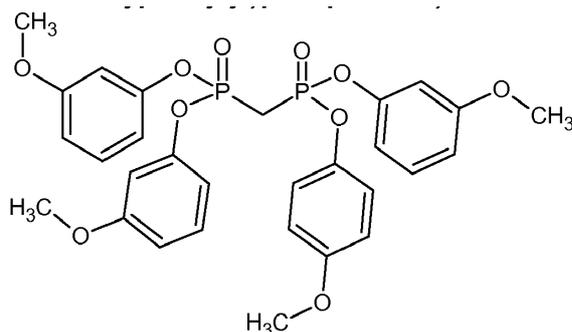
5b: 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(diisopropilfosfonato)metano



5 A una solución de 1,1-dialil-1,1-bis(diisopropilfosfonato)metano (Ejemplo 2a) (0,736 g, 2,0 mmoles) en tolueno seco (20 ml) se añadieron 80 μ l de una solución de catalizador de Karstedt en tolueno (Pt al 2%) y trietoxisilano (6,0 mmoles, 4,1 ml). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 2 días. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el silano residual mediante dos ciclos de adición de tolueno-vacío. Se añadió el residuo a tolueno, se trató con una pequeña cantidad de carbón activado, se pasó por un filtro de PTFE de 5 μ m, y se purificó mediante cromatografía flash en una columna de sílice con diclorometano + metanol al 0-10% como eluyente. Rendimiento: 1,0 g de material con una pureza de 90% según RMN.

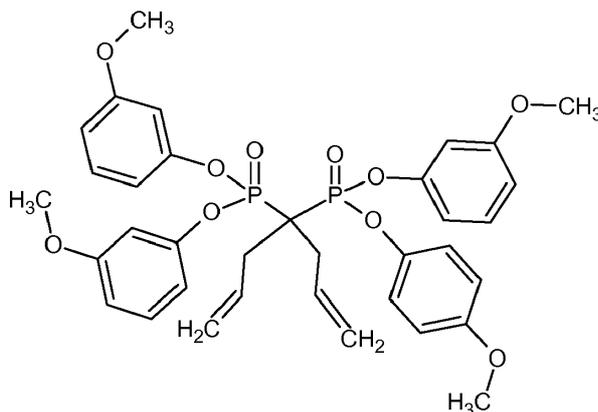
Ejemplo 6: síntesis de 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano

6a: 1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano



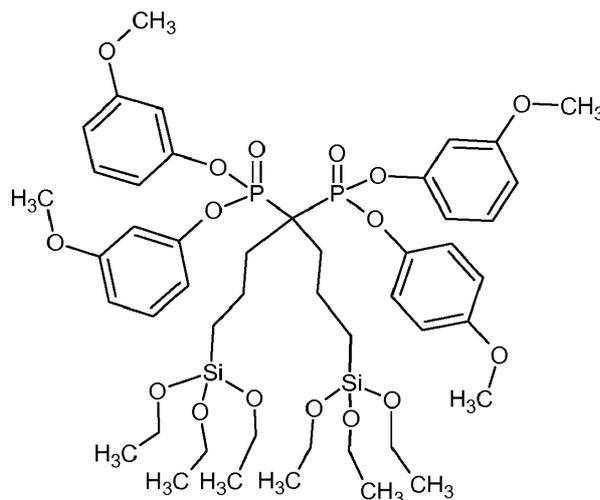
20 A una solución enfriada con hielo de bis(diclorofosfonato)metano en diclorometano seco (50 ml) se añadió 3-metoxifenol (1,76 ml, 16 mmoles). Una solución de trietilamina (4,91 ml, 32 mmoles) se añadió durante un periodo de 1 h. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas, seguido del vertido de la misma sobre hielo-agua (150 ml). Se añadió diclorometano y se separaron las fases (lentamente). La fase acuosa se extrajo una vez más con diclorometano y las fases orgánicas agrupadas se secaron sobre sulfato sódico. Tras la evaporación, el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash en sílice (altura de la columna: 10 cm; diámetro: 3 cm). El producto se obtuvo en forma de un aceite marrón pálido y la espectroscopia de RMN indicó una pureza elevada. Rendimiento: 0,93 g.

25 6b: 1,1-dialil-1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano



Se suspendió hidruro sódico (0,683 g, al 60% en aceite mineral, 17,1 mmoles) en THF seco (150 ml) y se enfrió a -30°C. Se añadió una solución de 1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano (Ejemplo 4a, 2,92 g, 4,87 mmoles) en THF seco durante 30 minutos, manteniendo simultáneamente la temperatura a -30°C. Se añadió bromuro de alilo (48,8 mmoles, 4,21 ml) y la mezcla de reacción se mantuvo a -15°C durante una hora, calentando después hasta 40°C durante 5 días. El contenido se añadió a 75 ml de solución acuosa saturada de cloruro de amonio. Se evaporaron los volátiles a presión reducida y los sólidos se trituraron con diclorometano, extrayendo los orgánicos. Tras el secado sobre sulfato sódico y la evaporación del solvente, el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash en sílice con heptano:acetato de etilo 6:4 como el eluyente. Rendimiento: 1,28 g.

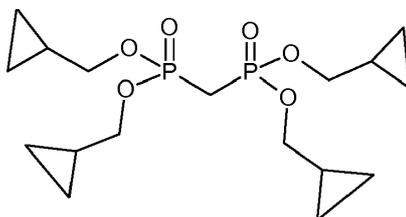
6c: 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano



A una solución de 1,1-dialil-1,1-bis(di-(3-metoxifenilil)fosfonato)metano (Ejemplo 4b) (0,794 g, 1,16 mmoles) en tolueno seco (20 ml) se añadieron 50 µl de una solución de catalizador de Karstedt en tolueno (Pt al 2%) y trietoxisilano (1,16 mmoles, 0,459 ml). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 4 días y cada día se realizó una adición de 0,7 g de silano y 25 µl del catalizador. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el silano residual mediante dos ciclos adicionales de adición de tolueno-vacío. Se añadió el residuo a tolueno, se trató con una pequeña cantidad de carbón activado, se pasó por un filtro de PTFE de 5 µm, y se purificó mediante cromatografía flash en una columna de sílice con acetato de etilo:tolueno 1:1 como el eluyente. Rendimiento: 150 mg.

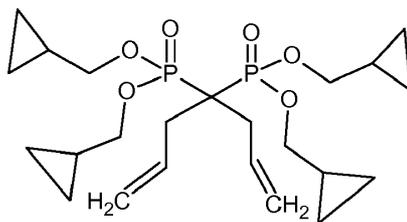
Ejemplo 7: síntesis de 1,1-bis(3-trimetoxisililpropil)-1,1-bis(di-ciclopropilmetil)fosfonato)metano.

7a: 1,1-bis(di-ciclopropilmetil)fosfonato)metano



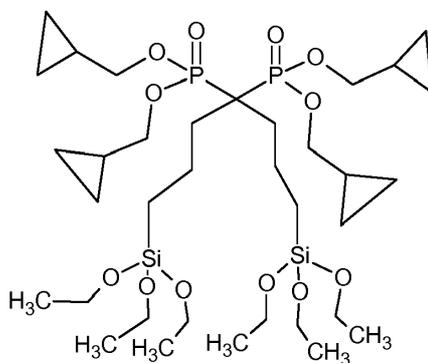
A una solución enfriada con hielo de bis(diclorofosfonato)metano (1,00 g) en diclorometano seco (50 ml) se añadió ciclopropilmetanol (1,15 g, 16 mmoles). Una solución de trietilamina (4,91 ml, 32 mmoles) se añadió durante un periodo de 1 h. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas, seguido del vertido de la misma sobre hielo-agua (150 ml). Se añadió diclorometano y se separaron las fases (lentamente). La fase acuosa se extrajo una vez más con diclorometano y las fases orgánicas agrupadas se secaron sobre sulfato sódico. Tras la evaporación, el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash en sílice (altura de la columna: 10 cm; diámetro: 3 cm). El producto se obtuvo en forma de un aceite incoloro y la espectroscopia de RMN indicó una pureza elevada. Rendimiento: 1,04 g, 66%.

7b: 1,1-dialil-1,1-bis(di-(ciclopropilmetil)fosfonato)metano



5 A una solución enfriada con hielo de 1,1-bis(di-ciclopropilmetil)fosfonato)metano (Ejemplo 5a) (0,794 g, 1,16 mmoles) en THF seco (20 ml) bajo nitrógeno se añadió bromuro de alilo (0,864 ml, 10 mmoles). Durante un período de dos horas se añadió terc-butóxido de potasio (0,66 g). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y después se desactivó mediante la adición de 3 ml de solución acuosa saturada de cloruro amónico. Se eliminaron los volátiles al vacío y los orgánicos se disolvieron con diclorometano. La cromatografía flash en sílice en heptano:acetato de etilo 3:7 proporcionó 0,4 de producto puro. 64%.

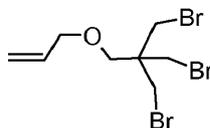
10 *7c: 1,1-bis(3-trietoxisililpropil)-1,1-bis(di-ciclopropilmetil)fosfonato)metano*



15 A una solución de 1,1-dialil-1,1-bis(di-(ciclopropilmetil)fosfonato)-metano (Ejemplo 5b) (0,373 g, 0,76 mmoles) en tolueno seco (20 ml) se añadieron 30 μ l de una solución de catalizador de Karstedt en tolueno (Pt al 2%) y trietoxisilano (1,59 mmoles, 0,299 ml). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 4 días y cada día se realizó una adición de 0,15 ml de silano y 15 μ l de catalizador. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el silano residual mediante dos ciclos adicionales de adición de tolueno-vacío. Se añadió el residuo a tolueno, se trató con una pequeña cantidad de carbón activado, se pasó por un filtro de PTFE de 5 μ m, y se purificó mediante cromatografía flash en una columna de sílice con diclorometano + metanol al 5% como eluyente. Rendimiento: 376 mg.

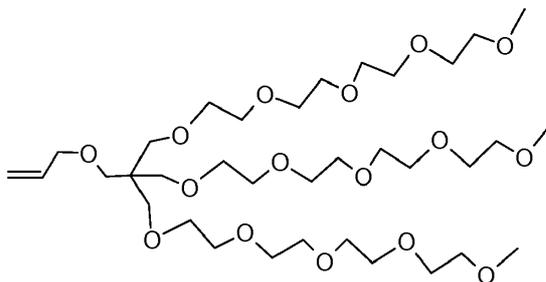
20 Ejemplo 8: síntesis de una nanoestructura Y1 conjugada con amida N-(2-aminoetil)-16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oica

25 *Ejemplo 8a-h: 3-(3-bromo-2,2-bis(bromometil)propoxi)prop-1-eno*



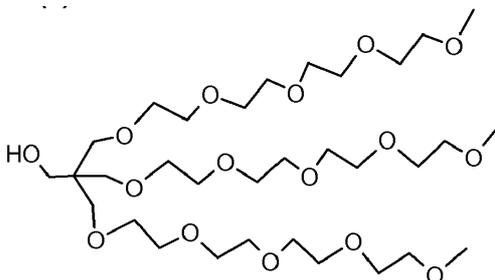
30 Se añadió cuidadosamente hidruro sodico (1,67 g, 42 mmoles) a 3-bromo-2,2-bis(bromometil)propanol (9,75 g, 30 mmoles) y bromuro de alilo (12,9 ml, 150 mmoles) en DMF seco y desgasificado (40 ml) bajo nitrógeno a 0°C. A continuación, se incrementó la temperatura hasta la temperatura ambiente (22°C) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h adicionales. A continuación, se añadió cuidadosamente la mezcla de reacción a una solución acuosa saturada de NH₄Cl (50 ml). Seguidamente se extrajo la fase H₂O con éter dietílico (2x 50 ml) y las fases orgánicas agrupadas se lavaron con H₂O (5x 50 ml) y después solución hipersalina (50 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, seguido de filtración. Se eliminaron los materiales volátiles a presión reducida, proporcionando un aceite amarillo pálido (9,7 g). La cromatografía de columna en sílice (heptano:EtOAc 9:1) proporcionó 6,6 g (62%) del producto en forma de un aceite transparente. RMN-¹H (CDCl₃); 5.93 (m, 1H), 5.28 (m, 2H), 4.05 (d, 2H), 3.58 (s, 6H), 3.52 (s, 2H).

