(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 787 502**

(51) Int. CI.:

A61K 49/10 (2006.01)
C08G 65/48 (2006.01)
C07F 7/04 (2006.01)
C08G 77/38 (2006.01)
A61K 49/08 (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
C08G 65/326 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2008 PCT/CN2008/000823**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO09129649**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2008 E 08734013 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2285423**

(54) Título: **Polímero biocompatible y nanopartícula magnética con biocompatibilidad**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2020

(73) Titular/es:

MEGAPRO BIOMEDICAL CO., LTD. (100.0%)
Rm. 526, Bldg. 52, No. 195, Sec. 4Chung Hsing Rd.
Chutung, Hsinchu, 31040, TW

(72) Inventor/es:

CHANG, WEN-HSIANG;
HSIEH, WEN-UAN;
HUANG, SHIU-HUA;
LIN, CHIN-I;
WANG, SHIAN-JY JASSY y
TENG, KELLY

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Polímero biocompatible y nanopartícula magnética con biocompatibilidad

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención se refiere a un polímero biocompatible y en particular a un polímero biocompatible para modificar covalentemente nanopartículas magnéticas.

Descripción de la técnica relacionada

La toma de imágenes por resonancia magnética (MRI) es una estrategia no invasiva atractiva para el diagnóstico temprano y la terapéutica del cáncer. La MRI utiliza pulsos de radiofrecuencia y gradientes de campo magnético aplicados a un sujeto en un campo fuerte para producir imágenes. La MRI es capaz de mostrar varias características diferentes de los tejidos. El nivel de magnetización tisular en períodos de registro de señal específicos durante el ciclo de toma de imágenes de RM generalmente determina el brillo de un tejido particular en las imágenes de MRI. El contraste se produce cuando los tejidos no tienen el mismo nivel de magnetización.

Si bien las capacidades de toma de imágenes de las resonancias magnéticas han revolucionado la tecnología de generación de imágenes, la resolución se limita a los esclarecimientos de las lesiones dentro del cuerpo del orden de 1 mm. Esta limitación ha llevado al desarrollo de agentes de mejora de contraste. Debido a la propiedad superparamagnética, se ha encontrado que las nanopartículas de óxido de hierro son efectivas como agentes de mejora de contraste para MRIs. La nanopartícula magnética se puede modificar con un polímero biocompatible para prolongar el tiempo de circulación de partículas en la sangre y reducir la inmunogenicidad. Además, la nanopartícula magnética puede modificarse con un colorante fluorescente y un agente de direccionamiento específico para proporcionar propiedades fluorescentes y funciones de direccionamiento específicas.

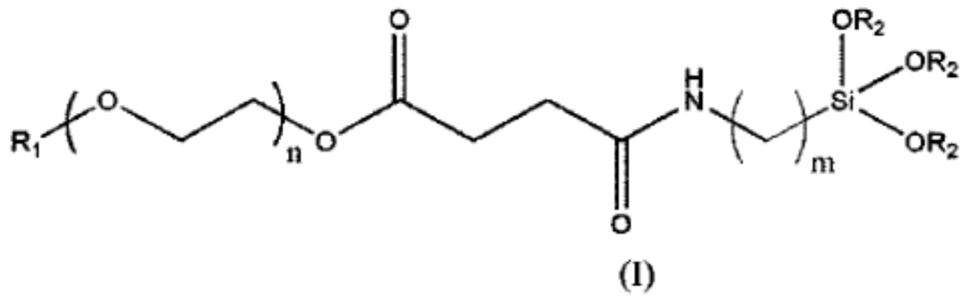
La publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20070148095 divulga un agente de contraste multimodal con especificidad para imágenes magnéticas y ópticas. El agente de contraste multimodal incluye una nanopartícula magnética, un polímero biocompatible que modifica químicamente la nanopartícula magnética, un colorante fluorescente acoplado al polímero biocompatible y un agente de direccionamiento específico acoplado al polímero biocompatible. Los polímeros biocompatibles incluyen polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (PLA), PLA-PEG, poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli (metacrilato de metilo) (PMMA), y similares.

La publicación de patente de los Estados Unidos No. 20070148095 divulga un compuesto de silano para modificar nanopartículas magnéticas y un procedimiento para usar la nanopartícula para detectar y tratar tejidos de interés.