40 *Ejemplo 8b: 16-(aliloximetil)-16-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18,21,24,27,30-decaoxahentriacontano*



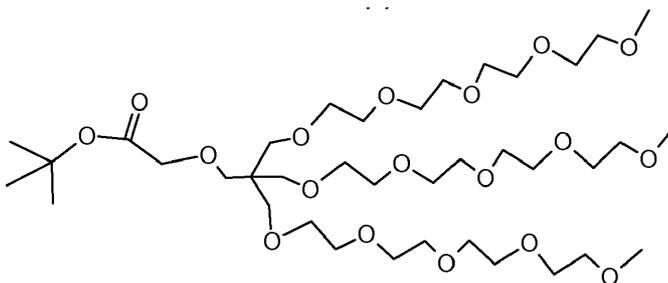
5 Monometil éter de tetraetilenglicol (1,91 ml, 9 mmoles) disuelto en DMF seco y desgasificado (3,5 ml, seco 24 h, EM 4 Å) se añadió cuidadosamente a hidruro sódico (365 mg, 9 mmoles) en DMF seco y desgasificado (15 ml, secado 24 h, EM 4 Å) bajo nitrógeno a 0°C utilizando una jeringa. A continuación, se elevó la temperatura hasta la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales. Seguidamente se añadió 3-(3-bromo-2,2-bis(bromometil)propoxi)prop-1-eno (730 mg, 2,0 mmoles) y se elevó la temperatura a 100°C. Tras 14 h, se había completado la reacción (HPLC-ELSD-C18, 95:5 a 5:95 H₂O/ACN en 25 min, Rt producto=19,5 min); se redujo la temperatura hasta la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se añadió cuidadosamente a H₂O (150 ml) y la fase de H₂O se lavó con éter dietílico (2x 50 ml). A continuación, se añadió cloruro sódico a la fase de H₂O hasta la saturación. La fase H₂O se extrajo con EtOAc (4x 50 ml) y las fases orgánicas agrupadas se lavaron con solución hipersalina (2x 30 ml). Se añadió sulfato sódico y carbón a la fase orgánica. La fase orgánica transparente se filtró y se eliminó el material volátil a presión reducida (8 mm de Hg, 40°C, después 0,1 mm Hg (bomba de aceite) y 40°C para eliminar el DMF residual). La cromatografía de columna (EtOAc:MeOH 9:1) proporcionó 1,05 g (70%) del producto. RMN-¹H (CDCl₃); 5.90 (m, 1H), 5.20 (m, 2H), 3.94 (dt, 2H), 3.70-3.55 (m, 48H), 3.45 (s, 6H), 3.43 (s, 2H), 3.40 (s, 9H).

20 *Ejemplo 8c: 16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14-pentaoxahetadecán-17-ol (4)*



25 Se añadió terc-butóxido de potasio (74 mg, 0,66 mmoles) a 2 (500 mg, 0,66 mmoles) en DMSO (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 15 min. El análisis de HPLC (HPLC-ELSD-C18, 95:5 a 5:95 H₂O/ACN en 25 min) indicó la conversión completa en el producto. Se añadió solución hipersalina (20 ml) a temperatura ambiente y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x 20 ml). Las fases orgánicas agrupadas se lavaron con solución hipersalina (3x 20 ml) y se secaron con sulfato sódico. La filtración y eliminación del material volátil a presión reducida proporcionó 16-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-16-((prop-1-eniloxi)metil)-2,5,8,11,14,18,21,24,27,30-decaoxahentriacontano en forma de un aceite transparente. A continuación, se añadió HCl (0,1 M) al aceite disuelto en acetona (4 ml) y la mezcla se agitó a 55°C durante 30 min. Seguidamente, se eliminó el material volátil a presión reducida, proporcionando 420 mg (89%) de 4 en forma de un aceite transparente. RMN-¹H (CDCl₃); 3.66-3.52 (m, 48H), 3.47 (s, 6H), 3.37 (s, 9H).

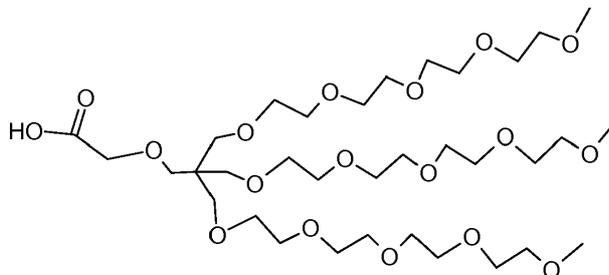
35 *Ejemplo 8d: 16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oato de terc-butilo (5)*



Se añadió terc-butóxido de potasio (32 mg, 0,28 mmoles) a 4 (100 mg, 0,14 mmoles) y terc-butil-2-bromo-acetato (105

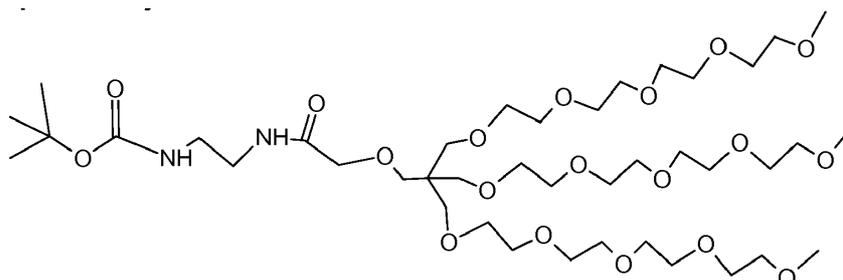
5 mg, 0,54 mmoles) en THF seco (3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Se añadió éter dietílico (10 ml) y solución hipersalina (5 ml) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x 20 ml). Las fases orgánicas agrupadas se lavaron con solución hipersalina y después se secaron con sulfato sódico. Se eliminó el material volátil a presión reducida y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna (acetato de etilo/metanol, 9:1), proporcionando 60 mg (52%) de 5. RMN-¹H (CDCl₃); 3.91 (s, 2H), 3.66-3.52 (m, 48H), 3.51 (s, 2H), 3.45 (s, 6H), 3.37 (s, 9H), 1.46 (s, 9H).

Ejemplo 8e: ácido 16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oico (6)



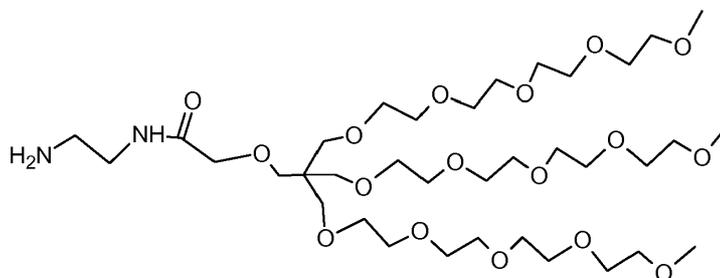
10 Se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 0,5 ml) y diclorometano (0,5 ml) a 20 mg de 5. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se eliminaron los materiales volátiles a presión reducida, proporcionando 18 mg de 6 en forma de un aceite amarillo.

15 *Ejemplo 8f: amida de ácido N-(2-t-butoxicarbonilamidoetil)-16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oico*



20 Se añadió hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (95 mg, 0,25 mmoles) a ácido 16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oico (Ejemplo 8e) (153 mg, 0,2 mmoles), N-BOC-etilén-diamina (40 mg, 0,25 mmoles) y diisopropiltilamina (87 µl, 0,5 mmoles) en DMF (1 ml, EM 4 Å seco y se desgasificó) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 20 h. Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y la mezcla se extrajo 3 veces con H₂O. Las fases acuosas agrupadas se saturaron con NaCl (s) y después se extrajeron 4 veces con EtOAc. Las fases orgánicas agrupadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y el solvente se eliminó a presión reducida, proporcionando 190 mg (cuant.) del producto en forma de un aceite amarillo pálido. Análisis de HPLC (HPLC-ELSD-C18, 90:10 a 5:95 TFA al 0,1% en H₂O/ACN en 20 min) mostró un único pico en 14,5 min.

30 *Ejemplo 8g: amida de ácido N-(2-aminoetil)-16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oico*



35 Se añadió TFA (2 ml) a amida de ácido N-(2-t-butoxicarbonilamidoetil)-16,16-di-2,5,8,11,14-pentaoxapentadecil-2,5,8,11,14,18-hexaoxaicosán-20-oico (Ejemplo 8f, 160 mg, 0,18 mmoles) en diclorometano (2 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida y el residuo se coevaporó dos veces con tolueno seco (Al₂O₃) y después se secó utilizando una bomba de aceite. Lo anterior

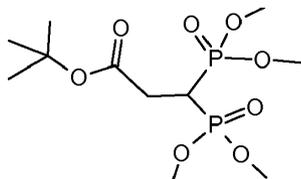
proporcionó 130 mg del producto. Análisis de HPLC (HPLC-ELSD-C18, 90:10 a 5:95 TFA al 0,1% en H₂O/MeCN en 20 min): mostró un único pico en 10,7 min. EM (ESP+) [M]: 807,5.

Ejemplo 8h: conjugación

5 Se disolvió la nanoestructura X1 (Ejemplo 10c, 100 mg, 0,4 mmoles P eq.) en H₂O (2 ml) mediante sonicación. Se ajustó el pH de 1,9 a 10,4 utilizando 6 y NaOH 1 M (aq.). A continuación, se añadió cloruro de manganeso (12,5 mg, 0,065 mmoles) disuelto en H₂O (2 ml). La mezcla se agitó durante 30 min a 30°C. Se ajustó el pH de 8,5 a 7,1 utilizando HCl 0,1 (aq.) y el material del Ejemplo 8q (37 mg, 0,04 mmoles) y sal sódica de N-hidroxisuccinimida (9 mg, 0,04 mmoles) se añadió disuelto en H₂O (2 ml). A continuación, se añadió hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida (24 mg, 0,12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas y después se filtró (filtro de tubo de 5 µm). El filtrado se filtró mediante centrifugación (corte: 10 K, 3000 G durante 30 min) y el concentrado (4 ml) se diluyó a 15 ml con H₂O. Se repitió este procedimiento 4 veces. El pH del concentrado (4 ml) se ajustó de 4,7 a 7,1 utilizando NaOH 0,1 M (aq.). El filtrado se filtró mediante centrifugación (corte: 10 K, 3000 G durante 15 min) y el concentrado (0,5 ml) se diluyó a 4 ml con H₂O. Se repitió este procedimiento 4 veces. Se filtró el concentrado final (filtro de jeringa, 0,2 µm) y se diluyó a 2 ml con H₂O. Distribución de los tamaños de partícula=4-5 nm. Análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,3 min

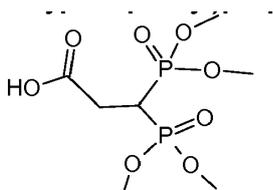
20 Ejemplo 9: síntesis de polietilenimina-bisfosfonato nanoestructura Z.

Ejemplo 9a-h: t-butil-éster de ácido 3,3-bis(dimetoxifosforil)propanoico



25 A una solución enfriada con hielo de bis(dimetoxifosforil)metano (4,64 g, 20 mmoles) y bromoacetato de terc-butilo (7,35 ml, 50 mmoles) en THF seco (40 ml) bajo nitrógeno se añadió terc-butóxido de potasio (5,8 g, 43 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y después se desactivó con 4 ml de solución acuosa saturada de cloruro amónico. Se eliminaron los volátiles al vacío y mediante dos ciclos de adición de tolueno y evaporación. La cromatografía flash en diclorometano:metanol, 95:5, proporcionó el producto en forma de un aceite. Rendimiento: 4,0 g.