Los agentes de mejora del contraste de MRI disponibles comercialmente incluyen Feridex® (óxido de hierro revestido con dextrano) y Resovist® (óxido de hierro revestido con carboxidextrano). Kohji Yoshinaga y col. (Coloides y superficies A: Aspectos fisicoquímicos y de ingeniería, Vol. 77, Número 2, 17 de septiembre de 1993, p. 101-107) describen la inmovilización de proteína en sílice coloidal monodispersada con espaciador de poli(etilenglicol) y la aplicación de los materiales composite para pruebas de aglutinación inmunológica.

Breve resumen de la invención

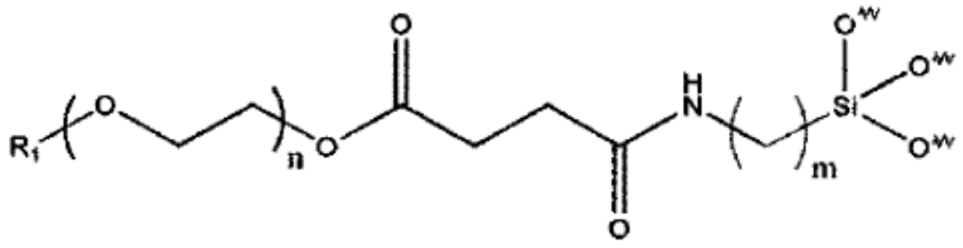
En un aspecto, la invención proporciona un polímero biocompatible de fórmula (I),



(I)

en la cual R_1 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada, R_2 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada, n es un número entero de 5 a 1000 y m es un número entero de 1 a 10.

En otro aspecto, la invención proporciona una nanopartícula magnética con biocompatibilidad, que comprende una nanopartícula magnética y un polímero biocompatible de fórmula (II) acoplado covalentemente a la nanopartícula magnética,



(II)

en la cual R_1 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada, n es un número entero de 5 a 1000, y m es un número entero de 1 a 10.

Se proporciona una descripción detallada en las siguientes formas de realización con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede entenderse más completamente leyendo la subsiguiente descripción detallada y los ejemplos con referencias hechas a los dibujos adjuntos, en los que:

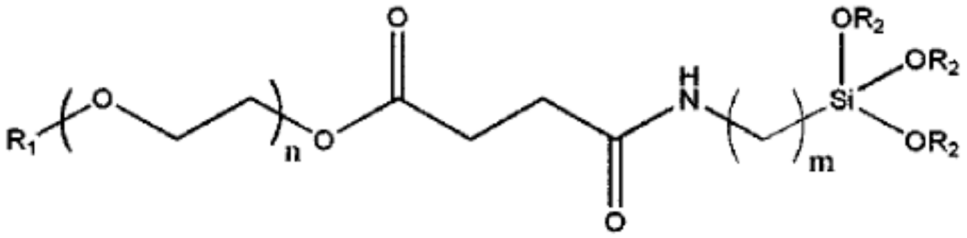
La figura 1 es un dibujo esquemático que muestra la síntesis del polímero biocompatible de la invención; y

La figura 2 es un dibujo esquemático que muestra una nanopartícula magnética modificada con el polímero biocompatible de la invención.

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción es el modo mejor contemplado de llevar a cabo la invención. Esta descripción se hace con el propósito de ilustrar los principios generales de la invención y no debe tomarse en un sentido limitante. La invención se determina de la mejor manera mediante referencia a las reivindicaciones adjuntas.

El polímero biocompatible de la invención está representado por la fórmula general (I),

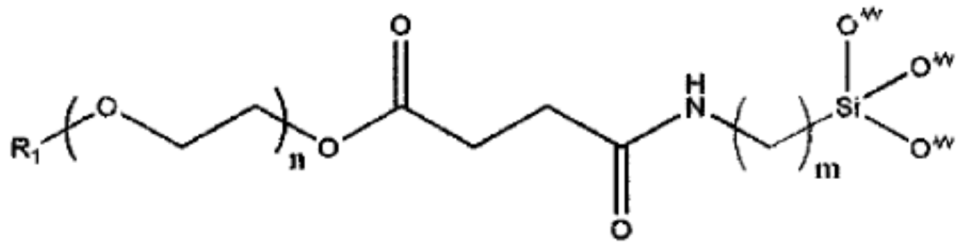


(I)

en la cual R_1 es alquilo de cadena lineal o ramificada de C_1-C_{20}, R_2 es alquilo de cadena lineal o ramificada de C_1-C_{20}, n es un número entero de 5 a 1000 y m es un número entero de 1 a 10. La figura 1 es un dibujo esquemático que muestra la síntesis del polímero biocompatible de la invención, en el que R_1, R_2, n y m tienen el mismo significado que el descrito anteriormente. Como se muestra en la figura 1, el esquema de síntesis implica convertir el grupo terminal hidroxilo de polietilenglicol (PEG) en un grupo carboxilo usando un compuesto de anhídrido succínico y acoplar un grupo silano al PEG. En una forma de realización, cada uno de R_1 y R_2 independientemente, es un alquilo de C_1-C_6 de cadena lineal o ramificada tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, ter-pentilo, n-hexilo e isohexilo. El número de unidades de metileno m es preferiblemente un número entero de 1 a 10. El número de unidades de oxietileno n es preferiblemente un número entero de 5 a 1000, equivalente a un peso molecular de aproximadamente 200-50000 g/mol del PEG. En una forma de realización, m es aproximadamente 3 y n es aproximadamente 15.

El polímero biocompatible sintetizado en la figura 1 es útil porque puede modificar químicamente la superficie de la nanopartícula de óxido de hierro para aumentar la biocompatibilidad. Además, el polímero biocompatible es útil porque puede etiquetar partículas (por ejemplo, nanopartículas, partículas magnéticas, nanopartículas magnéticas, partículas superparamagnéticas), para hacer que las partículas sean más reactivas frente a uno o más agentes de direccionamiento, fluorescentes, terapéuticos o de diagnóstico.

La invención también proporciona una nanopartícula magnética con biocompatibilidad, que comprende una nanopartícula magnética; un polímero biocompatible de fórmula (II) acoplado covalentemente a la nanopartícula magnética,



(II)

en la cual R_1 es alquilo de cadena lineal o ramificado de C_1-C_{20}, n es un número entero de 5 a 1000 y m es un número entero de 1 a 10. La figura 2 es un dibujo esquemático que muestra una nanopartícula magnética modificada con el polímero biocompatible de la invención. La nanopartícula magnética está hecha preferiblemente de al menos uno de Fe, Co, Ni y sus óxidos. Se apreciará que la nanopartícula puede estar hecha de cualquier material magnético único o composite, aunque los materiales superparamagnéticos son particularmente preferidos. El número de unidades de metileno m es preferiblemente un número entero de 1 a 10. El número de unidades de oxietileno n es preferiblemente un número entero de 5 a 1000. En una forma de realización, m es aproximadamente 3 y n es aproximadamente 15. El polímero biocompatible está revestido preferiblemente en toda la superficie de la nanopartícula magnética para formar una estructura de núcleo-cubierta. Más preferiblemente, el polímero biocompatible forma un recubrimiento monocapa sobre la nanopartícula magnética.

Los resultados experimentales indican que el polímero biocompatible de la invención puede aumentar el valor de r2 de la nanopartícula magnética a aproximadamente 2 veces el de los agentes de contraste comerciales, Feridex® y Resovist®. En consecuencia, la nanopartícula magnética puede proporcionar una mayor mejora de contraste cuando se usa como agente de contraste de MRI.

Sin pretender limitar la presente invención de ninguna manera, la presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de nanopartículas

11.6 g (0.058 moles) de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 11.6 g (0.096 moles) de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 400 ml de agua desionizada se agitaron en un matraz de tres cuellos a 300 rpm a 25°C. Se añadieron 170 ml de una solución de NaOH de 2.5 N al matraz a una velocidad de 47 ml/s. Cuando se midió un valor de pH de 11-12 después de la adición de la solución de NaOH de 2,5 N, se añadieron 20 ml de ácido oleico y se agitó durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió lentamente una solución de HCl de 6N para ajustar el valor de pH a aproximadamente 1, y de esta manera se precipitaron partículas de óxido de hierro encapsulado en ácido oleico. Los precipitados se recogieron, se lavaron con agua desionizada durante 4-5 veces para eliminar el exceso de ácido oleico y se secaron.