Ejemplo 9b: ácido 3,3-bis(dimetoxifosforil)propanoico



35 A una solución de t-butil-éster de ácido 3,3-bis(dimetoxifosforil)propanoico (2,5 g) en diclorometano (10 ml) se añadió ácido trifluoroacético. Tras la agitación a temperatura ambiente se realizó la evaporación de los volátiles al vacío. Tres ciclos de evaporación al vacío de porciones de 5 ml de tolueno proporcionaron 2,2 g de producto.

Ejemplo 9c: síntesis de polietilenimina-bisfosfonato nanoestructura Z.

45 Se disolvió en H₂O (10 ml) mediante sonicación (10 min) polietilenimina ramificada con un peso molecular medio de 25 kDa (100 mg, 2,5 mmoles de grupos amino primarios), ácido 3,3-bis(dimetoxifosforil)propanoico (1,1 g, 3,87 mmoles) y sal sódica de N-hidroxisuccinimida (100 mg, 0,46 mmoles). Se ajustó el pH de 1,8 a 6,5 utilizando NaOH 1 M, seguido de la adición de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (1,0 g, 5,2 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 23 h y después se filtró (filtro de jeringa de 5 µm). El filtrado se filtró mediante centrifugación (corte: 10 K, 3000 G durante 30 min) y el retenido (2 ml) se diluyó a 10 ml con H₂O. Se repitió este procedimiento 4 veces. El retenido final (2 ml) se diluyó a 6 ml con H₂O. Distribución de los tamaños de partícula medios en volumen según la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés): 4-5 nm. Análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,1 min.

55 Ejemplo 10: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano, rindiendo las nanoestructuras X

Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (x g, y mmoles, ver la Tabla 1, posteriormente) en 200 ml de 1-propanol acuoso al 80% en un recipiente a presión. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a 95°C y después durante 24 h a 110°C. Tras dejar enfriar la solución transparente hasta la temperatura ambiente, se diluyó con H₂O MilliQ (800 ml) y después se diafiltró utilizando una columna de tamaño de poro de corte de peso molecular nominal 300k (NMWC, por sus siglas en inglés) (cartucho de filtración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-300-C-3MA). Los permeados recogidos (-980 ml) a continuación se recogieron en una columna de diafiltración de 100 k de tamaño de poro NMWC (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-100-C-3MA) para concentrar la solución de nanoestructura. Alternativamente, también se han utilizado filtros de Pall Life Sciences, específicamente los casetes de serie T Centramate OS0100T02 (casete de tamaño de poro NMWC 100k). Se llevó a cabo la adición repetida de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. El volumen final del retenido (X1) fue de aproximadamente 50 ml.

Además, el permeado que pasaba por la columna de diafiltración de 100 k se recogió y después se filtró utilizando un cartucho de filtro de tamaño de poro NMWC 30 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-30-C-3MA). Se llevó a cabo la adición repetida (2x) de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. El volumen final del retenido (X2) fue de aproximadamente 50 ml.

Ejemplo 10a-h: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano 100 mM

X1a. Cantidades: x=12,8 g, y=20 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=26% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,2 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=0,9.

X2a. Cantidades: x=12,8 g, y=20 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=17% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,3 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=0,9.

Ejemplo 10b: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano 80 mM

X1b. Cantidades: x=10,4 g, y=16 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=31% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,2 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=1,1.

X2b. Cantidades: x=10,4 g, y=16 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=19% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,4 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=1,1.

Ejemplo 10c: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano 50 mM

X1c. Cantidades: x=6,4 g, y=10 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=21% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,7 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=0,9.

X2c. Cantidades: x=6,4 g, y=10 mmoles. Recuperación después de la diafiltración=25% (basada en la recuperación de P); pH final~2; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,5 min; Composición (ICP, proporción en moles): P/Si=0,9.

Ejemplo 10d: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano, rindiendo las nanoestructuras X en diferentes solventes

Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (3,2 g, 5 mmoles) en etilenglicol acuoso al 80% (100 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 21 h a 116°C. La polimerización también puede llevarse a cabo tal como anteriormente, aunque en 1,2-propanodiol acuoso al 80% agitado durante 24 h a 111°C y después durante 4 h a 114°C o en dietilenglicol acuoso al 80% agitado durante 20 h a 108°C y después durante 2 h a 114°C, o en trietilenglicol acuoso al 80% agitado durante 22 h a 115°C o en metil-éter de dietilenglicol acuoso al 80% agitado durante 18 h a 106°C y después durante 18 h a 111°C o en monoetil-éter de dietilenglicol acuoso al 80% agitado durante 35 h a 107°C o en glicerol acuoso al 80% agitado durante 19 h a 114°C.

Ejemplo 10e: secuestro de Pt de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano

SIR-200 (100 g, resina quelante, tiol, forma H) proporcionada por Resintech se agitó dos veces con solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico (500 ml) y después se agitó dos veces con agua MilliQ. Se separó el agua por filtración y se añadió tolueno seco (100 ml) a SIR-200. Se eliminaron los volátiles al vacío y se eliminó el agua residual mediante dos ciclos de adición de tolueno-vacío. Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (30 g, contenido de platino: 39 ppm) en tolueno seco (300 ml) en un recipiente. Se añadió SIR-200 (10 g, tratado tal como

anteriormente) y después se agitó durante la noche. Se separó SIR-200 mediante filtración y se eliminaron los volátiles al vacío, rindiendo un material con un contenido de platino de 0,38 ppm.

5 Ejemplo 11. Carga de manganeso de la nanoestructura X y purificación mediante filtración de flujo tangencial para rendir nanoestructuras Y.

10 Se ajustó el pH de una solución de nanoestructura X (Ejemplo 13) de pH 2 a pH 10,4 utilizando NaOH (aq.) 6 M y 1 M y se dejó en reposo durante 2 h. A continuación, se añadió tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (xx mg, yy mmoles) y se disolvió. La mezcla se agitó durante 1 h a 30°C. El pH de la mezcla después de la reacción era de aproximadamente pH 7,6 y se ajustó adicionalmente a pH 7,4 utilizando HCl 1 M (aq.). La mezcla reaccionada se diluyó a 50 ml con H₂O MilliQ y después se sometió a diafiltración utilizando una columna de tamaño de poro NMWC 10 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-10-C-3MA), para eliminar los iones Mn libres. Alternativamente, también se utilizó un filtro de Pall Life Sciences, específicamente los casetes de serie T Centramate OS010T02 (casete de tamaño de poro NMWC 10k). Se recogió el retenido y se llevó a cabo el procedimiento de dilución y diafiltración repetidamente tres veces.

20 Y1a. Nanoestructura X utilizada: Ejemplo X1a, 15 ml, 3,2 mmoles de P. MnCl₂ · 4H₂O utilizado: xx=106,7 mg, yy=0,54 mmoles. pH final: 7,4; tamaño de partículas en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=5,6 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7.4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,5 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=5,7, P/Si=0,9, Si/Mn=6,2; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=45% y a pH 7=62%.

25 Y1b. Nanoestructura X utilizada: Ejemplo X1a, 15 ml, 3,2 mmoles de P. MnCl₂ · 4H₂O utilizado: xx=107 mg, yy=0,54 mmoles. pH final: 7,4; tamaño de partículas en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=6,5 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7.4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,1 min y hombro en 9 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=5,4, P/Si=0,9, Si/Mn=6; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=47% y a pH 7=66%.

30 Y2a. Nanoestructura X utilizada: Ejemplo X2a, 15 ml, 2 mmoles de P. MnCl₂ · 4H₂O utilizado: xx=71 mg, yy=0,36 mmoles. pH final: 7,4; tamaño de partículas en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=4,1 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7.4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,5 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=6,6, P/Si=0,9, Si/Mn=7,3; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=43% y a pH 7=60%; r₁ a 81,33 MHz, 25°C=41 mM⁻¹ Mn s⁻¹.

35 Y2b. Nanoestructura X utilizada: Ejemplo X2a, 15 ml, 2 mmoles de P. MnCl₂ · 4H₂O utilizado: xx=71 mg, yy=0,36 mmoles. pH final: 7,4; tamaño de partículas en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=5,6 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7.4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,1 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=5,6, P/Si=0,9, Si/Mn=6,2; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=44% y a pH 7=63%.

40 *Ejemplo 11a-h: polimerización de 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano, rindiendo las nanoestructuras X 11a':*

45 Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (0,64 g, 1 mmol) en etilenglicol acuoso al 80% (12 ml). Se disolvió formato sódico en el intervalo de 28 mg (0,42 mmoles) o 140 mg (2,1 mmoles) y tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (33 mg, 0,17 mmoles) en etilenglicol acuoso al 80% (4 ml) cada uno y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción, que se agitó durante 22 h a 114°C.

11a'':

50 Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (0,64 g, 1 mmol) en etilenglicol acuoso al 80% (12 ml). Se disolvió formato potásico (52 mg, 0,62 mmoles) y tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (33 mg, 0,17 mmoles) en etilenglicol acuoso al 80% (4 ml) cada uno y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción, que se agitó durante 21 h a 116°C.

11a''':

55 Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (0,64 g, 1 mmol) en etilenglicol acuoso al 80% (16 ml). Se disolvió formato de tetrametilamonio (solución al 30% en peso en agua, 0,245 ml, 0,62 mmoles) y tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (33 mg, 0,17 mmoles) en etilenglicol acuoso al 80% (4 ml) cada uno y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción, que se agitó durante 21 h a 116°C.

60 *Ejemplo 11b: carga de manganeso de nanoestructura X, 'endurecimiento' con la adición de silanos y la purificación mediante diafiltración, rindiendo las nanoestructuras Z.*

65 A 2 ml de solución de nanoestructura X (Ejemplo 10f) se añadieron x ml de tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) desgasificado (disuelto en etilenglicol acuoso al 80%, 100 mM) que satisfacía una proporción molar de fósforo-manganeso de 12. Se añadieron y ml de formato sódico desgasificado (100 mM) disueltos en etilenglicol acuoso al

80% a la solución de nanoestructuras cargadas de Mn que satisfacía una proporción molar de formato sódico-manganeso de 5 o 3. Se comprobó el pH final y se ajustó a aproximadamente pH 5 o 3 en caso necesario mediante la adición de NaOH (aq.) o HCl (aq.). La mezcla se agitó durante 12 o 18 h a 100°C. Se añadieron z ml de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) disueltos en etanol (120 mM) a la mezcla y se agitaron adicionalmente durante 18 o 24 h a 100°C (una alternativa a la post-adición de TEO después de la primera etapa de calentamiento es la incorporación de solución de TEOS directamente en la solución de nanoestructuras cargadas con Mn que contiene formato de Na y agitación durante 12 o 18 h a 100°C).