Ejemplo 2: Síntesis de polímero biocompatible mPEG-silano

Se colocaron 300 g (0.4 moles) de metoxi-PEG (mPEG, peso molecular: 750) y 600 ml de N-metil-2-pirrolidona en un matraz de fondo redondo de 1000 ml al vacío (20 Torr = 2666.45 Pa) durante más de 2 horas. Se añadieron 48 g (0.48 moles) de anhídrido succínico y 19.5 g (0.159 moles) de 4-dimetilamino-piridina (DMAP) para la reacción a 30°C durante dos días.

Se añadieron 36 ml (0.48 moles) de cloruro de tionilo a una velocidad de 1 ml/min y la mezcla se agitó durante 2-3 horas. Posteriormente, se añadieron 133.8 ml (0.96 moles) de trietilamina a una velocidad de 1 ml/min. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró para eliminar los precipitados. Se añadieron 94.5 ml (0.4 moles) de 3-aminopropil trietoxisilano para la reacción durante al menos 8 horas.

La mezcla de reacción se añadió a 9 litros de éter isopropílico para volver a precipitar, y los precipitados se recogieron, se re-disolvieron en 500 ml de tolueno y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para recoger un sobrenadante. El sobrenadante se añadió nuevamente a 9 l de éter isopropílico para la re-precipitación. El líquido oleoso marrón se recogió y se secó al vacío para obtener el polímero biocompatible, mPEG-silano.

Ejemplo comparativo 3: Síntesis de polímero biocompatible COOH-PEG-silano

Se colocaron 300g (0.4 moles) de PEG (peso molecular: 750) y 600 ml de N-metil-2-pirrolidona en un matraz de fondo redondo de 1000 ml al vacío (20 Torr= 2666.45 Pa) durante más de 2 horas. Se añadieron 96 g (0.96 moles) de

anhídrido succínico y 39 g (0.318 moles) de 4-dimetilamino-piridina (DMAP) para la reacción a 30°C durante dos días, obteniendo así PEG terminado con dicarboxilo (COOH-PEG).

Se añadieron 36 ml (0.48 moles) de cloruro de tionilo a una velocidad de 1 ml/min y se agitó durante 2-3 horas. Posteriormente, se añadieron 133.8 ml (0.96 moles) de trietilamina a una velocidad de 1 ml/min. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró para eliminar los precipitados. Luego, se añadieron 94.5 ml (0.4 moles) de 3-aminopropil trietoxisilano para reacción durante al menos 8 horas.

La mezcla de reacción se añadió a 9 litros de éter isopropílico para volver a precipitar, y los precipitados se recogieron, se re-disolvieron en 500 ml de tolueno y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para recoger un sobrenadante. El sobrenadante se añadió nuevamente a 9 l de éter isopropílico para la re-precipitación. El líquido oleoso marrón se recogió y se secó al vacío; de esta manera se obtuvo el polímero biocompatible, COOHPEG-silano.

Ejemplo 4: acoplamiento con polímero biocompatible

Se agregaron 250 g de mPEG-silano a 1-1.2 l de una solución de tolueno que contenía 10 g de óxido de hierro del Ejemplo 1 y la mezcla se sometió a ultrasonido durante 2-3 horas. Después de la adición de 1,5 l de agua desionizada, la mezcla se purificó mediante un dispositivo de ultrafiltración y se concentró a 100 ml para obtener nanopartículas de óxido de hierro modificadas por un polímero biocompatible.

Ejemplo comparativo 5: Acoplamiento con agente de direccionamiento

Se colocaron 226 µl de solución de folato (folato/dimetilsulfóxido: 10 mg/ml) en un matraz de fondo redondo de color marrón de 50 ml. Se añadieron a la solución 5 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y 176.5 µl de solución de diciclohexil carbodiimida (diciclohexil carbodiimida/DMSO: 5 mg/ml) y se agitó durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 98.5 µl de solución de NHS (N-hidroxisuccinimida/DMSO: 5 mg/ml) y se agitó durante 1 hora. Luego, se agregaron 289 µl de etilendiamina para dar una solución A.

Se colocaron 1 ml de la nanopartícula de óxido de hierro modificado con COOH-PEG-silano del Ejemplo 4 (4.48 mg/ml) y 10 ml de DMSO en un matraz de fondo redondo de 50 ml al vacío durante 1 hora. Se añadieron 176.5 µl de solución de diciclohexil carbodiimida (diciclohexil carbodiimida/DMSO: 5 mg/ml) a la solución y se agitó durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 98.5 µl de solución de NHS (N-hidroxisuccinimida/DMSO: 5 mg/ml) y se agitó durante 1 hora para dar una solución B.

Se añadieron 2895 µl (medio volumen) de solución A a la solución B y se agitó durante 8 horas. La solución resultante se añadió a una membrana de diálisis (Mw: 3000) y se usó agua para diálisis. Luego, la solución se concentró a 2 ml mediante un dispositivo de ultrafiltración para obtener nanopartículas de óxido de hierro junto con un agente de direccionamiento.

Ejemplo comparativo 6: acoplamiento con colorante fluorescente

Se mezcló 1 ml de CypHer5E (colorante NIR de Amersham Bioscience Co., 10^{-6} moles/ml) con 10^{-6} moles de etilendiamina y se agitó durante 1 hora, dando así una solución C.

Las nanopartículas de óxido de hierro acopladas con folato (2 mg/ml) del Ejemplo 5 se disolvieron en 10 ml de agua desionizada, seguido de la adición de 10^{-6} moles de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Después de agitar la mezcla durante una hora, se añadieron 10^{-6} moles de N-hidroxisuccinimida (NHS) y se agitó durante otra hora, dando así una solución D.

La solución C se añadió a la solución D y se agitó durante 8 horas. La solución resultante se añadió a una membrana de diálisis (Mw: 3000) y se usó agua para diálisis. Luego, la solución se concentró a 2 ml mediante un dispositivo de ultrafiltración para obtener nanopartículas de óxido de hierro junto con un agente de direccionamiento y un colorante fluorescente.

Ejemplo 7: prueba de relajación

Las nanopartículas de óxido de hierro modificadas del Ejemplo 5 se compararon para la relajación r1 y r2 con el producto de la publicación de patente de Estados Unidos No. 2006/0216239 y agentes de contraste comerciales, es decir, Feridex® y Resovist®.

Las soluciones de óxido de hierro de varias concentraciones (de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM) fueron preparadas y medidas para el tiempo de relajación T1 o T2 por un Minispec mq 20 de la Bruker Corporation. Se estableció una relación lineal entre el recíproco del tiempo de relajación como eje de ordenadas y la concentración de la solución como eje de abscisas. La pendiente de la relación lineal fue la relajación r1 y r2.

Como se muestra en la Tabla 1, la relajación r2 de las nanopartículas de óxido de hierro modificadas de la invención fue aproximadamente 2 veces mayor que la de Feridex® y Resovist®, y aproximadamente 1.4 veces mayor que la del producto de la técnica anterior de la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2006/0216239. En consecuencia, el aumento del contraste se mejoró debido a la mayor relajación r2.

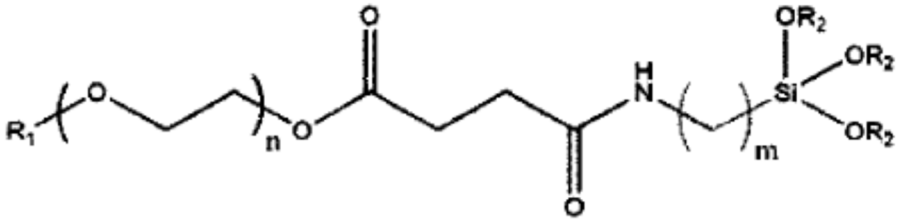
Tabla 1

	La invención	US 2006/0216239	Resovist®	Feridex®
Diámetro*	8-12 nm	8-12 nm	4.2 nm	4.8-5.6 nm
r2 $(mM \cdot s)^{-1}$	321.8 ± 2.3	229	164	160
r1 $(mM \cdot s)^{-1}$	33.4 ± 0.3	23.6	25.4	40
* El diámetro fue determinado mediante TEM				

Si bien la invención se ha descrito a modo de ejemplo y en términos de forma preferida de realización, debe entenderse que la invención no está limitada a los mismos. Por el contrario, se pretende cubrir diversas modificaciones y disposiciones similares (como sería evidente para los expertos en la materia). Por lo tanto, al alcance de las reivindicaciones adjuntas se debe otorgar la interpretación más amplia para abarcar todas las modificaciones y disposiciones similares.