Tras el calentamiento y la agitación, se ajustó el pH a pH $7,0 \pm 0,5$ mediante la adición de NaOH (aq.), seguido de la ultrafiltración (UF) utilizando un filtro de centrífuga de 100 kDa de 4 ml (Centriprep® de Millipore). La solución en primer lugar se diluyó con Milli-Q a aproximadamente 4 ml y se centrifugó durante 10 a 15 min (3000xg). Se recogió el filtrado y se transfirió a un filtro de centrífuga de 10 kDa de 4 ml (Centriprep® de Millipore), se diluyó hasta 4 ml con agua Milli-Q, se mezcló vigorosamente y se filtró mediante centrifugación (3000xg, 10 min); después se recogieron aproximadamente 500 μ l de retenido. El procedimiento de dilución y diafiltración se repitió tres veces. El retenido final recogido de 500 μ l se diluyó a 1 ml con agua MilliQ. Después se determinó la concentración de Mn. La prueba de estabilidad complexométrica se evaluó mediante relaxometría (Ejemplo 14b), análisis de GPC y análisis composicional (medición de ICP). Z1a. 3% TEOS respecto a bisbis] Nanoestructura X utilizada: 2 ml, 0,2 mmoles de P; x=167 μ l; proporción de formato de Na-Mn: 5; y=835 μ l; z=25 μ l; pH final antes del calentamiento: pH 5; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=12,6 min; Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=11,61, P/Si=1,01, Si/Mn=10,51; Estabilidad complexométrica a pH 7=24%

Z1b. 5% TEOS respecto a Bisbis] Nanoestructura X utilizada: 2 ml, 0,2 mmoles de P; x=167 μ l; proporción de formato de Na-Mn: 5; y=835 μ l; z=41,7 μ l; pH final antes del calentamiento: pH 5; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=12,6 min; Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=12,05, P/Si=1,02, Si/Mn=11,77; Estabilidad complexométrica a pH 7=23%

Z1c. 3% TEOS respecto a bisbis. Nanoestructura X utilizada: 2 ml, 0,2 mmoles de P; x=167 μ l; proporción de formato de Na-Mn: 5; y=835 μ l; z=25 μ l; pH final antes del calentamiento: pH 3,5; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=12,6 min; Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=13,03, P/Si=0,93, Si/Mn=13,96; Estabilidad complexométrica a pH 7=27%

Z1d. 5% TEOS respecto a bisbis. Nanoestructura X utilizada: PL04064, 2 ml, 0,2 mmoles de P; x=167 μ l; proporción de formato de Na-Mn: 5; y=835 μ l; z=41,7 μ l; pH final antes del calentamiento: pH 3,5; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=12,6 min; Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=13,31, P/Si=0,92, Si/Mn=14,53; Estabilidad complexométrica a pH 7=26%

Tabla 1: más ejemplos de nanoestructuras Y cargadas con Mn:

Polímero bisbis		cargado con MnCl ₂ ·4H ₂ O		pH de bisbis antes de la carga con Mn	Temperatura de reacción (°C)	Periodo de reacción (h)	Tamaño de la nanoestructura*		Composición ICP			Estabilidad ex (% de Mn)	Relaxividad, ml /mM·Mn /5)	
ID	Volumen (ml)	Cantidad (mmoles P)	masa (mg)	cantidad (mmoles)			DL5 (nm)	GPC (min)	P/Mn	P/Si	Si/Mn	a pH 5,5	a pH 7,0	
X2a	4	0,11	12,1	0,06	10,4	30	8,7	10,1	3,1	0,9	3,5	26	33	34
X2a	4	0,22	11,9	0,06	10,4	30	4,5	10,3	4,3	0,9	4,8	34	45	40
X2a	4	0,33	11,8	0,06	10,4	30	5,6	10,4	6,9	0,9	7,6	51	69	44
X2a	4	0,44	12	0,06	10,4	30	4,8	10,5	8,3	0,9	9,3	63	83	44
X2a	4	0,54	12	0,06	10,4	30	5,6	10,2	11,7	0,9	12,8	86	100	40
X1b	4	0,81	14,2	0,07	10,4	30	6,5		6'			71	88	
X1b	4	0,81	14,2	0,07	10,4	60	7,5	9,4	5,4	1,1	4,8	72	87	44
X1b	4	0,81	13,9	0,07	10,4	100	6,5		6'			80	84	
X2b	4	0,48	15	0,08	10,4	30	4,8		6'			50	66	
X2b	4	0,48	14,3	0,07	10,4	60	7,5	10,9	4,8	1	4,8	48	60	41
X2b	4	0,48	15,2	0,08	10,4	100	4,8		6'			52	66	
X1b	4	0,81	14,2	0,07	10,4	30	6,5		6'			71	88	
X1b	4	0,81	14,1	0,07	10,4	30	6,5		6'			62	78	
X2b	4	0,48	15	0,08	10,4	30	4,8		6'			50	66	
X2b	4	0,48	14,6	0,07	10,4	30	6,5		6'			50	62	
X2c	4	0,4	14,8	0,07	7	30	4,8		6'			36	53	
X2c	4	0,4	15,2	0,08	7,6	30	4,2		6'			39	54	
X2c	4	0,4	15,1	0,08	8,1	30	5,6		6'			36	53	
X2c	4	0,4	15	0,07	9,2	30	4,2		6'			40	57	
X2c	4	0,4	14,8	0,08	10,5	30			6'			36	53	
Observaciones:														
* albúmina 1 mg/ml de solución de clara de huevo de pollo resultó en un suc: DLS = 5,6 nm y tiempo de retención máximo de GPC = 10,3														
Tamaño de la nanoestructura: DLS - nanoestructuras en NaCl 150 mM; tiempo de retención de GPC - Superose 12 10/300 GL, NH ₄ CO ₃ 100 mM, pH=7,4, flujo: 1 ml/mm														
§ Valores nominales no medidos: campo 1,91 T (81.33 MH a 25°C temperatura del imán)														

Ejemplo 12: nanoestructura cargada de Mn formulada liofilizada

Se disolvió 1,1-bis(trietoxisililpropil)-1,1-bis(dimetilfosfonato)metano (6,4 g, 0,01 mmoles) en 200 ml de 1-propanol acuoso al 80% en un recipiente a presión. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a 95°C y después durante 24 h a 110°C. Se bajó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se recogió la solución incolora transparente. La solución recogida se diluyó con H₂O MilliQ (800 ml) y después se filtró utilizando una columna de tamaño de poro NMWC 300 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-300-C-3MA). Los permeados recogidos (-980 ml) a continuación se recogieron en una columna de diafiltración de 100 k de tamaño de poro NMWC (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-100-C-3MA) para concentrar la solución de polímero. Se llevó a cabo la adición repetida de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 50 ml. Composición (ICP, proporción molar): P/Si=0,84.

Además, el permeado que pasaba por la columna de diafiltración de 100 k se recogió y después se filtró utilizando una columna de diafiltración de poro NMWC 30 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-30-C-3MA). Se llevó a cabo la adición repetida (2x) de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 50 ml. Composición (ICP, proporción molar): P/Si=0,88.

El pH de la nanoestructura que pasaba por la diafiltración 100 k (25 ml, 2,1 mmoles) se ajustó de pH 2,2 a pH 10,5 con NaOH (aq.) 6 M y 1 M y se dejó en reposo durante 2 h. A continuación, se añadió tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (45,4 mg, 0,23 mmoles). La mezcla se agitó durante 16 h a 30°C. El pH de la mezcla después de la reacción era de 9,3 y se ajustó después a pH 7,4 utilizando HCl 1 M (aq.). La mezcla se diluyó a 50 ml con H₂O MilliQ y después se sometió a diafiltración utilizando una columna de tamaño de poro NMWC 10 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-10-C-3MA). Se recogió el retenido y se repitió el procedimiento de dilución y diafiltración tres veces. El volumen de solución recogido final fue de 10 ml.

A 8,1 ml de la solución recogida se añadió manitol (0,36 g, 2,0 mmoles) para alcanzar una concentración de 250 mM. Después se llevó a cabo la liofilización durante 16 h, recogiendo 0,5 g de polvos esponjosos blancos. Se preparó una solución acuosa 20 mg/ml del material liofilizado y se analizó. Tamaño de partícula, ponderado según volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=4,8 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7.4, caudal: 1 ml/min) Rt=10,3 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=9,8, P/Si=0,9, Si/Mn=10,7; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=72% y a pH 7=89%; r_1 a 60 MHz, 37°C=39 mM⁻¹ Mn s⁻¹.

Ejemplo 13. Purificación adicional de las nanoestructuras de Y utilizando resina de intercambio iónico.

Para eliminar adicionalmente iones de Mn unidos laxamente o en exceso, la muestra Y1 se trató con un intercambiador catiónico (poliestireno sulfonado): se mezclaron ~10 ml de una nanoestructura cargada de Mn (~ 10 mM Mn) con 1 g de Dowex 50WX4 (forma Na, preenjuagada con agua) y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 0,1 M. La mezcla se hizo girar suavemente durante 16 h y después se centrifugó a 3000 rpm.

Ejemplo 14. Medición de estabilidad de las nanoestructuras que contenían manganeso (también denominada "estabilidad de intercambio iónico").

En primer lugar, se determinó la concentración de manganeso de la solución de nanoestructuras y después se diluyó con agua hasta una concentración de manganeso de 1,5 mM y hasta un volumen final de 2,2 ml. A 2x 1000 ml de la solución de muestra diluida se añadieron 2x 100 mg de Dowex 50WX4 (forma Na, preenjuagada con agua). Se ajustó el pH a 7,0 y 5,5 en dos soluciones con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M, respectivamente (habitualmente sólo se requieren unos cuantos microlitros). La mezcla se mezcló bien durante 16 h mediante giro lento del vial. Se dejó que las partículas IEX se sedimentasen y se analizó una alícuota de 100 µl del sobrenadante separado ([Mn]_{IEX}). Para la determinación de la concentración inicial de manganeso en la muestra, se utilizó la solución restante de anteriormente para determinar la [Mn]_{inicial}. La estabilidad se calculó como: $[Mn]_{IEX}/[Mn]_{inicial} * 100$ (%)

Ejemplo 14b. Prueba de estabilidad complexométrica para nanoestructuras que contienen manganeso evaluada mediante relaxometría.

Medición de la relaxividad longitudinal de una solución de nanoestructuras ($r_{1(ns)}$) con una concentración de Mn 1 mM. Preparación de otra solución de nanoestructuras que contiene Mn 1 mM y adición de una cantidad molar equivalente de EDTA. El pH de dicha solución debe ajustarse a pH 7±0,5 en caso necesario. Medición de la relaxividad longitudinal de dicha solución de nanoestructuras con EDTA añadido ($r_{1(ns+EDTA)}$). Como material de referencia, se preparó una solución 1 mM utilizando un estándar de manganeso para AAS (Fluka 77036), se añadió una cantidad equimolar de EDTA, y se ajustó el pH a pH 7±0,5. Se midió la relaxividad longitudinal ($r_{1(Mn+EDTA)}$) y resultó un valor de 1,6 mM⁻¹s⁻¹. Para calcular el % de Mn liberado de la nanoestructura después de la adición de EDTA equivalente:

$$\%Mn \text{ liberado} = 100 - \left(\frac{r_{1(ns+EDTA)} - r_{1(Mn+EDTA)}}{r_{1(ns)} - r_{1(Mn+EDTA)}} * 100 \right)$$

Observación: se midió la relajación (T_1 , en segundos) utilizando el analizador de RMN Minispec mq60 (60 MHz) a 37°C y se calculó la relaxividad r_1 utilizando:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1H_2O}} + r_1 c_1$$

en la que $T_{1H_2O}=0,32$ s; $c_1=1$ mM.

Ejemplo 15. Transmetalación con calcio y manganeso.