REIVINDICACIONES

1. Un polímero biocompatible de fórmula (I),



(I),

en la cual R_1 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada;

R_2 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada;

n es un número entero de 5 a 1000; y

m es un número entero de 1 a 10.

2. El polímero biocompatible como se reivindica en la reivindicación 1, en el que cada uno de R_1 y R_2 es independientemente un alquilo de C_1-C_6 de cadena lineal o ramificada.

3. El polímero biocompatible como se reivindica en la reivindicación 1, en el que R_1 es metilo.

4. El polímero biocompatible como se reivindica en la reivindicación 1, en el que R_2 es etilo.

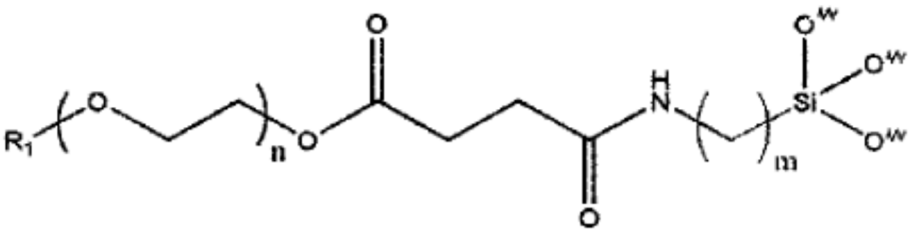
5. El polímero biocompatible como se reivindica en la reivindicación 1, en el que n es 15.

6. El polímero biocompatible como se reivindica en la reivindicación 1, en el que m es 3.

7. Una nanopartícula magnética con biocompatibilidad, que comprende:

una nanopartícula magnética; y

un polímero biocompatible de fórmula (II) acoplado covalentemente a la nanopartícula magnética,



(II),

en la cual R_1 es alquilo de C_1-C_{20} de cadena lineal o ramificada;

n es un número entero de 5 a 1000; y

m es un número entero de 1 a 10.

8. La nanopartícula magnética con biocompatibilidad como se reivindica en la reivindicación 7, en la que la nanopartícula magnética es una nanopartícula superparamagnética.

9. La nanopartícula magnética con biocompatibilidad como se reivindica en la reivindicación 7, en la que la nanopartícula magnética comprende al menos uno de Fe, Co, Ni y sus óxidos.

10. La nanopartícula magnética con biocompatibilidad como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el polímero biocompatible se reviste sobre la nanopartícula magnética para formar una estructura de núcleo/cubierta.

11. La nanopartícula magnética con biocompatibilidad como se reivindica en la reivindicación 10, en la que el polímero biocompatible forma un revestimiento monocapa sobre la nanopartícula magnética.