Se mezcló un tampón que mimetizaba aproximadamente los componentes inorgánicos de sangre aunque sin calcio, a partir de NaCl (7,14 g), NaHCO₃ (1,4 g), KHCO₃ (0,43 g), NaH₂PO₄ (0,165 g), Mg(OAc)₂ (0,17 g), diluido a 1,00 l de volumen. En lo sucesivo se denomina “tampón para sangre”. Se sometieron a ensayo dos muestras de nanoestructuras: A (Y1, corte entre los filtros de 300 kDa y de 100 kDa) y B (Y2, corte entre los filtros de 100 kDa y 30 kDa). Se prepararon tubos de ensayo:

Muestra 1: 900 µl de agua	100 µl de muestra A
Muestra 2: 900 µl de agua	100 µl de muestra B
Muestra 3: 900 µl de tampón para sangre	100 µl de muestra A
Muestra 4: 900 µl de tampón para sangre	100 µl de muestra B
Muestra 5: 900 µl tampón para sangre + CaCl ₂ 1,3 mM	100 µl de muestra A
Muestra 6: 900 µl tampón para sangre + CaCl ₂ 1,3 mM	100 µl de muestra B

Se mezclaron las muestras con A analizadas a una concentración de Mn total de 1,3 mM y las de B, a 1,5 mM. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y después se pasaron por un filtro de centrifuga de corte molecular de 10 kDa. Los filtrados se analizaron para manganeso. Se muestran los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2:

Muestra	% de trans-metalación		
	agua (pH)	Tampón para sangre - Ca ²⁺ (pH)	Tampón para sangre + Ca ²⁺ 1,3 mM (pH)
A	0,1 (7,9)	0,8 (8,0)	2,9 (7,6)
B	0,2 (7,7)	5,2 (7,8)	10,0 (7,6)

Ejemplo 16. Polímero de dimetil-2-(trietoxisilil)etilfosfonato cargado con Mn. [Ejemplo de referencia]

Se disolvió dimetil-2-(trietoxisilil)etilfosfonato (DTEP, 0,9 g, 3,0 mmoles) en 30 ml de 1-propanol acuoso al 80% en un recipiente a presión. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a 95°C y después durante 24 h a 120°C. Se bajó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se recogió la solución incolora transparente. Se diluyó la solución recogida con H₂O MilliQ (470 ml) y después se filtró utilizando una columna de tamaño de poro NMWC 100 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-100-C-3MA). Los permeados recogidos (480 ml) a continuación se filtraron por una columna de diafiltración de 30 k de tamaño de poro NMWC (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-30-C-3MA) para concentrar la solución de polímero. Se llevó a cabo la adición repetida de agua MilliQ y la filtración del retenido recogido. El volumen final del retenido recogido fue de aproximadamente 7,5 ml. Composición (ICP, proporción molar): P/Si=0,5.

El pH de la solución de polímero DTEP de 7,5 ml (0,4 mmoles de P) se ajustó de pH 2,6 a pH 10,4 con NaOH (aq.) 6 M y 1 M y se dejó en reposo durante 2 h. A continuación, se añadió tetrahidrato de cloruro de manganeso (II) (5,9 mg, 0,3 mmoles). La mezcla se agitó durante 1 h a 30°C. El pH de la mezcla después de la reacción era de aproximadamente pH 9,4 y se ajustó adicionalmente a pH 7,4 utilizando HCl 1 M (aq.). La mezcla reaccionada se diluyó a 50 ml con H₂O MilliQ y después se sometió a diafiltración utilizando una columna de tamaño de poro NMWC 10 k (cartucho de ultrafiltración Midgee de GE Healthcare, modelo: UFP-10-C-3MA), para eliminar los iones Mn libres. Se recogió el retenido y se repitió el procedimiento de dilución y diafiltración tres veces. Tamaño de partículas ponderado en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=5,6 nm; análisis de GPC (Superose 12 10/300 GL, NH₄CO₃ 100 mM, pH=7,4, caudal: 1 ml/min) Rt=9,5 min; Composición (ICP, proporción de moles): P/Mn=2,7, P/Si=0,5, Si/Mn=5,7; estabilidad de intercambio iónico a pH 5,5=21% y a pH 7=24%; r_1 a 81,3 MHz, 25°C=3 mM⁻¹ Mn s⁻¹.

Ejemplo 17. Ácido zoledrónico cargado con Mn [Ejemplo de referencia]

Se disolvió ácido zoledrónico (27 mg, 0,01 mmoles) en 10 ml de H₂O MilliQ. Se preparó una solución acuosa 100 mM de tetrahidrato de cloruro de manganeso (II). Se mezclaron 10 µl de solución de Mn con 408 µl de la solución de ácido zoledrónico y 582 µl de H₂O MilliQ. Se ajustó el pH a 7,4 utilizando NaOH 6 M (aq.). Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=5,26. r_1 a 81,3 MHz, 25°C=2,3 mM⁻¹ Mn s⁻¹

Ejemplo 18. ácido metilén-difosfónico cargado con Mn [Ejemplo de referencia)

Se disolvió ácido metilén-difosfónico (9,2 mg, 0,05 mmoles) en 5 ml de H₂O MilliQ. Se preparó una solución acuosa 28 mM de tetrahidrato de cloruro de manganeso (II). Se mezclaron 35 µl de solución de Mn con 286 µl de la solución de ácido metilén-difosfónico y 679 µl de H₂O MilliQ. Se ajustó el pH a 7,1 utilizando NaOH 6 M (aq.). Composición (ICP, proporción molar): P/Mn=4,6. r_1 a 81,3 MHz, 25 °C=1 mM⁻¹ Mn s⁻¹

Ejemplo 19. Otros iones metálicos -cargados en la nanoestructura X.

Se ajustó el pH de la nanoestructura X2a de 2 a 10,4 utilizando NaOH (aq.) 6 M y 1 M y se dejó en reposo durante 2 h. A continuación, se añadieron sales metálicas (xx mg, yy mmoles, ver la Tabla 3, posteriormente), tal como hidrato de cloruro de Fe (II), hidrato de cloruro de Fe (III), hidrato de cloruro de Er (III) o hidrato de cloruro de Dy (III). La mezcla se agitó durante 1 h a 30°C. El pH de la mezcla después de la reacción varió entre 4,7 y 7,2 para diferentes muestras y a continuación se ajustó a pH 7,4 utilizando HCl 1 M (aq.). La mezcla se filtró mediante centrifugación (MWCO: 10 K, 3000 G durante 15 min) y el concentrado (0,5 ml) se diluyó a 4 ml con H₂O MilliQ. Se repitió este procedimiento 4 veces. El concentrado final se diluyó a 4 ml con H₂O MilliQ.

a: precursor X2a, 4 ml, 0,11 mmoles de P. FeCl₂ · 4H₂O utilizado: xx=7,2 mg, yy=0,04 mmoles. pH final 7,4; tamaño de partícula en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=8,7 nm; composición (ICP, proporción molar): P/Fe=4,2, P/Si=0,9, Si/Fe=4,5; r_1 a 81,33 MHz, 25 °C=3,1 mM⁻¹ Fe s⁻¹.

b: precursor X2a, 4 ml, 0,11 mmoles de P. FeCl₃ · 6H₂O utilizado: xx=9 mg, yy=0,03 mmoles. pH final 7,4; tamaño de partícula ponderado en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=8,7 nm; composición (ICP, proporción molar): P/Fe=6,5, P/Si=0,9, Si/Fe=7,2; r_1 a 81,33 MHz, 25 °C=8,5 mM⁻¹ Fe s⁻¹.

c: precursor X2a, 4 ml, 0,11 mmoles de P. ErCl₃ · 6H₂O utilizado: xx=12,7 mg, yy=0,03 mmoles. pH final 7,4; tamaño de partícula ponderado en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=50 nm; composición (ICP, proporción molar): P/Fe=5,3, P/Si=0,9, Si/Er=5,7; r_1 a 81,33 MHz, 25 °C=0,4 mM⁻¹ Er s⁻¹.

d: precursor X2a, 4 ml, 0,11 mmoles de P. DyCl₃ · 6H₂O utilizado: xx=13,6 mg, yy=0,04 mmoles. pH final 7,4; tamaño de partícula ponderado en volumen (DLS en NaCl 150 mM) máximo=10,1 nm; composición (ICP, proporción molar): P/Fe=4,4, P/Si=0,9, Si/Dy=4,7; r_1 a 81,33 MHz, 25 °C=0,6 mM⁻¹ Dy s⁻¹.

Ejemplo 20. Relaxividad de materiales cargados con Mn

Se muestra en la Tabla 3 la relaxividad de algunos materiales cargados con Mn.

Tabla 3:

Muestra	r1	r2	r2/r1		
polímero bisbis cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	44,2	98,9	22		
en plasma sanguíneo a 25°C	42,3	115,1	2,7	*	
en plasma sanguíneo a 37°C	37,3	85,2	2,3	*	
con manitol en H ₂ O a 25°C	41,2	94,5	2,3		
con manitol en plasma sanguíneo a 37°C	45,5	127,5	2,8		
con manitol en plasma sanguíneo a 25°C	48,1	164,7	3,4		
monómero de Bisbis cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	3,8	31,2	8,2		
polímero DTEP cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	3	17,6	5,9		
ácido zoledrónico cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	2,3	AN	AN		
ácido metilén-difosfónico cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	1	AN	AN		
polímero Bisbis cargado con otros iones metálicos					
Fe(II) en H ₂ O a 25°C	3,1	4,5	1,5		
Fe(III) en H ₂ O a 25°C	8,5	13,4	1,6		
Er en H ₂ O a 25°C	0,4	AN	AN		
Dy en H ₂ O a 25°C	0,6	AN	AN		
polímero PEG ₈ -NH ₂ -Bisbis cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	45,6	93,8	2,1	*	
polímero 3PEG-NH ₂ -Bisbis cargado con Mn					
en H ₂ O a 25°C	45,1	98,4	2,2	*	
en plasma sanguíneo a 25°C	48,1	164,7	3,4		
en plasma sanguíneo a 37°C	44,3	119,6	2,7		
PEI-bisfosfonato cargado con Mn					

Muestra	r1	r2	r2/r1		
polietilenimina cargada con Mn	en H ₂ O a 25°C	24,2	115,1	4,8	
	en H ₂ O a 25°C	0,8	AN	AN	
MnCl ₂	en H ₂ O a 25°C	5,8	nm	AN	

Observación: Los valores de relajividad (r) se calcularon a partir de $(1/T1) = * (1/T1w)$, donde c=concentración de Mn y T1w=3,1 s
* relajividad derivada de la pendiente del gráfico de tasa de relajación (1/T1) como función de la concentración de Mn
Temperatura: Temperatura del imán; Campo: 1,91 T (81,33 MHz)
r1 medido utilizando la secuencia de pulsos de inversión-recuperación
r2 medido utilizando la secuencia de pulsos de eco de espín de Hahn
NA: la contribución de intercambio químico a r2 provoca que resulte inadecuada la medición con el eco de espín de Hahn
nm: no medido

Ejemplo 21: obtención de imágenes *in vivo*

5 Se investigó la calidad y contraste de las imágenes de RM *in vivo* en ratones portadores del linfoma de ratón EL-4 de crecimiento agresivo. La línea celular de linfoma murino EL-4 se ha establecido a partir de un linfoma inducido en ratones C57BL/6. Las células linfoblásticas crecen fácilmente en suspensión *in vitro* y como aloinjertos en ratones CD57BL/6.

10 Se utilizaron células EL-4 (ECACC 85023105) para desarrollar tumores aloinjertados en ratones C57BL/6. Se inyectó una suspensión celular por vía subcutánea y se desarrollaron tumores en unos cuantos días. Entre 6 y 10 días después de la inyección, se utilizaron los tumores para la obtención de imágenes.

15 El protocolo de RM se optimizó y sometió a ensayo en dos animales. Las imágenes de RM se adquirieron en 7 animales portadores de tumor de EL-4; 4 ratones recibieron 3 mM / 175 µl de Y2; 3 ratones recibieron 17 mM / 175 µl de Magnevist, ambos inyectados durante un periodo de 6 segundos.

20 Se adquirió una imagen de GE potenciada en T1. Se sacó el ratón del imán y se conectó el catéter que contenía el agente de contraste. A continuación, se inyectó en un punto crítico el agente de contraste rápidamente, para evitar la difusión en el animal por el catéter. Se adquirieron las imágenes precontraste potenciadas en T1 e inmediatamente después, se inyectó el agente de contraste, adquirieron en continuo imágenes flash dinámicas (2 preinyección, 14 postinyección, 8 segundos por imagen).

25 En los experimentos etiquetados A, B, E (ver posteriormente), se adquirieron 10 secciones con un campo de visión de 50x50 mm después de la inyección de Y2 o Magnevist. Las imágenes adquiridas con 8 secciones, un campo de visión de 50x50 mm, tamaño de matriz de 256x256 y un tiempo total de escaneo de algo más de 10 minutos por grupo de datos. Las imágenes postcontraste se adquirieron cada 15 minutos. A partir de todos los grupos de datos después de la inyección del agente de contraste, se seleccionó 1 sección de cada 10 como representativa de la potenciación; ver la figura 2.