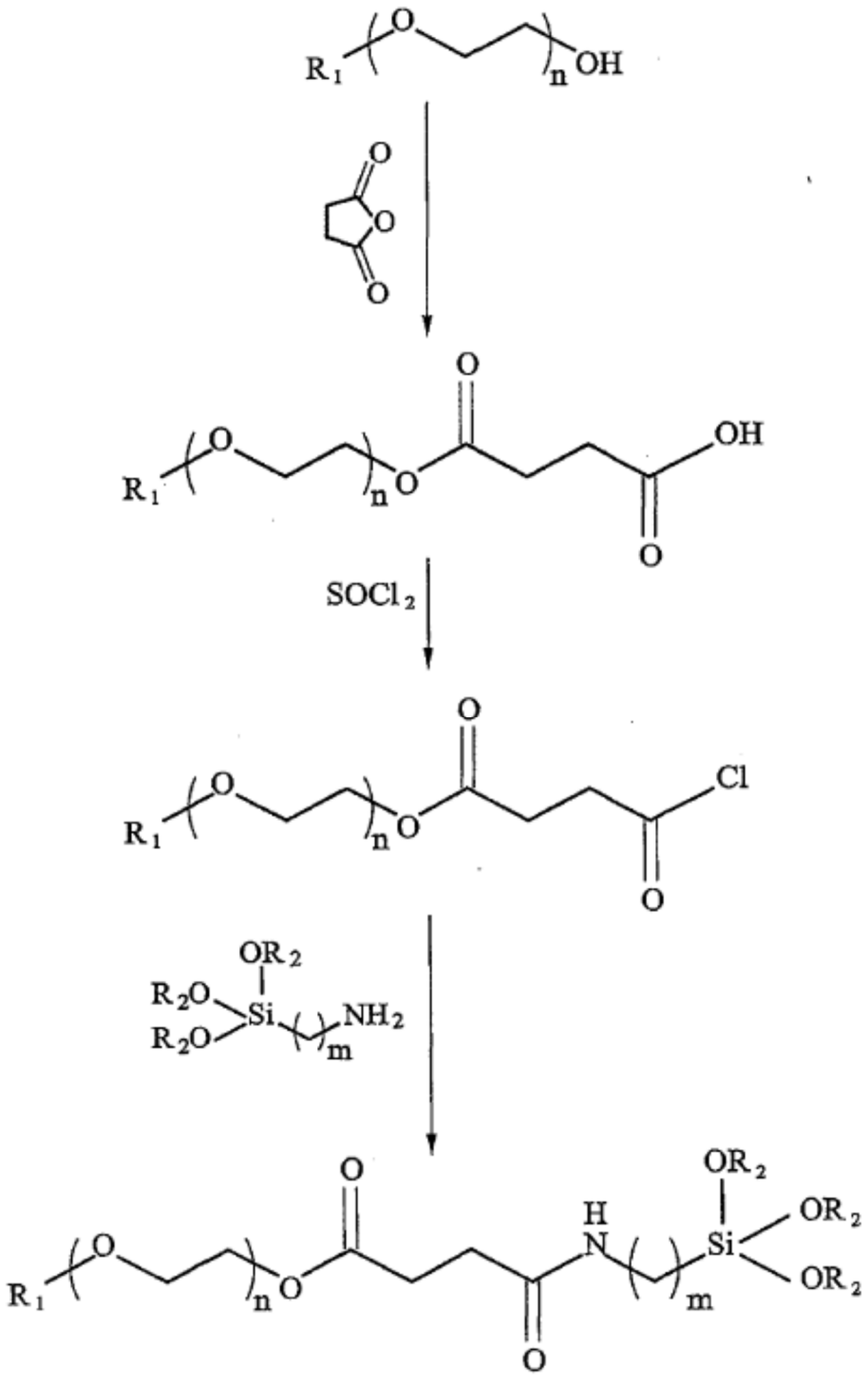

R1
O
n
OH
O
O
O
O
R1
O
n
O
OH
O
SOCl2
R1
O
n
O
Cl
O
OR2
R2O
R2O
Si
NH2
m
R1
O
n
O
O
H
N
OR2
Si
OR2
OR2
m
O

FIG. 1

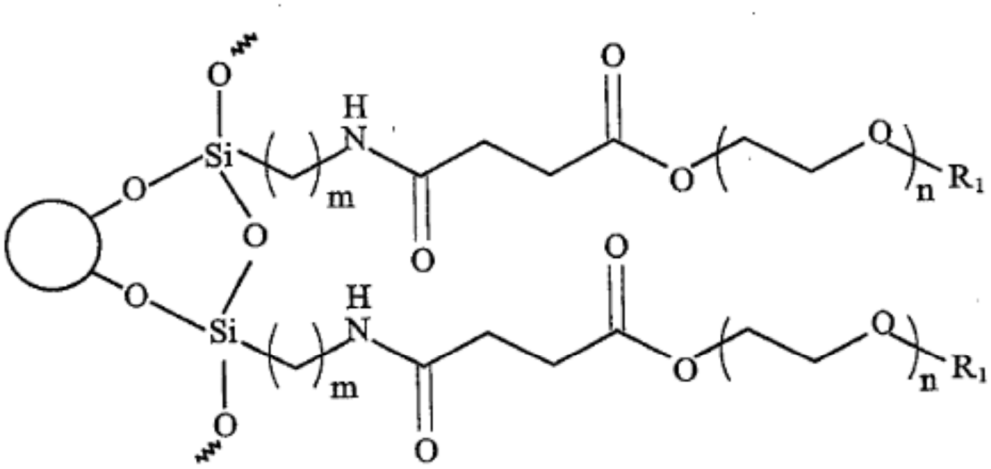


FIG. 2