30 Ejemplo 22: síntesis de nanoestructuras a base de polietilenimina con 1,3-bisfosfonato cargado de manganeso

22a: ácido propilén-1,3-difosfónico

35 Se disolvió bromuro de trimetilsililo (16,84 ml, 25,3 mmoles) y tetraetilpropilén-1,3-difosfonato (10,08 g, 31,6 mmoles) en 5 ml de diclorometano enfriado con hielo. Tras 10 min, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminaron los volátiles en un evaporador rotatorio. Al residuo se añadieron 50 ml de agua bajo agitación y enfriamiento con hielo. Tras 20 minutos, se eliminó el agua en un evaporador rotatorio y se eliminó la humedad residual mediante, en primer lugar, dos ciclos de adición de tolueno-evaporación, seguido una bomba de aceite de vacío durante la noche. La RMN-¹H mostró que habían desaparecido los grupos etilo y que todavía estaban presentes los grupos metileno.

22b: tetrametilpropilén-1,3-difosfonato

45 Se suspendió ácido propilén-1,3-difosfónico (600 mg) en ortoformato de trimetilo (20 ml) y se sometió a reflujo durante 6 h, seguido de la eliminación mediante destilación de 10 ml del líquido, dejando el resto en reposo durante la noche. Los volátiles se eliminaron al vacío, rindiendo el producto en forma de un aceite.

22c: 1-t-butoxicarbonilmetilo,-O,O,O,O-tetrametilpropilén-1,3-difosfonato

50 Se disolvió tetrametilpropilén-1,3-difosfonato (206 mg, 0,79 mmoles) en THF seco (5 ml) bajo una atmósfera de

5 nitrógeno y la solución se enfrió en un baño de hielo seco-acetona. Se añadió con jeringa t-BuLi (2,17 M en heptano, 1,66 mmoles) y tras 10 minutos, se añadió bromoacetato de t-butilo (0,23 ml, 1,66 mmoles). Tras 30 minutos, se dejó que se elevase la temperatura hasta -15°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se desactivó mediante la adición de solución acuosa saturada de cloruro amónico. La extracción con éter (2x 25 ml), el secado sobre MgSO₄ y la evaporación, proporcionaron un residuo aceitoso. La cromatografía flash en sílice con diclorometano+metanol al 3% proporcionó 134 mg del producto deseado.

22d: 1-carboxilmetil,-O,O,O,O-tetrametilpropilén-1,3-difosfonato

10 Se disolvió 1-t-butoxicarbonilmetil,-O,O,O,O-tetrametilpropilén-1,3-difosfonato (150 mg) en diclorometano (10 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (0,5 ml). La mezcla de reacción se dejó en reposo durante la noche y se eliminaron los volátiles. Se eliminó el ácido trifluoroacético residual mediante tres ciclos de adición de tolueno-evaporación. Rendimiento: 132 mg.

15 *22e: conjugación de 1-carboxilmetil,-O,O,O,O-tetrametilpropilén-1,3-difosfonato con polietilenimina y carga con manganeso*

20 Se añadió 1-carboxilmetil,-O,O,O,O-tetrametilpropilén-1,3-difosfonato (100 mg), polietilenimina (15 mg, Pm medio; 30000) y sulfo-N-hidroxi-succinimida a agua (5 ml) y se sonicaron durante 10 min. Se ajustó el pH a 6,6 mediante la adición de NaOH 0,1 M. Se añadió EDC y la solución se introdujo en un agitador durante 19 h. Se eliminó el material molecular pequeño en un filtro de centrífuga de 20 kDa de corte. El residuo se lavó 4 veces en el mismo filtro. Las nanoestructuras median 7,5 nm de diámetro disueltas en NaCl 150 mM. A 1 ml de la solución anterior se añadieron 21 mg de MnCl₂·4 H₂O. Se ajustó el pH a 7,3 mediante la adición de NaOH acuoso. La muestra se lavó con agua 3 veces en un filtro de centrífuga de 10 kDa nominales. La muestra se analizó para Mn y se encontró que que la concentración era de 2,4 mM. Se encontró que la relaxividad era de 18,5/mM/s a 60 MHz. Estabilidad medida según el Ejemplo 14: 0,2%.

Ejemplo 23: titulación conductimétrica de nanoestructuras

30 La titulación conductimétrica puede utilizarse para la determinación de la cantidad de Ca²⁺ y Mg²⁺ que puede adsorberse sobre las nanoestructuras. Se monitorizó la conductividad de una solución de agua de nanoestructuras tras la adición de incrementos de una solución que contenía una mezcla de CaCl₂ y MgCl₂. La conductividad (mS/cm) de la solución se incrementará a una determinada tasa (pendiente de la curva de titulación) con la condición de que se adsorban Ca²⁺ y Mg²⁺ sobre las partículas. Tras saturarse las nanoestructuras con Ca²⁺ y Mg²⁺, la conductividad se incrementará a otra tasa. Para una visualización más clara del punto final (donde las nanoestructuras están saturadas con Ca y Mg), las conductividades en presencia de las nanoestructuras se restan de las conductividades obtenidas mediante la adición de los mismos incrementos de la solución de Ca/Mg a agua.

40 Se mezcló una muestra de 200 µl de material del Ejemplo 10c ([Mn]=0; [P]=138 mM) con 2300 µl de agua. Se midió la conductividad después de la adición de incrementos de 50 µl de una solución de agua que contenía MgCl₂ 6,55 mM y CaCl₂ 9,67 mM. (Esta proporción [Ca]/[Mg] es aproximadamente la misma que se observa en la sangre). Ver "Muestra" en la fig. 3a. El valor inicial de conductividad (ninguna adición de solución de Mg/Ca) se restó de "Muestra" para obtener "Muestra corr." en la fig. 3a. También se midió la conductividad después de la adición de los mismos incrementos de Mg/Ca a agua para obtener "Blanco" en la fig. 3a. Finalmente, se restaron las conductividades de "Muestra corr." respecto de "Blanco", obteniendo "Dif. (Blanco-Muestra corr.)" en la fig. 3a.

45 La curva "Dif. (Blanco-Muestra corr.)" se amplía en la FIG. 3b y se ajustaron dos líneas rectas a las diferentes partes de la curva. Las dos líneas se cruzan en 474 µl de titulador, proporcionando [P]/[Mg]=8,89, [P]/[Ca]=6,02 y [P]/[Me]_{tot}=3,59.

50 El mismo lote de nanoestructuras que anteriormente se concentró adicionalmente en un filtro de 10 kD (se redujo el volumen a aproximadamente un quinto). Se llevó a cabo la titulación con las mismas correcciones que anteriormente, con 40 µl de solución mezclada con 2460 µl de agua. Se determinó que el punto final era 422 µl. Suponiendo la misma proporción de adsorción, [P]/[Me], que en la titulación anterior, lo anterior proporcionará una [P]=422/474 x 138 x 0,200/0,040=613 mM. Ver la fig. 3c.

El objetivo principal de la titulación era estimar la cantidad de solución de Ca/Mg que debería añadirse para un 90% de saturación de las nanoestructuras.

60 Por lo tanto, se añadieron 506 l de una solución de MgCl₂ 40 mM y CaCl₂ 600 mM a 14,5 ml de solución de muestra ([P]=138 mM).

65 Dicha solución a continuación se concentró adicionalmente con un filtro de 10 kD, tal como anteriormente, y se tituló aproximadamente la misma cantidad, aunque en esta ocasión la mayoría de los sitios deberían encontrarse ocupados por metales. Se muestran los resultados en la fig. 3d.

Ejemplo 24. Formulación: saturación con iones de Ca y Mg, seguido de la adición de manitol (lote nº SI055C-PE120208)

- 5 Una muestra de 2,5 ml de una solución de material del Ejemplo 10c ([Mn]=38 mM, [P]=508 mM y Os~200 mOs/kg; lote nº PE 120130) en primer lugar se ajustó a pH fisiológico, pH 7,4. Tras la saturación (90%) con Ca y Mg, se llevaron a cabo las etapas siguientes. Se titularon conductimétricamente 100 µl de la solución con una solución de Ca y Mg ([Ca]/[Mg]=1,48) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 23 ("Titulación conductimétrica de nanoestructuras") y se determinó el punto final con [Ca]/[Mn]=1,59 o [Mg]/[Mn]=1,08.
- 10 Había inquietud sobre si parte de Mn²⁺ podía resultar desplazado por Ca²⁺ y Mg²⁺, especialmente porque el pH al final de la titulación era de 5,5. Por lo tanto, la solución después de la titulación se filtró por un filtro de 10 kD y se determinó la cantidad de Mn en el filtrado a fin de que contuviese ~15 % del total de Mn en la muestra. La pérdida de Mn de la nanoestructura podía explicarse por lo menos parcialmente por el bajo pH al final de la titulación.
- 15 Para la preparación de las partículas correspondientes cargadas con Ca y Mg, en primer lugar, se mezclaron 500 µl de solución de manitol (Os=280 mOs/kg) con 21,5 µl de una solución concentrada de Ca/Mg ([Ca]=600 mM, [Mg]=400 mM). A continuación, se mezcló dicha solución con 580 µl de lote nº PE 120130; se ajustó el pH de 6,01 a 7,40 con ~8 µl de NaOH 1 M y se determinó la osmolalidad en 270 mOs/kg.
- 20 Ejemplo 25. Prueba de inmunogenicidad.

Métodos

25 En un inyectó se inyectaron cinco veces 2 x 0,5 ml de nanoestructuras según el Ejemplo 24 (formuladas con magnesio y calcio) a una concentración de nanoestructuras correspondiente a 10 mg de Mn/ml. Las inyecciones se administraron por vía subcutánea, una en cada una de las patas traseras. Las nanoestructuras se mezclaron con adyuvante de la manera siguiente:

- 30 1) 1:1 v/v con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) (1 ml inyectado en total) para la inmunización primaria y con adyuvante incompleto de Freund para las inyecciones de refuerzo.
 2) 1:1 (v/v) con hidróxido de aluminio 40 mg/ml (Pierce) (1 ml inyectado en total) para tanto la inmunización primaria como las inyecciones de refuerzo.

35 Protocolo para las inyecciones y la recolección de suero:

- Día 0: Recolección de suero preinmune (20 ml)
- Día 0: Inmunización primaria
- Día 14: primer refuerzo
- Día 28: Segundo refuerzo
- 40 • Día 49: tercer refuerzo
- Día 70: cuarto refuerzo
- Día 84: Recolección de suero inmune (60 ml)

45 Análisis:

1. Las fracciones de inmunoglobulinas se purificaron a partir de sueros preinmunes e inmunes mediante cromatografía de proteína G (GE Healthcare).
2. Se conjugaron 2 mg de la fracción de IgG con una columna de 2 ml de agarosa (Pierce) mediante amidación reductora entre los grupos aldehído sobre la resina y los grupos de amina primaria presentes en las moléculas de IgG. Las columnas conjugadas con IgG se lavaron y se equilibraron con NaCl al 0,9%.
- 50 3. Se aplicaron a cada una de las columnas 100 µl de una solución de nanoestructuras según el Ejemplo 24, correspondientes a una solución 1,35 mM de manganeso (que contenía aproximadamente 21 µg de Si y 7 µg de Mn).
4. Fracción pasada por columna: las columnas se lavaron con NaCl al 0,9% en 4x fracciones de 1 ml, seguido de 2x 2 ml (fracciones 1 a 6).
- 55 5. Eluido: el SI055 unido se eluyó con 4x 1 ml de NaCl 1 M (fracciones 7 a 10).
6. Las fracciones iniciales de flujo y de eluido se analizaron para el contenido de Mn y Si mediante ICP-AES.

Resultados

60 En las columnas tanto preinmunes como inmunes, prácticamente la totalidad del SI055 se detectó en la fracción pasada por columna. En el eluido, no se observó diferencia entre las columnas en la cantidad detectada de nanoestructuras.

65 No se observaron signos de irritación u otros problemas en los conejos durante el curso del protocolo de inmunización.

La recuperación de nanoestructuras en las fracciones pasadas por columna y de eluido de las columnas preinmunes e inmunes se muestra en la Tabla 4.

- 5 La recuperación de SI055 en las fracciones 1 a 10 de las columnas preinmunes e inmunes se muestra en las figuras 4a y 4b, respectivamente.

Tabla 4:

Columna	Porcentaje de nanoestructuras aplicadas			
	Fracción pasada por columna		Eluido	
	Mn	Si	Mn	Si
Preinmune	99,7	88,7	0,0	0,0
Inmune	100,9	95,6	0,0	0,0

10

Conclusiones

El presente ejemplo demuestra que no se produjo ninguna reacción inmunitaria contra las nanoestructuras en conejos, a pesar de que el protocolo de inmunización era muy robusto. Este resultado demuestra el hecho de que las nanoestructuras son bioinertes.

15

REIVINDICACIONES

1. Nanoestructura que comprende iones de manganeso incorporados en un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en el que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como:



en la que:

- 10 R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y por lo menos uno de R^3 y R^4 es un grupo conectado con el marco polimérico, o que forma parte del marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R^3 y R^4 sea dicho grupo conectado, el otro de R^3 y R^4 es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico o el residuo de dicho grupo, o seleccionado del grupo que consiste en H, OH, OR^5 y R^5 , en el que R^5 es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano o en el que el marco polimérico se deriva de polietilenimina.

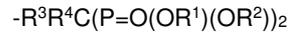
- 20 2. Nanoestructura según la reivindicación 1, en la que el grupo conectado con el marco polimérico, y/o el grupo capaz de conectarse con el marco polimérico o el residuo de dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 $(CH_2)_n Si(R^x)_3$ en el que R^x independientemente es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O-, o O-, - denota un enlace con el marco polimérico y n es 1 a 5,
 $(CH_2)_n COR^y$ en el que R^y es O-, NH_2 , NHR^z , NR^z_2 , o un enlace con el marco polimérico, R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y n es 1 a 5, y - denota un enlace con el marco polimérico, y
 $(CH_2)_n SO_2R^y$ en el que R^y es O-, NH_2 , NHR^z , NR^z_2 , o un enlace con el marco polimérico; R^z es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono y n es 1 a 5, y - denota un enlace con el marco polimérico.

- 30 3. Nanoestructura según la reivindicación 1 o 2, que comprende átomos de silicio.
4. Nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que R^3 y/o R^4 se seleccionan del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-Si(R^x)_3$, en el que R^x es independientemente un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, OH, O- o O-, en el que - denota un enlace con el marco polimérico y en el que n es 1 a 5.
- 35 5. Nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 3 a 7 nm.
- 40 6. Nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el diámetro hidrodinámico de la nanoestructura es de 10 a 20 nm.
7. Nanoestructura según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en la que la proporción molar P/Mn es de 7 a 20.
- 45 8. Nanoestructura según la reivindicación 3 o según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en caso de ser dependiente de la reivindicación 3 y en caso de que el marco polimérico comprenda residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilano, en el que la proporción molar Si/Mn es de 5 a 20.
- 50 9. Nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que dicha nanoestructura comprende además grupos hidrofílicos unidos a las partes externas.
10. Nanoestructura según la reivindicación 9, en la que los grupos hidrofílicos comprenden fracciones $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ en las que n=4 a 50.
- 55 11. Composición farmacéutica que comprende una nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Utilización de una nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 11 como agente de contraste de IRM.
- 60 13. Método para obtener una nanoestructura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- 65 obtener nanoestructuras de un marco polimérico que comprende bisfosfonatos geminales, y poner en contacto dichas nanoestructuras con iones de manganeso.

14. Nanoestructura que comprende un marco polimérico que comprende por lo menos cinco grupos bisfosfonato geminales, en la que los grupos bisfosfonato geminales se incorporan, independientemente unos de otros, como:

5



en la que:

10

R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una carga negativa, H, alquilo y arilo, y

15

por lo menos uno de R³ y R⁴ es un grupo conectado con el marco polimérico, o que forma parte del marco polimérico, con la condición de que, en el caso de que únicamente uno de R³ y R⁴ sea dicho grupo conectado, el otro de R³ y R⁴ es un grupo capaz de conectarse con el marco polimérico o el residuo de dicho grupo, o seleccionado del grupo que consiste en H, OH, OR⁵ y R⁵, en el que R⁵ es un alquilo con 1 a 8 átomos de carbono,

en el que el marco polimérico comprende residuos monómeros que contienen un grupo bisfosfonato geminal y dos grupos organo-oxisilan.

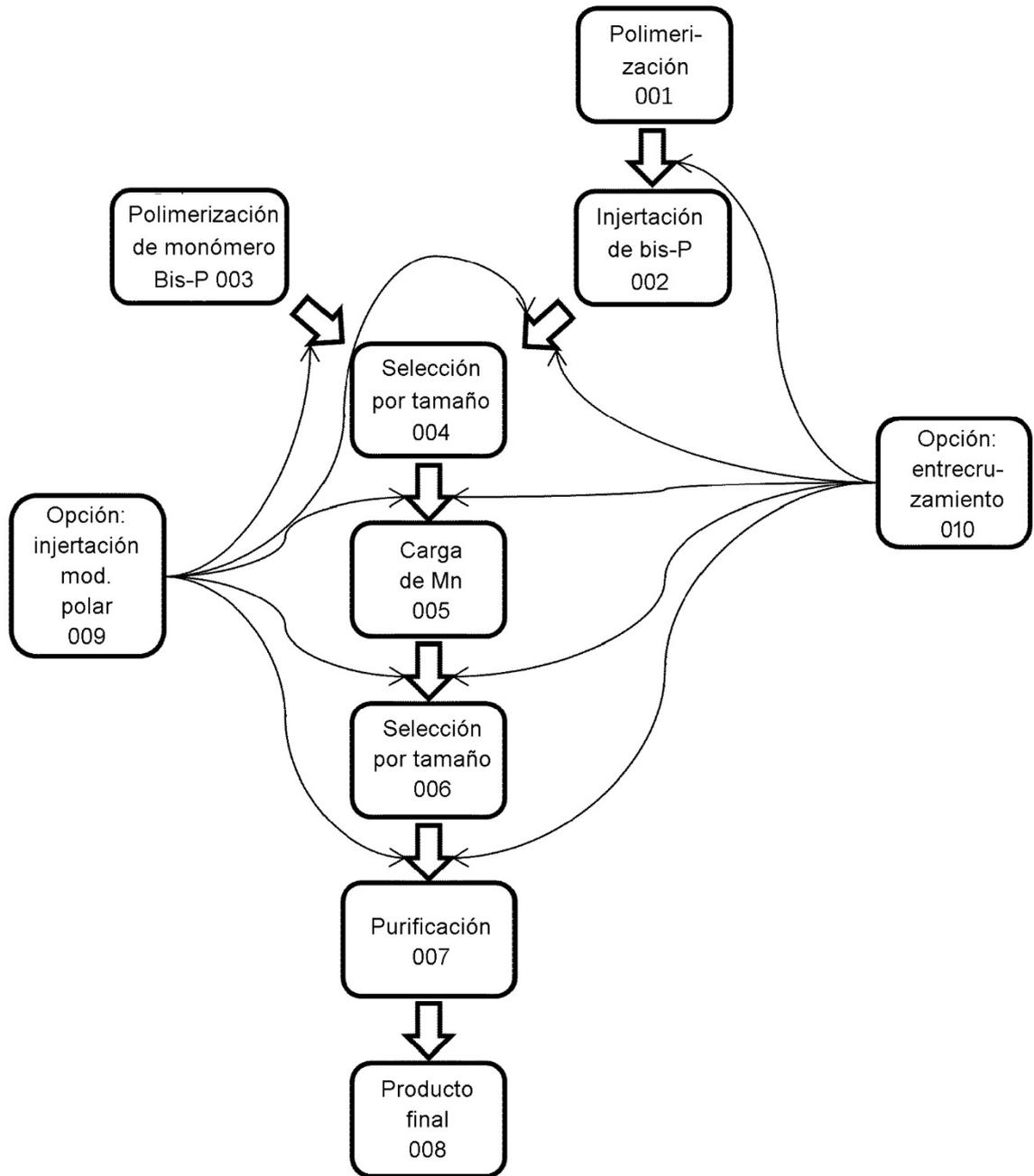


Fig. 1

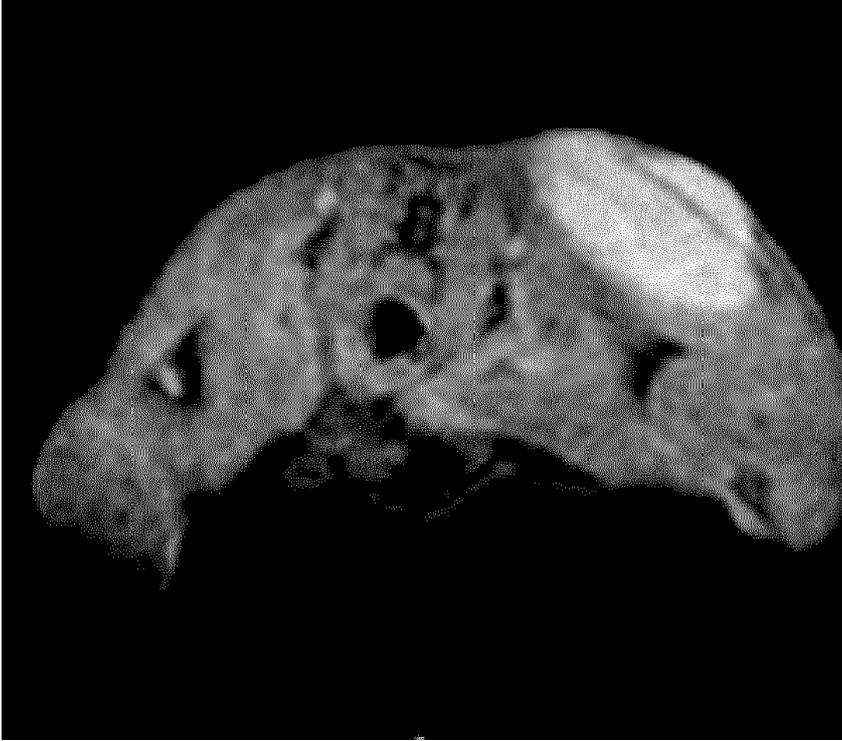


Fig. 2

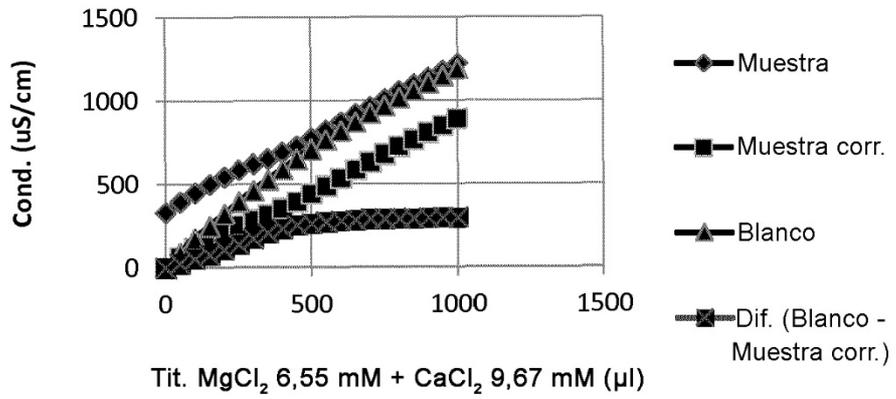


Fig 3a

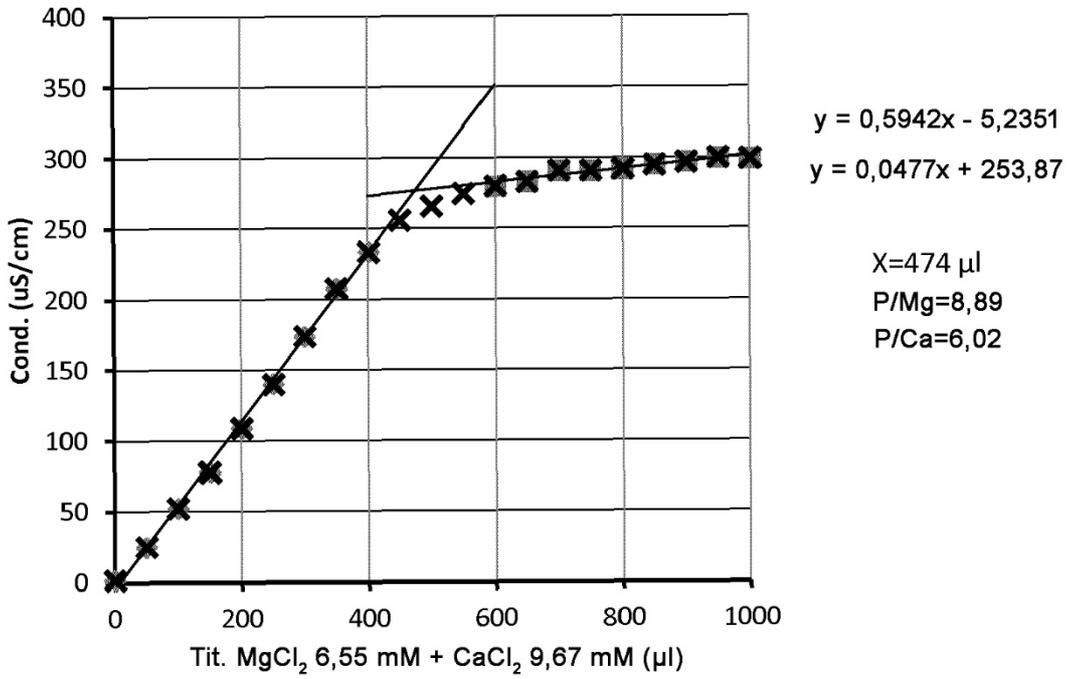


Fig 3b

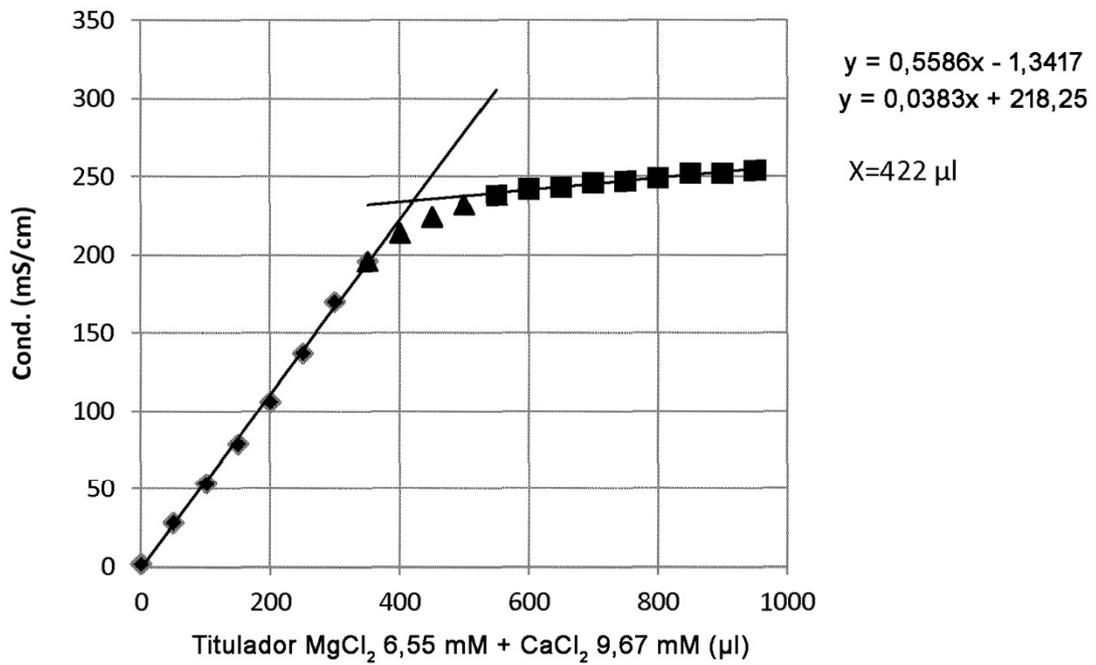


Fig 3c

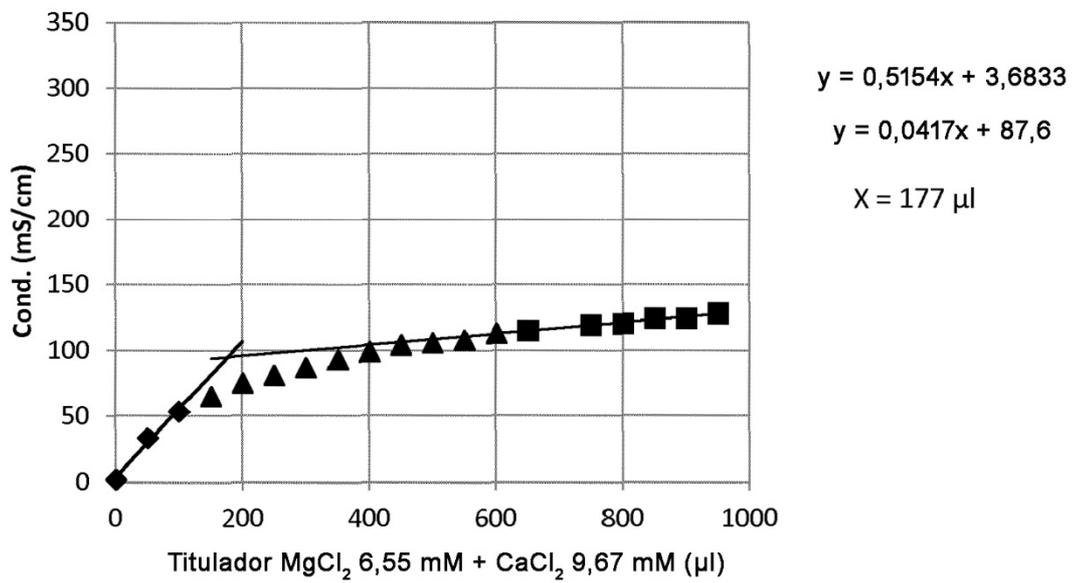


Fig 3d

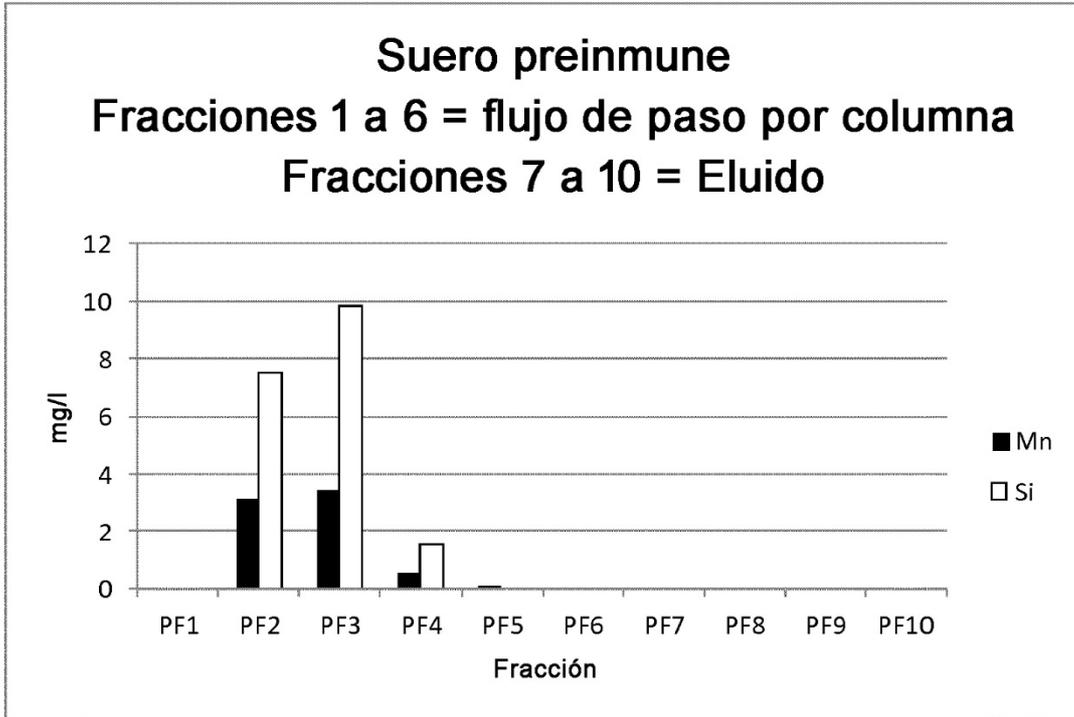


Fig 4a

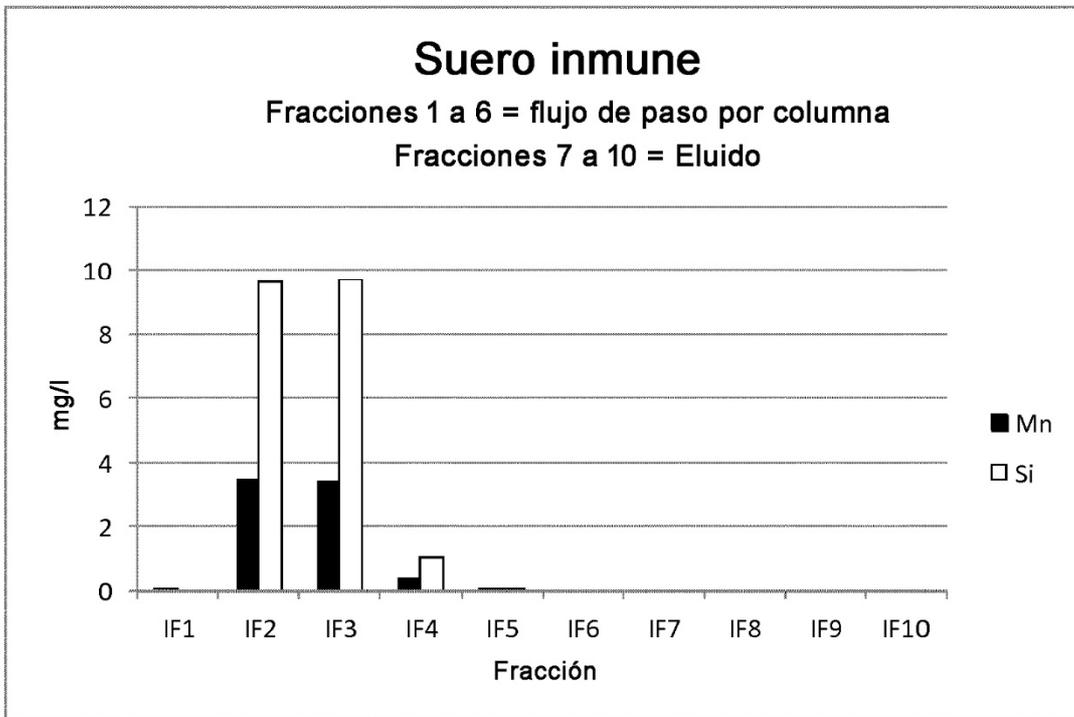


Fig 4b